

## ВПЛИВ ОКИСНОГО СТРЕСУ НА РІВЕНЬ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ *TGFβ1* І *HGF* У ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ В УМОВАХ ТРИВАЛОЇ ШЛУНКОВОЇ ГІПОХЛОРОГІДРІЇ ТА ЗА ВВЕДЕННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКА СИМБІТЕР

К. О. ДВОРЩЕНКО, О. О. БЕРНИК, А. С. ДРАНИЦИНА,  
С. А. СЕНІН, Л. І. ОСТАПЧЕНКО

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;  
e-mail: k21037@gmail.com

Досліджено вільнорадикальні процеси в печінці щурів під час тривалої шлункової гіпохлоргідрії, спричиненої омега-3 жирними кислотами. Встановлено підвищення інтенсивності окислювальних процесів у тканині печінки: надлишкове утворення супероксидного аніона, пероксиду водню, кількісні зміни функціональних груп ліпідів, зростання вмісту продуктів пероксидного окислення ліпідів, збільшення ксантиноксидазної активності. Показано, що експресія гену *Tgfb1* зростає, а експресія гену *Hgf* не виявляється, що свідчить про можливий розвиток фіброзу печінки. Встановлено, що за введення мультипробіотика «Симбітер® ацидофільний» концентрований щуром із тривалою шлунковою гіпохлоргідрією вищезазначені показники частково відновлюються до контрольних значень, що свідчить про здатність препарату протидіяти розвитку окисних пошкоджень тканини печінки.

**Ключові слова:** шлункова гіпохлоргідрія, печінка, активні форми кисню, пероксидне окислення ліпідів, експресія генів, пробіотики.

Одним із пріоритетних напрямів сучасної біохімії є вивчення закономірностей метаболічних зсувів у разі патологій в різних органах. Це сприяє виявленню молекулярних основ патогенезу багатьох захворювань і дозволяє встановити найчутливіші параметри для своєчасного контролювання тяжкості процесу та створювати програми лікування. Особливого значення набуває дослідження структурно-функціонального стану печінки, оскільки реакція цього органу на стрес-фактори в багатьох випадках визначає і загальну реакцію організму, враховуючи широкий функціонально-метаболічний профіль печінки.

До цього часу приділялось мало уваги вивченню структурно-функціонального стану печінки за умов тривалих гіпоацидних порушень шлунка [1, 2]. Гіпоацидність шлункового соку має багатофакторну етіологію: вона супроводжує низку захворювань (атрофічний гастрит, рак шлунка, інфекція *H. pylori*, автоімунні порушення), розвивається в процесі старіння та є результатом прийому фармакологічних препаратів, які блокують кислотну секрецію шлунка [3–5]. Пригнічення кислотоутворюючої функції шлунка призводить до порушення травлення, гіпергастринемії, колонізації травної систе-

ми патогенною мікрофлорою та формування резервуарів ендогенної інфекції, і як наслідок до розвитку запальних процесів у шлунково-кишковому тракті (ШКТ) [6–8]. У деяких дослідженнях показано, що за умов тривалого перебігу дисбіозу кишечника зростає ризик розвитку метаболічних захворювань печінки та ураження позапечінкової біліарної системи, таких як неалкогольний стеатоз, стеатогепатит, неспецифічний реактивний гепатит, внутрішньопечінковий інтрабулярний холестаза, печінковоклітинна дисфункція, запальні процеси та дискінетичні порушення позапечінкового біліарного тракту [9, 10]. У зв'язку з цим тривала шлункова гіпохлоргідрія може бути причиною розвитку патологічних процесів у гепатобіліарній системі.

Відомо, що розвиток запального процесу супроводжується активацією пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) [11, 12]. За хімічною природою ПОЛ є процесом вільнорадикального окислення (ВРО), реакціям якого піддаються будь-які сполуки, але найчутливішими до ВРО є ліпіди, в першу чергу ненасичені жирні кислоти. Ініціацію ВРО здійснюють активні форми кисню (АФК), які утворюються в живих організмах внаслідок неповного відновлення молекулярного кисню. За фізіологічних умов АФК є складовою неспецифічної захисної

системи організму проти різних патогенів, мікроорганізмів та пухлинних клітин. Але за певних умов і нормальні клітини можуть стати мішенню дії АФК, наприклад, на ділянках тканини із запаленням, зокрема при контамінації печінки патогенною мікрофлорою внаслідок транслокації бактерій з кишечника [13, 14].

Окисний стрес безпосередньо впливає на молекулярні механізми регуляторних процесів у клітині, зокрема на експресію генів, клітинну сигналізацію та інші біологічні процеси, включаючи вирішення питання життя та загибелі клітини. Відомо, що центральним компонентом системи росту гепатоцитів, формування фіброзу та контролю апоптозу є плейотропний цитокін – трансформуючий фактор росту ( $TGF-\beta_1$ ) [15, 16]. Іншим важливим мультифункціональним цитокіном, задіяним у регуляцію функціонування печінки, є фактор росту гепатоцитів (HGF), який стимулює регенерацію тканини печінки, захищає гепатоцити та інші клітини від апоптозу, виявляє антифіброзну дію, сприяє формуванню судин [17, 18]. У зв'язку з цим ці гени можуть бути задіяні в молекулярних механізмах формування відповіді клітин печінки на негативні впливи.

Особливу роль у підтримці загального гомеостазу організму виконує індигенна мікрофлора, яка має широкий спектр біологічної активності. Тому для корекції патологічних станів доцільним є використання пробіотичних препаратів, які здатні оптимізувати мікробіоценоз макроорганізму [19–21]. Нами було використано мультипробіотик «Симбітер® ацидофільний» концентрований (Симбітер), який є концентрованою біомасою живих клітин мультикомпонентного симбіозу пробіотичних бактерій (біфідобактерій, лактобактерій, молочнокислих стрептококів та пропіоновокислих бактерій) [22].

Метою роботи було оцінити інтенсивність вільнорадикальних процесів та їх вплив на експресію генів *Tgfb1* і *Hgf* у печінці щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії та за введення мультипробіотика Симбітер.

