



УДК 577.152.6:616.33

ВПЛИВ МУЛЬТИПРОБІОТИКА «АПІБАКТ®» НА ПРОДУКЦІЮ ІНТЕРФЕРОНУ Й АКТИВНІСТЬ 2',5'-ОЛІГОАДЕНІЛАТ-СИНТЕТАЗИ В ЛІМФОЦИТАХ ТИМУСУ ЩУРІВ ЗА УМОВ ГІПОАЦИДНОСТІ, ВИКЛИКАНОЇ ОМЕПРАЗОЛОМ

**І. В. Компанець¹, С. В. Пилипенко¹, О. Г. Короткий¹, Т. П. Карповець¹,
В. В. Нікольська¹, Л. І. Остапченко¹, Т. В. Берегова¹, Д. С. Янковський²**

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології»
вул. Володимирська, 64, Київ 01601, Україна
e-mail: i_kompanets@mail.ua

² ТОВ фірма «О. Д. Пролісок», вул. Смілянська, 11, Київ 03151, Україна

Вивчено продукцію інтерферону (ІФН) лімфоцитами тимусу щурів і активність ІФН-індукованого ферменту 2',5'-олігоаденілат-синтетази (2',5'-ОА-синтетази) за умов гіпоацидності шлункового соку, викликаній введенням омепразолу, а також за сумісної дії омепразолу та мультипробіотика «Апібакт®». Встановлено, що на фоні тривалої гіпоацидності шлункового соку продукція ІФН тимоцитами посилюється у $2,5 \pm 1,2$ рази порівняно з контролем (інтактними тваринами), при цьому активність 2',5'-ОА-синтетази знижується на $28 \pm 1,34\%$. У тимоцитах тварин із гіпоацидністю, стимульованих фітогемаглютиніном А (ФГА) (20 мкг/мл) і циклофероном (50 мкг/мл) *in vitro*, збільшується продукція ІФН й активність даного ферменту порівняно з нестимульованими клітинами цих же тварин. «Апібакт®» на тлі введення омепразолу посилює дію ФГА на продукцію ІФН та 2',5'-ОА-синтетазну активність у тимоцитах. Ймовірно, за умов гіпоацидності шлункового соку стимулюється синтез ІФН лімфоцитами тимусу, що може відбуватися внаслідок активації імунної відповіді за колонізацію шлунка умовно-патогенною мікрофлорою. «Апібакт®» проявляє імуномодуючі властивості, збільшуючи здатність лімфоцитів тимусу до синтезу ІФН у відповідь на екзогенну стимуляцію у щурів з гіпоацидністю шлункового соку.

Ключові слова: гіпоацидність, омепразол, мультипробіотики, «Апібакт®», тимоцити, інтерферон, 2',5'-олігоаденілат-синтетаза, індуктори інтерферону.

ВСТУП

Тривала гіпоацидність шлункового соку призводить до дисбактеріозу та розвитку запальних процесів у різних відділах травного тракту: ротова порожнина [1], шлунок [2], кишечник [3]. Тривале введення інгібіторів протонної помпи (ферменту H^+K^+ -АТФази плазматичної мембрани парієтальних клітин шлунка) пригнічує шлункову секрецію соляної кислоти. Соляна кислота є бактерицидним фактором, який перешкоджає розмноженню умовно-патогенної мікрофлори у шлунку. Стан гіпоацидності, який виникає, призводить до розвитку дисбактеріозу [4] і, як наслідок, до розвитку

запального процесу. Проявом його є інфільтрація лімфоцитів у слизову шлунка та секреція ними прозапальних цитокінів, а також посилення проліферації ентерохромафіноподібних клітин (ECL-клітин) фундального відділу шлунка [5].

Найбільш перспективними для корекції стану мікробіоценозу ШКТ є пробіотики 4-го покоління, а саме мультипробіотики. У літературі є дані стосовно ефективності застосування мультипробіотика «Симбітер® ацидофільний концентрований» (СИМ) під час гіпоацидності [6, 7]. Нашу увагу привернув мультипробіотик «Апі-бакт®» (АПІ), який відрізняється від СИМ наявністю 1,5%-ного спиртового екстракту прополісу. Прополіс має протибактеріальну, протигрибкову та противірусну дію, проявляє знеболювальну активність, йому притаманні антиоксидантні властивості, а також цей препарат здатний стимулювати імунітет [8].

Більшість існуючих на сьогодні пробіотиків виробляються у ліофілізованій формі, для реактивації клітин необхідний достатньо тривалий час і сприятливі умови зовнішнього середовища (які відсутні у травному каналі) [9]. Це призводить до різкого зниження пробіотичної активності препарату *in vivo*. Тому перевагою мультипробіотиків СИМ і АПІ є те, що він складається з живих, а не ліофілізованих бактеріальних клітин.

Пробіотики мають імуномодулюючі властивості: регулюють локальну та системну імунну відповідь, посилюють резистентність до мікробних патогенів, контролюють баланс продукції про- і протизапальних цитокінів тощо [10, 11]. Так, АПІ посилює неспецифічний імунітет, активує Т-клітинну ланку імунітету і пригнічує запальні реакції в кишечнику у разі дисбактеріозу за умов різних захворювань шлунково-кишкового тракту [12].

Механізми розвитку системної імунної відповіді за гіпоацидності досі остаточно не вивчені. У слизовій шлунку виникає запалення, що супроводжується посиленням продукції прозапальних цитокінів інтерферону- γ (ІФН- γ), фактора некрозу пухлин- α (TNF- α), інтерлейкіну- 1β (IL- 1β) [13], також їх вміст зростає у крові [6, 14, 15]. Залишається не дослідженою реакція клітин лімфоїдних органів (тимусу, селезінки) на запальний процес в організмі, спровокований гіпоацидністю, не з'ясовано роль у ньому інтерферону (ІФН) та індукованих ним сигнальних систем.

2',5'-олігоаденілат-синтетаза (2',5'-ОА-синтетаза) – ключовий фермент системи 2',5'-олігоаденілату (2',5'-ОА), експресія якого посилюється при дії на клітини ІФН I типу. Вона забезпечує такі його функції, як противірусний захист, контроль генної експресії, регуляція росту і проліферації клітин, імунна активація, відповідь на запалення [16]. 2',5'-ОА-синтетаза синтезує з АТФ 2',5'-ОА, які активують латентну ендорибонуклеазу (РНКазу L), що призводить до руйнування вірусної та клітинної РНК. При хронічному запаленні посилюється трансдукція сигналу ІФН I типу [17].

Виходячи з вищевикладеного, метою роботи було вивчення дії мультипробіотика АПІ на продукцію ІФН і активність 2',5'-ОА-синтетази в лімфоцитах тимусу щурів на тлі гіпоацидності у щурів, викликаній введенням противиразкового препарату омепразолу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження було проведено на білих нелінійних щурах-самцях віком до двох місяців і вагою 180–200 г, яких утримували у стандартних умовах віварію з вільним доступом до води. Проведення маніпуляцій з тваринами здійснювали згідно з принципами „Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей” (Страстбург, 1986) і Ухвали першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2001).

Тварин було розподілено на 4 групи по 10 у кожній. Тваринам 1-ї групи, які слугували контролем, вводили перорально (в/о) 0,2 мл води для ін'єкцій, тваринам 2-ї групи – перорально (п/о) вводили упродовж 28 днів мультипробіотик «Апібакт®» (АПІ) (виробництва ТОВ «О.Д. Пролісок») у дозі 0,14 мл/кг. Дозу препарату було обрано, виходячи з даних експериментальних досліджень і клінічної практики, оскільки його застосування в цій дозі було найбільш ефективним [3, 7, 12]. У тварин 3-ї групи моделювали стан гіпоацидності шлункового соку шляхом щоденного в/о введення упродовж 28 днів препарату «Омез®» (омепразол) (виробництва «SIGMA», США) у дозі 14 мг/кг, розчинений у 0,2 мл води для ін'єкцій [6]. Тваринам 4-ї групи сумісно вводили упродовж 28 днів омепразол і АПІ у дозах, вказаних вище.

Мультипробіотик АПІ – це концентрована біомаса живих клітин мультикомпонентного симбіозу 14 штамів пробіотичних бактерій: біфідобактерій (*Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. adolescentis*), лактобактерій (*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. brevis*), молочнокислих стрептококів (*Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*) і пропіоновокислих бактерій видів *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *Shermanii* з додаванням 1,5% спиртового екстракту прополісу.