### Матеріали і методи

У дослідах використовували білих нелінійних статевозрілих щурів-самців з масою тіла 180–220 г. Дослідження проводили з дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень, 2001 р.), інших міжнародних угод

та національного законодавства у цій галузі. Дослідних тварин утримували в стандартних клітках, воду та збалансований гранульований корм тварини отримували *ad libitum*. Тварин було розділено на чотири експериментальні групи. У першій групі (контроль) щурам протягом 28 діб вводили внутрішньочеревинно 0,2 мл та перорально 0,5 мл води для ін'єкцій. Тваринам другої групи протягом 28 діб вводили мультипробіотик Симбітер (виробництва ТОВ «О. Д. Пролісок») перорально в дозі 0,14 мл/кг, розчинений у 0,5 мл води для ін'єкцій. У третій групі щурів моделювали стан гіпохлоргідрії за допомогою внутрішньочеревинного введення (1 раз на добу) 14 мг/кг омепразолу (Sigma, США), протягом 28 діб. Четверта група щурів одночасно із введенням омепразолу отримувала мультипробіотик Симбітер перорально в дозі 0,14 мл/кг, розчинений у 0,5 мл води для ін'єкцій.

Із експерименту тварин виводили шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом (8 мг/кг маси тіла). Для досліджень печінку тварин одразу поміщали у скраплений азот.

Вміст супероксидного аніон-радикала визначали спектрофотометрично з використанням ХТТ (2,3-біс-(2-метокси-4-нітро-5-сульфофеніл)-2Н-тетразолій-5-карбоксамід) як акцептора електронів [23]. Вміст пероксиду водню встановлювали спектрофотометрично з використанням барвника ксиленол оранж [24]. Активність ксантинооксидази (1.2.3.2) визначали за утворенням сечової кислоти із ксантину [25].

Екстракцію ліпідів із тканини печінки щурів проводили хлороформ – метанольною сумішшю (2 : 1, v/v), за Фолчем [26]. Одержані екстракти очищали від неліпідних домішок методом Кейтса [27]. Кількість загальних ліпідів у тканині печінки визначали шляхом зважування їх сухого залишку після видалення розчинника на роторному випарювачі. Із сумарних ліпідів знімали ІЧ-спектри на Фур'є-спектрометрі Nexus (Thermo Nicolet, США), який обладнаний датчиком DTGS. Аналіз ІЧ-спектрів ліпідів здійснювали в діапазоні хвильових чисел від 4000 до 400  $\text{cm}^{-1}$ . Вимірювання площини піків на ІЧ-спектрах виконувалось за допомогою програмного забезпечення приладу OMNIC (версія 5.1). Кількісну оцінку функціональних груп ліпідів виражали в умовних одиницях на 1 мг ліпідів [28].

Вміст дієнових кон'югатів визначали в гептан-ізопропанольному екстракті спектрофотометричним методом [29]. Вміст ТБК-активних продуктів встановлювали за

реакцією з тіобарбітуровою кислотою [30], а вміст протеїну – методом Лоурі [31].

РНК отримували за методом Chomczynski [32]; кДНК синтезували в 20 мкл реакційної суміші, яка містила 2 мкг РНК, 1 мМ dNTP, 200 од. зворотної транскриптази RevertAid M-MLV, відповідний буфер, 20 од. рибонуклеазного інгібітора (RiboLock), 1 мМ зворотного праймера. Синтез проводився за таких умов: 70 °С – 5 хв, далі 37 °С – 5 хв, 42 °С – 1 год. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили в 30 мкл реакційної суміші, що містила 10 мкл кДНК, буфер для ПЛР, по 200 мМ кожного dNTP, по 1 мМ кожного праймера, до 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub> та 1,5 од. Taq ДНК полімерази (МВІ Fermentas, Литва). Ампліфікацію фрагментів ДНК здійснювали за таких температурних умов: ініціююча денатурація 94 °С – 4 хв; далі 35 циклів – для *Tgfb1*, 30 циклів – для *Hgf*, 29 циклів – для *Actb* – β-актину (ген, що використовується в якості внутрішнього контролю реакції завдяки конститутивній експресії): денатурація ДНК 94 °С – 45 с; гібридизація праймерів 52 °С – 45 с для *Tgfb1* (305 п.н.), 49 °С – 40 с для *Hgf* (480 п.н.) та 49 °С – 40 с для β-актину (521 п.н.); добування ланцюга 72 °С – 1 хв 15 с (для *Tgfb1*) або 1 хв (для *Hgf* та β-актину). Після цього проводили добудову ампліфікатів при 72 °С – 5 хв.

У реакціях було використано такі послідовності праймерів: для *Tgfb1* – прямий – 5'-СТТCAGCTCCACAGAGAAGAACTGC-3' та зворотний – 5'-CACGATCATGTTGGACAACCTGCTCC-3'; для *Hgf* – прямий – 5'-AGCTCAGAACCGACCGGCTTGCAACAGGAT-3' та зворотний – 5'-ТТАССААТGATGCAAТТТСТААТАТАGТСТ-3'; для *Actb* – прямий – TGGGACGATATGGAGAAGAT та зворотний – АТТGCCGATAGTGATGAXCT. Розділення продуктів ПЛР проводили за допомогою електрофорезу в 1,6% агарозному гелі, у 0,5-кратному TBE буфері, при напрузі 5–10 В/см. Для напівкількісного аналізу експресії ампліконів на основі денситометрії використано програму ImageJ 1.45s (НИН, США). Індокси експресії мРНК визначали для кожного зразка, як описано в роботі [33].

Статистичний аналіз проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента; вірогідними вважали дані при  $P < 0,05$ .