Евтаназію тварин здійснювали дислокацією шийних хребців через добу після останнього введення препаратів, оскільки омепразол діє в організмі упродовж 1 доби, а метою роботи було дослідити ефекти, викликані саме тривалим введенням омепразолу, а не його безпосередньою дією. Видаляли тимус, отримували суспензію клітин шляхом перетирання через 4 шари нейлонової тканини. Тимоцити виділяли центрифугуванням отриманої суспензії за швидкості 1500 г упродовж 10 хв [18].

Кількість загиблих клітин визначали за допомогою світлової мікроскопії шляхом фарбування 0,2% трипановим синім (загиблі клітини з ушкодженою плазматичною мембраною забарвлюються у синій колір), клітини підраховували у камері Горяєва.

Виділені тимоцити щурів (5×10^6 клітин/мл) інкубували *in vitro* у 5 мл поживного середовища (DMEM/F12, 10%-ної ембріональної сироватки теляти, 2 мМ L-глутаміну, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину і канаміцину, 10 мкг/мл флуконазолу) упродовж 24 год за температури 37°C. Для індукції ІФН було обрано препарати фітогемаглютинін А (ФГА) і циклоферон. Мітогенний лектин квасолі фітогемаглютинін А (ФГА) стимулює синтез ІФН- γ та ІФН- β і використовується для стимуляції лімфоцитів в умовах культурального росту [19]. Циклоферон (10-карбоксиметил-9-акриданон) – похідне акридиноцтової кислоти, синтетичний аналог алкалоїду рослини *Cytrus grandis*, є низькомолекулярним індуктором синтезу ІФН I типу (ІФН- α і - β) Т- і В-клітинами, макрофагами, фібробластами [20]. Тимоцити інкубували з індукторами ІФН (проводили стимуляцію клітин): фітогемаглютиніном А (ФГА) (у концентрації 20 мкг/мл) і циклофероном (у концентрації 50 мкг/мл). Суспензії клітин центрифугували за швидкості 200 г упродовж 5 хв. Отриману надосадову рідину використовували для визначення титру сумарного ІФН мікрометодом за пригніченням цитопатогенної дії вірусу везикулярного стоматиту на перевивну культуру фібробластів щурів [21].

Осад тимоцитів суспендували і використовували для визначення 2',5'-ОА-синтезної активності. Тимоцити руйнували методом швидкого заморожування–розморожування в рідкому азоті й центрифугували за швидкості 10 000 г упродовж 15 хв; отриману надосадову рідину очищали на колонці ДЕАЕ-целюлоза з елюцією 0,15 М KCl. 2',5'-ОА-синтезну активність визначали спектрофотометричним методом

[22] за кількістю відновленого НАДФ, який був еквімолярним до неорганічного пірофосфату (PP_i), що утворювався в реакції синтезу 2',5'-ОА під дією 2',5'-ОА-синтетази. Для цього до складу реакційної суміші вносили UDP-глюкозу, глюкозо-1,6-дифосфат, UDP-глюкозо-пірофосфорилазу (печінка бика), фосфоглюкомутазу (м'язи кроля), глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназу (дріжджі) («SIGMA», США). У результаті супражених ферментативних реакцій, котрі ініціювалися PP_i, відновлювався НАДФ, кількість якого визначали спектрофотометрично за довжини хвилі 340 нм. Ферментативну активність виражали в нмоль PP_i / (хв×мг білка). Концентрацію білка визначали за методом Бредфорда [23].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Попередні дослідження показали, що у щурів за гіпоацидності шлункового соку, зумовленої 28-добовим введенням омепразолу, у шлунку виникають дисбіотичні зміни: збільшення контамінації транзиторною мікрофлорою та зменшення кількості лактобактерій [6]. Це супроводжувалося запаленням і гіперплазією парієтальних клітин слизової оболонки шлунка [2]. У сироватці крові зростає вміст гастрину, що свідчило про розвиток гіпергастринемії [6], та вміст прозапальних цитокінів, таких як IL-1 β , TNF- α і IFN- γ [15]. Встановлено, що мультипробіотик АПІ відновлював стан слизової оболонки товстого кишечника і нормалізував стан мікрофлори за умов гіпоацидності [24]. До того ж у разі введення АПІ нормалізувався вміст IFN- γ , який був підвищеним при дії омепразолу [6]. Було припущено, що цей мультипробіотик пригнічує запальний процес, зумовлений гіпоацидністю шлункового соку, активуючи Т-клітинну ланку імунітету.

Лімфоїдні органи, які відіграють провідну роль в імунному реагуванні, високочутливі до змін продукції цитокінів в організмі. Тому важливо дослідити їх реакцію на розвиток гіпоацидності, за якої зростає вміст прозапальних цитокінів у кров'яному руслі. У даній роботі було вивчено продукцію ІФН тимоцитами щурів зі шлунковою гіпоацидністю, спровокованою 28-добовим введенням омепразолу. Встановлено, що титр сумарного ІФН у надосадовій рідині клітинних культур тимоцитів щурів, яким вводили омепразол, зростає у 2,5 \pm 0,12 разу порівняно з контролем (клітинами інтактних тварин) (рис. 1). Титр ІФН, що секретувався тимоцитами щурів з гіпоацидністю, стимульованими індукторами ІФН (ФГА і циклофероном) *in vitro*, зростає відповідно в 1,5 \pm 0,07 разу і у 2 \pm 0,098 разу ($p < 0,05$, $n = 5$) щодо нестимульованих клітин. Слід зазначити, що для оброблених індукторами клітин тварин контрольної групи титр ІФН збільшувався щодо нестимульованих клітин більш інтенсивно: на 138 \pm 6,76% у випадку ФГА і на 163 \pm 7,99% у випадку циклоферону ($p < 0,05$, $n = 5$). Ці дані свідчать, що за умов гіпоацидності шлункового соку посилюється продукція ІФН нестимульованими тимоцитами щурів, проте пригнічується здатність лімфоцитів продукувати ІФН у відповідь на екзогенну стимуляцію (дію індукторів ІФН).

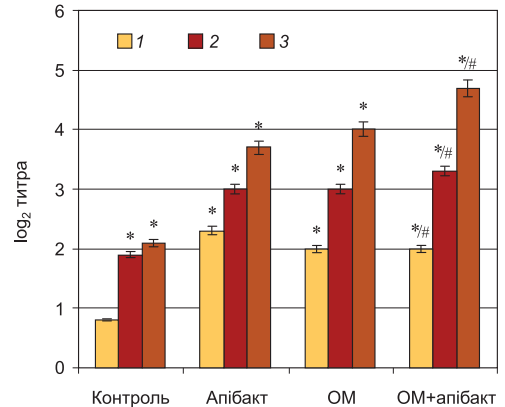
У разі введення мультипробіотика АПІ щурам контрольної групи титр ІФН, продукowanego їх лише культивованими тимоцитами, зростає на 188 \pm 9,02% ($p < 0,05$, $n = 5$) щодо контролю. У разі стимуляції цих клітин ФГА і циклофероном титр ІФН збільшувався відповідно на 30% \pm 1,47 і 61 \pm 2,89% ($p < 0,05$, $n = 5$) щодо нестимульованих клітин. У щурів, яким сумісно вводили омепразол і АПІ, продукція ІФН тимоцитами статистично достовірно не змінювалася щодо контролю. Проте продукція ІФН за дії ФГА і циклоферону посилювалася відповідно на 65 \pm 3,12% і 135 \pm 6,62% ($p < 0,05$, $n = 5$) щодо нестимульованих клітин. Отже, мультипробіотик АПІ на фоні дії омепразолу посилює секрецію ІФН у відповідь на його індуктори.

Рис. 1. Титр інтерферону (\log_2 титру) у надосадовій рідині клітинних культур тимоцитів щурів, яким упродовж 28-ми діб сумісно вводили омепразол (ОМ) (модель шлункової гіпоацидності) та мультипробіотик «Апібакт®» ($M \pm m$, $n = 5$). Лімфоцити культивували за відсутності індукторів інтерферону (1) та за присутності ФГА (2) і циклоферону (3);

* – $P < 0,05$ порівняно з контролем (нестимульовані лімфоцити тварин 1-ї групи); # – $P < 0,05$ порівняно з нестимульованими лімфоцитами тварин, яким вводили омепразол

Fig. 1. The interferon titer (titer \log_2) in supernatants of cultivated thymocytes of rats that were simultaneously treated with omeprazole (stomach hyp acidity model) and multiprobiotic “Apibact®” ($M \pm m$, $n = 5$). Lymphocytes were cultivated in the absence of interferon inducers (1) and in the presence of PHA (2) and cycloferon (3);