### Результати та обговорення

В експериментах на щурах стан тривалої шлункової гіпохлоргідрії створювали шляхом 28-денного введення інгібітора протонної помпи (ІПП) парієтальних клітин шлунка – оме-

празолу [34]. За структурою це заміщене похідне бензімідазолу з властивостями слабкої основи ( $pK_a \approx 4,0$ ). За рахунок високої ліпофільності омепразол всмоктується у проксимальних ділянках шлунково-кишкового тракту (ШКТ), транспортується кров'ю в альбумін-зв'язаному стані та вільно проникає крізь клітинні мембрани. За досягнення секреторних каналців парієтальних клітин шлунка омепразол двічі протонується, внаслідок чого утворюється активна форма молекули – сульфенамід омепразолу. Протонована форма значно гірше проникає крізь клітинні мембрани, за рахунок чого концентрація омепразолу саме в секреторних каналцях парієтальних клітин приблизно в 1000 разів перевищує його концентрацію в крові [34, 35].

Сульфенамід омепразолу діє як тіофільний агент, формуюючи дисульфідні містки із 321, 813 та 822 залишками цистеїну H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТРази, що призводить до необоротного інгібування ензиму та зниження секреції протонів у просвіт секреторних каналців [35].

Результати проведених досліджень показали, що в умовах тривалої гіпохлоргідрії шлунка, спричиненої омепразолом, у гомогенаті печінки вміст АФК зростає: супероксидний аніон-радикал – в 1,8 раза та пероксид водню – в 2 рази відносно контролю (табл. 1).

Утворення супероксидного аніон-радикала відбувається внаслідок приєднання одного електрона до молекули кисню. У клітинах супероксидний аніон-радикал є проміжним продуктом багатьох біохімічних реакцій: окислення тіолів, флавінів, хінонів, катехоламінів, а також метаболізму ксенобіотиків [36, 37]. Однак основними джерелами його утворення є ензимні системи: NADPH-оксидаза фагоцитуючих клітин, ксантинооксидаза, мітохондріальна цитохром-*c*-оксидаза та мікросомальні монооксигенази. Додатковим джерелом супероксиду може бути активація ксантинооксидази, утворення якої відбувається внаслідок окислення SH-груп ксантиндегідрогенази за умов розвитку окисного стресу [38]. Встановлено, що ксантинооксидазна активність у печінці щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії зростає в 1,3 раза відносно контролю (табл. 1), що збільшує рівень токсичних ефектів АФК на клітини та сприяє розвитку запальних процесів у тканині печінки [39].

Супероксидний аніон-радикал дає початок іншим прооксидантам із реакційною здатністю. Приєднання двох електронів до молекули кисню або одного електрона до су-

пероксидного аніон-радикала призводить до утворення пероксиду водню. Супероксидний аніон-радикал та пероксид водню є попередниками утворення сильного окислювача – гідроксид-радикалу, продукту трьохелектронного відновлення кисню, який пошкоджує структури живої клітини. Гідроксид-радикал генерується в реакціях Хабера–Вайса та Фентона, що каталізуються іонами металів зі змінною валентністю, переважно  $Fe^{2+}$  та  $Cu^{2+}$ . Гідроксид-радикал реагує з великою швидкістю та високою спорідненістю з молекулами клітини, що спричинює хімічне пошкодження дезоксирибози, пуринових та піримідинових основ, протеїнів, ліпідів, вуглеводів, і призводить до каскаду реакцій, які пошкоджують клітинні структури [40].

Серед багатьох біологічних мішеней, які піддаються дії АФК, чутливим класом макромолекул є ліпіди, окислення яких призводить до накопичення в організмі продуктів ліпопероксидації з високою реакційною здатністю, що можуть спричинити системну пошкоджуючу дію на клітини. Тому було доцільним дослідити структурну організацію ліпідів печінки щурів в умовах нашого експерименту.

Аналіз ІЧ-спектрів структурних елементів ліпідів печінки контрольних щурів показав переважання СН- (у середньому 45,95%), карбонільних (22,28%), гідроксильних (11,06%),  $CH_2$ - (6,95%) та фосфатних (7,78%) груп (рис. 1). Вміст альдегідних груп, *цис*- та *транс*-ізомерів складав відповідно 1,67; 2,65 та 1,66% (рис. 1).

В умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії спостерігаються суттєві зміни

в структурній організації ліпідів печінки щурів (табл. 2): вміст гідроксильних груп збільшується у 2,4 раза; альдегідних – у 1,7 раза, фосфатних – у 1,4 раза та *транс*-ізомерів в 1,2 раза порівняно з контролем. Одночасно знижується вміст карбонільних груп та *цис*-ізомерів в 1,3 та 1,5 раза відповідно.

Встановлено, що в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії змінюється склад та швидкість окислювальних перетворень у ліпідах мембран печінки щурів. Зафіксоване зниження вмісту карбонільних, СН-груп та підвищення фосфатних груп може свідчити про підвищення метаболічних процесів у фосфоліпідах мембран гепатоцитів. Збільшення кількості гідроксильних і альдегідних груп на фоні зниження *цис*-ізомерів та підвищення рівня *транс*-ізомерів є наслідком активації вільнорадикальних процесів, що призводить до інтенсифікації окислення ліпідів.

Для оцінки інтенсивності процесів ПОЛ у печінці щурів визначали вміст продуктів ліпідної пероксидації – дієнових кон'югатів та ТБК-активних сполук. Вміст дієнових кон'югатів є біохімічним показником кількості первинних продуктів ПОЛ, що утворюються за участю АФК та вільних радикалів  $L$ ;  $LO\cdot$  і  $LOO\cdot$ . Вторинні продукти ліпідної пероксидації, які утворюються під час реакцій ланцюгового переокислення, виявляють високу реакційну здатність. Так, ТБК-активні сполуки (малоновий діальдегід та його похідні) зумовлюють модифікацію протеїнів, нуклеїнових кислот та зміни у ліпідному шарі мембран [41–43].