* – $P < 0.05$ in comparison to control (unstimulated lymphocytes of the 1st group animals); # – $P < 0.05$ in comparison to unstimulated lymphocytes of animals that were treated with omeprazole



Ми припускаємо, що за гіпоацидності шлункового соку посилюється синтез ІФН лімфоцитами тимусу щурів. Це може бути проявом активації імунної відповіді на колонізацію шлунка умовно-патогенною мікрофлорою. Ймовірно, стимуляція продукції ІФН є компенсаторною реакцією тимоцитів на запалення в організмі на тлі гіпоацидності, викликане, з одного боку, дисбактеріозом, а з іншого – підвищеними кількостями гастрину. Гістологічні дослідження показали, що у слизовій оболонці шлунка щурів, яким вводили омепразол, виникає запалення та гіперплазія [2]. Отже, умовно-патогенна мікрофлора, яка заселює ШКТ при зниженні кислотності шлункового соку, викликає запалення, синтез прозапальних цитокінів, на що реагують лімфоїдні органи, зокрема тимус. Це узгоджується з даними попередніх досліджень про підвищення відносного вмісту лімфоцитів у тимусі тварин, яким вводили омепразол, що пов'язували з посиленням проліферативних процесів [25]. Крім цього, на синтез ІФН тимоцитами можуть впливати цитокіни (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β), продукція яких змінюється при гіпоацидності [15]. Пригнічення здатності лімфоцитів тимусу до продукції ІФН у відповідь на екзогенну стимуляцію індукторами ІФН *in vitro* може свідчити про зниження стійкості організму до різних патогенів.

Ми показали, що мультипробіотик АПІ при гіпоацидності посилює здатність тимоцитів секретувати ІФН у відповідь на екзогенну стимуляцію (дію індукторів ІФН). Це свідчить про стимулювальний ефект цього препарату на системи імунного реагування. Відомо, що АПІ активує Т-клітинну ланку імунітету при введенні на тлі дисбактеріозу в дітей [12], а також викликає імуномодулюючі ефекти у разі респіраторних захворювань [26]. Активація імунної системи організму під дією пробіотичних бактерій зумовлена взаємодією структур їх плазматичної мембрани з Toll-like (Toll-подібними) рецепторами епітеліоцитів кишечника, у результаті якої посилюється продукція цитокінів лімфоцитами слизової, збільшується резистентність до мікробних патогенів, а також стимулюється клітинний і гуморальний імунітет у всьому організмі та пригнічуються запальні реакції [10].

Відомо, що нормальна мікрофлора стимулює формування імунітету не тільки до мікроорганізмів, які постійно мешкають в організмі, а й до патогенних [11]. Вона забезпечує формування у слизовій ШКТ біоплівки, що складається зі слизу, молекул секреторних імуноглобулінів А, симбіотної мікрофлори та її метаболітів, яка забезпечує захист організму від інфекцій. Зміна складу мікрофлори (зменшення кількості біфідо- і лактобактерій) при дисбактеріозі призводить до підвищення вірулентності умовно-патогенної аутофлори кишечника. Мультипробіотик АПІ нормалізує склад мікрофлори ШКТ, відновлює нормальну структуру біоплівки і тим самим усуває дисбактеріоз. Він викликає активацію імунної системи у щурів з гіпоацидністю шлункового соку, що призводить до пригнічення запалення, про що свідчить нормалізація вмісту прозапального цитокіну ІФН- γ у крові щурів (при введенні лише омепразолу його вміст зростає) [6]. Результатом протизапальної дії АПІ є виявлене нами посилення продукції ІФН при стимуляції індукторами ІФН лімфоцитів тимусу щурів із гіпоацидністю. Ймовірно, зміни імунного статусу організму під впливом АПІ впливають на функціональний стан тимусу і проявляються у посиленні здатності його лімфоцитів синтезувати ІФН у відповідь на екзогенну стимуляцію.