Встановлено, що в умовах тривалої гіпохлоргідрії в печінці щурів вміст продуктів

Таблиця 1. Вміст активних форм кисню та ксантинооксидазна активність у печінці щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії та за введення мультипробіотика Симбітер ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ )

Параметри	Групи тварин			
	1 – Контроль	2 – Симбітер	3 – Омепразол	4 – Омепразол + Симбітер
Утворення супероксидного аніон-радикала, мкмоль ХТТ-формазану · мг протеїну <sup>-1</sup>	30,23 ± 2,97	24,62 ± 2,41*	53,68 ± 5,23*	41,61 ± 4,09*#
Вміст пероксиду водню, мкмоль · мг протеїну <sup>-1</sup>	24,15 ± 2,33	15,20 ± 1,29	47,21 ± 4,51*	34,41 ± 3,15*#
Ксантинооксидазна активність, нмоль · хв <sup>-1</sup> · мг протеїну <sup>-1</sup>	18,44 ± 1,82	16,77 ± 1,65*	24,05 ± 2,21*	20,17 ± 1,89#

Тут і в табл. 2–3: \*різниця вірогідна порівняно з контрольною групою,  $P < 0,05$ ; # різниця вірогідна порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол,  $P < 0,05$



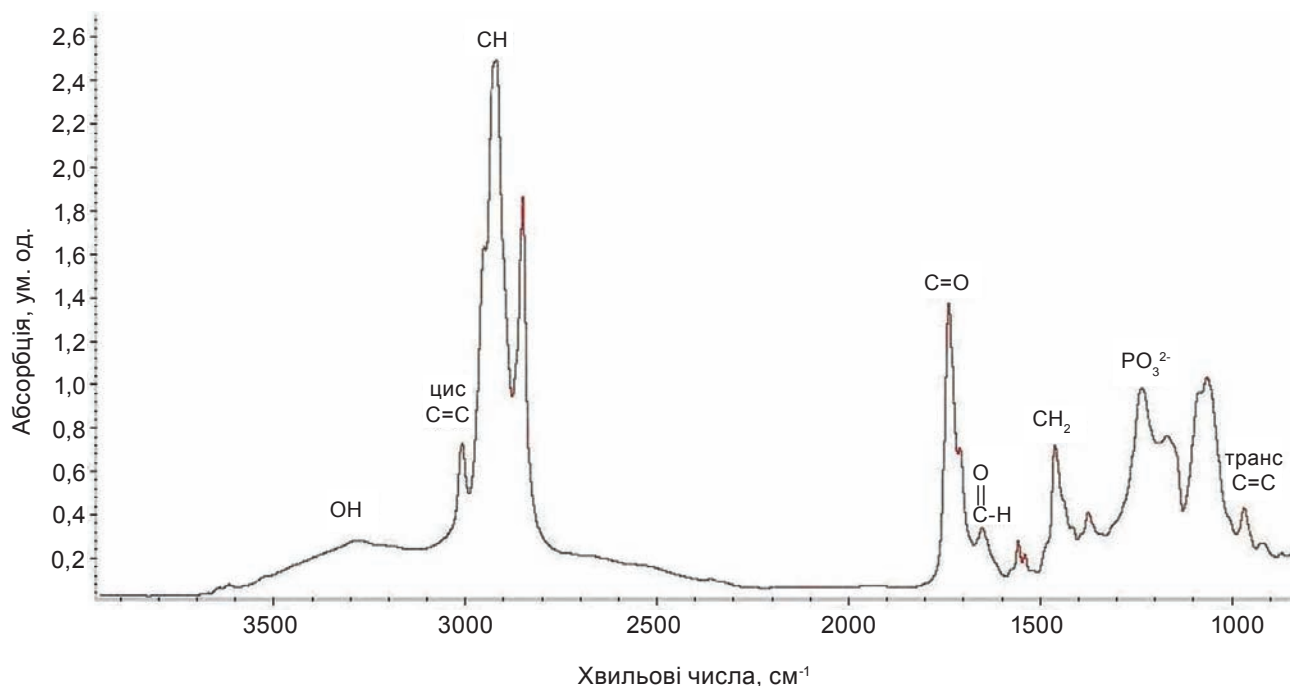


Рис. 1. ІЧ-спектр Фур'є загальних ліпідів печінки контрольних щурів ( $M \pm m, n = 10$ )

ПОЛ зростає: дієнових кон'югатів – у 2,2 раза та ТБК-активних сполук – у 1,7 раза відносно контролю (табл. 3). Активуються вільнорадикальні процеси: зростає кількість АФК (супероксидного аніон-радикала, пероксиду водню), що спричинює якісні модифікації складу ліпідних фракцій мембран та накопичення продуктів ПОЛ. Наслідками таких трансформацій можуть бути зміни фізичних

властивостей мембран: підвищення в'язкості ліпідної фази, порушення плинності ліпідного бішару, зміна швидкості роботи ліпідзалежних мембранозв'язаних ензимів, що може призвести до руйнування мембран та дезорганізації метаболізму [44–46].

Окисний стрес є індуктором запуску неспецифічних реакцій, внаслідок яких реалізується каскад різноспрямованих

Таблиця 2. Вміст функціональних груп ліпідів (ум. од. · мг ліпідів<sup>-1</sup>) у печінці щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії та за введення мультипробіотика Симбітер ( $M \pm m, n = 10$ )

Параметри	Групи тварин			
	1 – Контроль	2 – Симбітер	3 – Омепразол	4 – Омепразол + Симбітер
Гідроксильні групи (3600–3100 см <sup>-1</sup> )	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,27 ± 0,02*	0,17 ± 0,01#
Цис-ізомери (3010 см <sup>-1</sup> )	0,28 ± 0,02	0,31 ± 0,03	0,16 ± 0,01*	0,22 ± 0,02#
Метинові групи (2800–2929 см <sup>-1</sup> )	4,65 ± 0,42	4,97 ± 0,48	3,15 ± 0,03*	4,32 ± 0,42#
Карбонільні групи (1720 см <sup>-1</sup> )	2,12 ± 0,19	2,28 ± 0,22	1,51 ± 0,12*	1,89 ± 0,16#
Альдегідні групи (1679 см <sup>-1</sup> )	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,31 ± 0,03*	0,14 ± 0,01#
Метиленові групи (1454 см <sup>-1</sup> )	0,71 ± 0,07	0,67 ± 0,06	0,69 ± 0,06	0,68 ± 0,06
Фосфатні групи (1210 см <sup>-1</sup> )	0,74 ± 0,07	0,69 ± 0,06	1,14 ± 0,01*	0,82 ± 0,08#
Транс-ізомери (968 см <sup>-1</sup> )	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,21 ± 0,02*	0,15 ± 0,01#

Таблиця 3. Вміст продуктів пероксидного окислення ліпідів у печінці щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії та за введення мультипробіотика Симбітер, ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Параметри	Групи тварин			
	1 – Контроль	2 – Симбітер	3 – Омепразол	4 – Омепразол + Симбітер
Дієнові кон'югати, нмоль × мг протеїну <sup>-1</sup>	290,69 ± 19,46	282,38 ± 21,77	632,71 ± 37,37*	401,13 ± 29,85*/#
ТБК-активні сполуки, нмоль × мг протеїну <sup>-1</sup>	74,81 ± 5,58	69,43 ± 5,19	125,81 ± 11,43*	87,57 ± 5,55*/#

метаболических процесів, результатом чого, крім деструкції мембран, інактивації активності ензимів, може бути зміна експресії певних генів, залучених у механізми клітинної відповіді.

Проведені нами дослідження експресії гену *Tgfb1* у печінці щурів за умов тривалої гіпоацидності шлункового соку виявили, що в контрольній групі рівень мРНК гену *Tgfb1* становив  $0,072 \pm 0,006$  відносно  $\beta$ -актину (рис. 2). У тварин, яким вводили омепразол, цей показник зростає у 8 разів відносно контролю.

Пептидний медіатор  $TGF-\beta_1$  є основним профіброгенним цитокіном, який секретується у високомолекулярній латентній формі зірчастими клітинами (міофібробласти), синусоїдальними ендотеліоцитами, клітинами Купффера та продукується тромбоцитами і гепатоцитами. Він не тільки ініціює перетворення зірчастих клітин печінки в міофібробласти, але і збільшує експресію матриксних генів, знижує утворення матриксних металопротеїназ і посилює вироблення їх тканинних інгібіторів, а також індукує апоптоз

гепатоцитів та пригнічує проліферацію клітин печінки [47, 48]. Встановлене підвищення рівня мРНК гену *Tgfb1* у печінці щурів за гіпоацидних умов може призводити до таких наслідків: інгібувати регенерацію гепатоцитів і проліферацію недиференційованих гепатобластів, індукувати міграцію клітин у зону ураження та їх проліферацію, блокувати розвиток запальної реакції, прискорювати синтез колагену, фібронектину, ламініну, тенесцину, ентактину та протеогліканів. Інтенсивність розвитку цих процесів в ураженій печінці має дозозалежний характер: чим вища кількість *Tgfb1*, тим швидше хронічний гепатит прогресує у цироз [49]. Таким чином, зниження функціональної активності печінки корелює з накопиченням вмісту *Tgfb1*, що відображає активність фіброгенезу та зростаючий фіброз.

Встановлено, що в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії у печінці контрольної групи рівень експресії мРНК гену *Hgf* становив  $0,173 \pm 0,016$  відносно  $\beta$ -актину (рис. 3). У тварин, яким вводили омепразол, у печінці не було виявлено експресії гену *Hgf*. Одержані

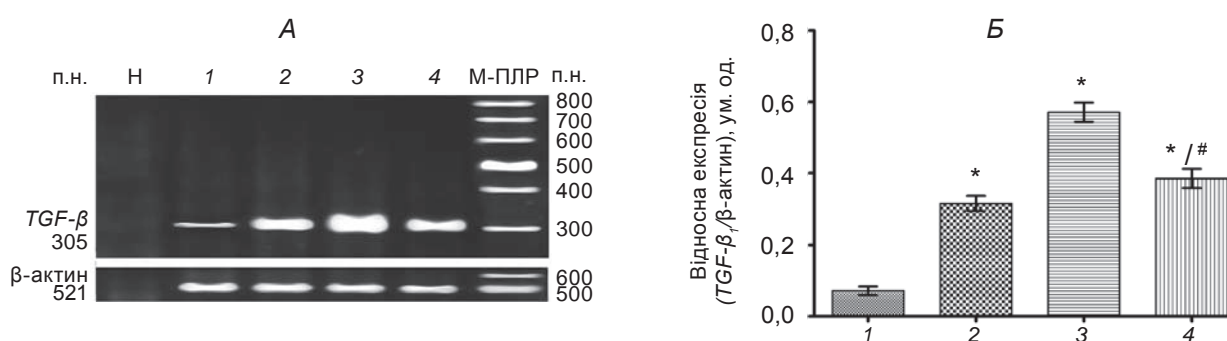


Рис. 2. Рівень експресії мРНК гену *Tgfb1* у печінці щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії та за введення мультипробіотика Симбітер. А – Електрофореграма продуктів ПЛР: Н – негативний контроль ПЛР; 1 – контроль; 2 – Симбітер; 3 – омепразол; 4 – омепразол + Симбітер; М – маркер молекулярної маси. Б – Рівень відносної експресії  $TGF-\beta_1/\beta$ -актин. \*Різниця вірогідна порівняно з контрольною групою,  $P < 0,05$ . Тут і на рис. 3: #різниця вірогідна порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол,  $P < 0,05$

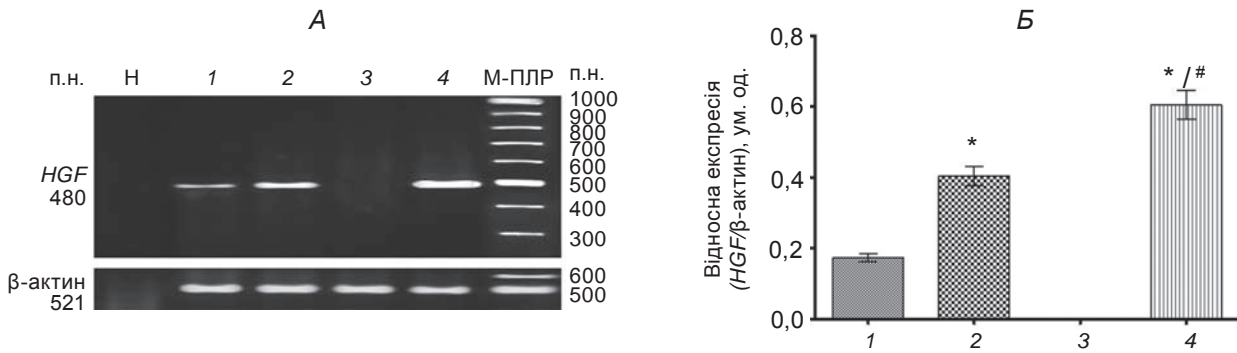


Рис. 3. Рівень експресії мРНК гену *Hgf* у печінці щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоридрії та за введення мультипробіотика Симбітер. А – Електрофореграма продуктів ПЛР: Н – негативний контроль ПЛР; 1 – контроль; 2 – Симбітер; 3 – омепразол; 4 – омепразол + Симбітер; М – маркер молекулярної маси. Б – Рівень відносної експресії HGF/β-актин

дані свідчать про порушення молекулярних механізмів регуляції антифібротичних процесів у печінці, таких як: інгібування фрагментації ДНК і апоптозу клітин печінки, пригнічення активності TGF-β<sub>1</sub>, ослаблення експресії генів колагена 1α1, фібронектина, інгібітора активатора плазміногену 1-го типу, тканинного інгібітора матриксних металопротеїназ 1-го типу, регенерації печінкової тканини [50–52].

За даними літератури у разі ушкодження печінки спостерігається негативна кореляція між рівнем TGF-β та HGF. У дослідженнях Nata та співав. [53] показано, що при моделюванні цирозу печінки щурів, індукованого введенням N-нітрозодиметиламіна, зростає експресія мРНК гену *Tgfb1* та знижується експресія мРНК гену *Hgf*. Це відбувається внаслідок отримання мезенхімальними клітинами сигналу про ушкодження печінки, що спричинює збільшення продукції TGF-β та призводить до продукції колагену і розвитку фіброгенезу, при цьому спостерігається супресія генної експресії *Hgf*. В експериментах, проведених Yasuda та співав. [54] встановлено, що введення рекомбінантного людського dHGF запобігає розвитку у щурів диметилнітрозамін-індукованого фіброзу печінки шляхом зниження рівня експресії мРНК *Tgfb1* і проколагеназа, а також стимуляції регенерації печінки. У зв'язку з цим фактор росту гепатоцитів може бути використаний як терапевтичний засіб для лікування фіброзу при хронічних захворюваннях печінки.

Таким чином, результати проведених досліджень свідчать, що у разі тривалого пригнічення шлункової секреції гідрохлоридної кислоти омепразолом відсутність експресії *Hgf* та зростання експресії гену *Tgfb1*

на фоні активації вільнорадикальних процесів у печінці щурів може бути асоційована з формуванням фіброзу в тканині печінки. Оскільки відомо, що одним з механізмів епітеліально-мезенхімної трансформації гепатоцитів та епітеліальних клітин жовчних проток є збільшення кількості матрикссинтезуючих фібробластів в ураженій печінці, кількість яких зростає за дії низки медіаторів, у тому числі TGF-β<sub>1</sub> та активних форм кисню [55].

В умовах нашого експерименту введення мультипробіотика Симбітер щурам із тривалою шлунковою гіпохлоридрією позитивно впливає на досліджувані біохімічні показники в тканині печінки: знижуються рівень супероксидного аніон-радикала і ксантинооксидазна активність – в 1,2 раза та вміст пероксиду водню – в 1,3 раза відповідно порівняно з групою щурів, яким вводили омепразол (табл. 1). У тварин істотно відновлюється структурна організація ліпідів печінки: знижується рівень гідроксильних груп – в 1,4 раза, альдегідних – в 1,5 раза, фосфатних і *транс*-ізомерів – в 1,2 раза, при цьому зростає вміст метинових груп – в 1,4 раза і *цис*-ізомерів – в 1,2 раза відносно групи щурів, яким вводили омепразол (табл. 2). У той самий час, вміст продуктів ПОЛ знижується: дієнових кон'югатів – в 1,4 раза, ТБК-активних сполук – в 1,3 раза відносно групи щурів з гіпоацидним станом (табл. 3). Під час аналізу вмісту мРНК генів *Tgfb1* та *Hgf* у тканині печінки тварин, яким одночасно вводили мультипробіотик Симбітер та омепразол протягом 28 діб, рівень мРНК гену *Tgfb1* знижується в 1,6 раза відносно групи тварин з гіпохлоридрією шлунка, при цьому експресія мРНК гену *Hgf* зростає в 3,5 раза порівняно з контролем (рис. 2).

Отже, одержані результати дозволили дійти висновку, що в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії мультипробіотик Симбітер виявляє значні протекторні властивості на тканину печінки. Ефективність дії досліджуваного препарату є наслідком широкого спектра його біологічної активності та високого рівня безпечності для організму. Механізм дії мультипробіотика Симбітер базується на його здатності дієво ліквідувати розлади, які виникають на фоні зниженого рівня гідрохлоридної кислоти в шлунку, що сприяє зниженню колонізації ШКТ патогенною мікрофлорою, зменшенню запальних та деструктивних процесів на локальному та системному рівнях організму [21, 56].

Крім того, бактеріальні штами у складі мультипробіотика Симбітер є активними продуцентами фізіологічно активних метаболітів: вітамінів, коротколанцюгових жирних кислот, антиоксидантів та імунomodуляторів, що розширює спектр біологічної активності даного препарату [22, 57, 58].

Таким чином, проведені експериментальні дослідження свідчать, що, у разі тривалого зниження рівня шлункової секреції гідрохлоридної кислоти за введення омепразолу, в тканині печінки щурів активуються вільнорадикальні процеси (зростає рівень супероксидного аніон-радикала, пероксиду водню, змінюється кількісний склад функціональних груп ліпідів, збільшується вміст продуктів ПОЛ) та спостерігаються молекулярні ознаки розвитку фіброзу: зростання експресії гену *Tgfb1* – ключового цитокіну фіброгенезу на фоні відсутності експресії гену *Hgf*, який має антифібротичний ефект. Мультипробіотик Симбітер знижує інтенсивність вільнорадикальних реакцій та активує експресію гену *Hgf*, який сприяє регенерації тканини печінки. Одержані нами результати відкривають перспективи використання мультипробіотика Симбітер як допоміжного засобу профілактики та терапії запальних процесів та фіброзу печінки різного генезу.

## **ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *TGFB1* И *HGF* В ПЕЧЕНИ КРЫС НА ФОНЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ ЖЕЛУДОЧНОЙ ГИПОХЛОРИДРИИ И ПРИ ВВЕДЕНИИ МУЛЬТИПРОБИОТИКА СИМБИТЕР**

*Е. А. Дворщенко, О. О. Берник,  
А. С. Драницина, С. А. Сенин,  
Л. И. Остапченко*

Киевский национальный университет  
имени Тараса Шевченко, Украина;  
e-mail: k21037@gmail.com

Исследованы свободнорадикальные процессы в печени крыс при длительной желудочной гипохлоргидрии, вызванной омепразолом. Установлено повышение интенсивности окислительных процессов в ткани печени: избыточное образование супероксидного аниона, перекиси водорода, количественные изменения функциональных групп липидов, увеличение содержания продуктов пероксидного окисления липидов, возрастание ксантиноксидазной активности. Показано, что экспрессия гена *Tgfb1* увеличивается, при этом экспрессия гена *Hgf* не выявляется, что свидетельствует о возможном развитии фиброза печени. Введении мультипробіотика «Симбітер® ацидофильный» концентрированный крысам с длительной желудочной гипохлоргидрией частично восстанавливает вышеуказанные показатели до контрольных значений, что свидетельствует о способности препарата противодействовать развитию окислительных повреждений ткани печени.

**Ключевые слова:** желудочная гипохлоргидрия, печень, активные формы кислорода, пероксидное окисление липидов, экспрессия генов, пробиотики.



**INFLUENCE OF OXIDATIVE STRESS ON THE LEVEL OF GENES EXPRESSION *TGFB1* AND *HGF* IN RAT LIVER UPON LONG-TERM GASTRIC HYPOCHLORHYDRIA AND ADMINISTRATION OF MULTIPROBIOTIC SYMBITER**

*K. O. Dvorshchenko, O. O. Bernyk, A. S. Dranitsina, S. A. Senin, L. I. Ostapchenko*

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine;  
e-mail: k21037@gmail.com

Free-radical processes upon long-term omeprazole-induced gastric hypochlorhydria in the rat liver were researched. Intensification of oxidative processes in the liver tissue upon gastric hypoacid state was established: overproduction of superoxide anion, hydrogen peroxide, the quantitative changes of lipid functional groups, increased level of lipid peroxidation products, and augmentation of xanthine oxidase activity. The expression of *Tgfb1* gene increased, while the expression of *Hgf* gene was not detected upon long-term suppression of gastric acid secretion of hydrochloric acid by omeprazole that indicated possible development of liver fibrosis. Abovementioned parameters were only partially restored to control values in the case of simultaneous administration of multiprobiotic "Symbiter® acidophilic" concentrated with omeprazole, thus indicating the ability of this preparation to counteract the development of oxidative damages in liver tissues upon long-term gastric hypoacidic conditions.

**Key words:** gastric hypochlorhydria, liver, reactive oxygen species, lipid peroxidation, gene expression, probiotics.

1. *Ali T., Roberts D. N., Tierney W. M.* // *Am. J. Med.* – 2009. – **122**, N 10. – P. 896–903.
2. *García Rodríguez L. A., Lagergren J., Lindblad M.* // *Gut.* – 2006. – **55**, N 11. – P. 1538–1544.
3. *Beales I. L.* // *Gastroenterol.* – 1998. – **3**. – P. 618–621.
4. *Jensen R. T.* // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* – 2006. – **98**. – P. 4–19.
5. *Lahner E., Annibale B.* // *World J. Gastroenterol.* – 2009. – **15**. – P. 5121–5128.
6. *Jianu C. S., Fossmark R., Viset T. et al.* // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2012. – **5**. – P. 1–6.
7. *Kompanets I. V., Korotkiy O. G., Karpovets T. P. et al.* // *Biopolymers and Cell.* – 2013. – **29**, N 1. – P. 64–69.
8. *Williams C., McColl K. E. L.* // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2006. – **23**. – P. 3–10.
9. *Wigg A. J., Robert-Thompson J. G., Dymock R. B.* // *Gut.* – 2001. – **48**. – P. 206–211.
10. *Loguercio C., De Simone T., Federico A. et al.* // *Am. J. Gastroenterol.* – 2002. – **97**. – P. 2144–2146.
11. *Zhang R., Brennan M.-L., Shen Z. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**. – P. 46116–46122.
12. *Borodina T., Dvorshenko K., Vakal S. et al.* // *Вісник Київ. націон. університету імені Тараса Шевченка.* – 2013. – **2**, № 64. – С. 27–31. – (Серія «Біологія»).
13. *Lichtman S. N., Sartor R. B., Keku J., Schwab J. H.* // *Gastroenterology.* – 1990. – **98**, N 2. – P. 414–423.
14. *Gäbele E., Dostert K., Hofmann C. et al.* // *J. Hepatology.* – 2011. – **55**, N 6. – P. 1391–1399.
15. *Dooley S., ten Dijke P.* // *Cell Tissue Res.* – 2012. – **347**, N 1. – P. 245–256.
16. *Giannelli G., Mazzocca A., Fransvea E. et al.* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – **1815**, N 2. – P. 214–223.
17. *Gohda E., Nakamura S., Yamamoto I., Minowada J.* // *Leuk. Lymphoma.* – 1995. – **19**. – P. 197–205.
18. *Morishita R., Aoki M., Hashiya N. et al.* // *Curr. Gene Ther.* – 2004. – **4**. – P. 199–206.
19. *Gratz S. W., Mykkanen H., El-Nezami H. S.* // *World J. Gastroenterol.* – 2010. – **16**, N 4. – P. 403–410.
20. *Дворщенко К. О., Вакал С. Є., Драницина А. С. та ін.* // *Укр. біохім. журн.* – 2013. – **85**, № 2. – С. 68–77.
21. *Vakal S. E., Dvorshchenko K. O., Dranitsina A. S. et al.* // *Biopolymers and Cell.* – 2012. – **28**, N 6. – P. 376–383.
22. *Янковский Д. С., Дымент Г. С.* // *Здоровье женщины.* – 2006. – № 3. – С. 181–188.
23. *Sutherland M. W., Learmonth B. A.* // *Free Radic. Res.* – 1997. – **27**, N 3. – P. 283–289.
24. *Nourooz-Zadeh J., Tajaddini-Sarmadi J., Wolff S. P.* // *Anal. Biochem.* – 1994. – **220**. – P. 403–409.
25. *Hashimoto S.* // *Anal. Biochem.* – 1974. – **62**, N 2. – P. 426–435.
26. *Folch J., Lees M., Stanley G. H. S.* // *J. Biol. Chem.* – 1957. – **226**. – P. 497–509.
27. *Кеймс М.* *Техника липидологии.* – М.: Мир, 1975. – 322 с.

28. *Lamba O. P., Borchman D., O'Brien P. J.* // *Biochemistry*. – 1994. – **33**. – P. 1704–1712.
29. *Гаврилов В. Б., Гаврилова А. Р., Хмара Н. Ф.* // *Лаб. дело*. – 1988. – № 2. – С. 60–63.
30. *Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г.* *Современные методы в биохимии*. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.
31. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randal R. I.* // *J. Biol. Chem.* – 1951. – **193**, N 1. – P. 265–275.
32. *Chomczynski P.* // *Anal. Biochem.* – 1987. – **162**, N 1. – P. 156–159.
33. *Konturek P. C., Brzozowski T., Pierzchalski P. et al.* // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 1998. – **12**, N 8. – P. 767–777.
34. *Modlin I., Sachs G.* / Schnetztor-Verlag Gmbh, Konstanz. – 1998. – P. 126–142.
35. *Shin J., Vagin O., Munson K. et al.* // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2008. – **65**, N 2. – P. 264–281.
36. *Dröge W.* // *Physiol. Rev.* – 2002. – **82**. – P. 47–95.
37. *Miki H., Funato Y.* // *J. Biochem.* – 2012. – **151**. – P. 255–261.
38. *Sakuma S., Kitamura T., Kuroda C. et al.* // *J. Clin. Biochem. Nutr.* – 2012. – **51**, N 1. – P. 55–60.
39. *Romagnoli M., Gomez-Cabrera M. C., Perrelli M. G. et al.* // *Free Radic. Biol. Med.* – 2010. – **49**, N 2. – P. 171–177.
40. *Jones D. P.* // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2008. – **295**. – P. C849–C868.
41. *Winczura A., Zdzalik D., Tudek B.* // *Free Radic. Res.* – 2012. – **46**, N 4. – P. 442–459.
42. *Smathers R. L., Galligan J. J., Stewart B. J., Petersen D. R.* // *Chem. Biol. Interact.* – 2011. – **192**, N 1–2. – P. 107–112.
43. *Blair I. A.* // *J. Biol. Chem.* – 2008. – **283**. – P. 15545–15549.
44. *Stark G.* // *J. Membr. Biol.* – 2005. – **205**, N 1. – P. 1–16.
45. *Дробінська О. В., Гайда Л. М., Дворщенко К. О. та ін.* // *Укр. біохім. журн.* – 2010. – **82**, № 5. – С. 85–91.
46. *Niki E.* // *Free Radic. Biol. Med.* – 2009. – **47**, N 5. – P. 469–484.
47. *Matsuzaki K.* // *Front Biosci.* – 2009. – **14**. – P. 2923–2934.
48. *Black D., Lyman S., Qian T. et al.* // *Biochimie*. – 2007. – **89**, N 12. – P. 1464–1473.
49. *Meyer C., Meindl-Beinker N. M., Dooley S.* // *Front Biosci.* – 2010. – **15**. – P. 740–749.
50. *Yu Y., Lu L., Qian X. et al.* // *Stem Cells Dev.* – 2010. – **19**, N 6. – P. 903–914.
51. *Jin S. Z., Meng X. W., Sun X. et al.* // *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.* – 2011. – **18**, N 3. – P. 397–405.
52. *Xue F. et al.* // *Gut*. – 2003. – **52**. – P. 694–700.
53. *Hata J., Ikeda E., Uno H., Asano S.* // *J. Histochem. Cytochem.* – 2002. – **50**, N 11. – P. 1461–1468.
54. *Yasuda H., Imai E., Shiota A. et al.* // *Hepatology*. – 1996. – **24**, N 3. – P. 636–642.
55. *Dooley S., ten Dijke P.* // *Free Radic. Biol. Med.* – 2010. – **48**, N 1. – P. 1–15.
56. *Абдулахад К., Фалалеева Т. М., Кухарський В. М. та ін.* // *Вісник КУ: Проблеми регуляції фізіологічних функцій*. – 2012. – **15**. – С. 4–8.
57. *Lutgendorff F., Trulsson L., van Minnen L. et al.* // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2008. – **295**, N 5. – P. 1111–1121.
58. *Carroll I. M., Andrus J. M., Bruno-Barcena J. M. et al.* // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2007. – **293**. – P. G729–G738.

Отримано 11.04.2013