2',5'-ОА-синтетаза є одним із ключових ферментів, який забезпечує дію ІФН на клітини [27]. Вивчення 2',5'-ОА-синтетазної активності у лімфоцитах тимусу щурів з гіпоацидністю показало, що вона зменшується на $28 \pm 1,34\%$ щодо контролю ($p < 0,05$, $n = 10$) (рис. 2). У лімфоцитах, підданих дії ФГА та циклоферону, цей показник зростає на $40 \pm 1,88\%$ і $79 \pm 3,87\%$ щодо необроблених препаратами клітин ($p < 0,05$, $n = 10$) і перевищував контроль. При цьому зміни 2',5'-ОА-синтетазної активності й титру ІФН, продукованого цими клітинами, були односпрямованими. Слід зазначити, що підвищення активності ферменту у стимульованих індукторами тимocyтах був більш інтенсивним у контрольній групі тварин (активність зростала щодо нестимульованих клітин на $49 \pm 2,40\%$ при дії ФГА та на $84 \pm 3,95\%$ при дії циклоферону) ($p < 0,05$, $n = 10$).

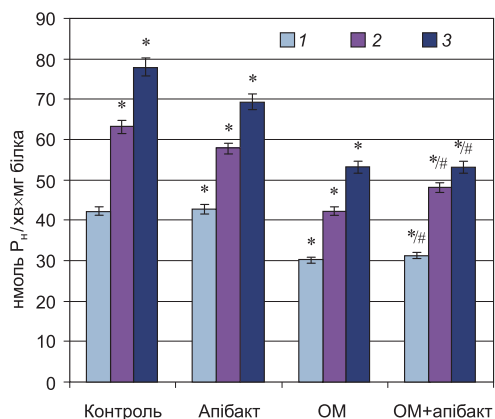


Рис. 2. 2',5'-Олігоаденілат-синтетазна активність (нмоль P_n / (хв·мг білка)) у тимocyтах щурів, яким упродовж 28-ми діб сумісно вводили омепразол (ОМ) (модель шлункової гіпоацидності) та мультипробіотик «Апібакт®» ($M \pm m$, $n = 10$). Лімфоцити культивували за відсутності індукторів інтерферону (1) та за присутності ФГА (2) і циклоферону (3);

* – $P < 0,05$ порівняно з контролем (нестимульовані лімфоцити тварин 1-ї групи); # – $P < 0,05$ порівняно з нестимульованими лімфоцитами тварин, яким вводили омепразол

Fig. 2. 2',5'-oligoadenylate-synthetase activity (nmol P_n / (min·mg of protein)) in thymocytes of rats that were simultaneously treated with omeprazole (stomach hypoacidity model) and multiprobiotic "Apibact®" ($M \pm m$, $n = 10$). Lymphocytes were cultivated in the absence of interferon iducers (1) and in the presence of PHA (2) and cycloferon (3);

* – $P < 0.05$ in comparison to control (unstimulated lymphocytes of the 1st group animals); # – $P < 0.05$ in comparison to unstimulated lymphocytes of animals that were treated with omeprazole

У щурів контрольної групи, які споживали мультипробіотик АПІ, 2',5'-ОА-синтезна активність у нестимульованих індукторами тимоцитах не змінювалась порівняно з контролем. Проте у разі стимуляції їх ФГА та циклофероном вона зростала відповідно на $35 \pm 1,72\%$ і $62 \pm 3,04\%$ ($p < 0,05$, $n = 10$) щодо нестимульованих клітин. Сумісне введення щурам омепразолу й АПІ також не впливало на активність ферменту: вона не відрізнялась від такої у групи тварин, яким вводили тільки омепразол. 2',5'-ОА-синтезна активність в індуктованих *in vitro* ФГА та циклофероном тимоцитах зростала на $54 \pm 2,59\%$ і $70 \pm 3,43\%$ ($p < 0,05$, $n = 10$) щодо нестимульованих препаратами клітин. Як і у випадку тварин, яким вводили тільки омепразол, активність ферменту і титр ІФН за дії індукторів змінювались односпрямовано.

Отже, нами встановлено, що за гіпоацидності шлункового соку, викликаной омепразолом, підвищення продукції ІФН тимоцитами супроводжується зниженням 2',5'-ОА-синтезної активності в цих клітинах. Можливо, при цьому ІФН індукує в клітинах інші ферментні системи (наприклад, каскад dsRNA-залежної портеїнкінази), не впливаючи на систему 2',5'-ОА. Не виключено також, що запальний процес в організмі призводить до індукції синтезу ІФН не I типу, а II (зокрема, ІФН- γ), не здатного стимулювати 2',5'-ОА-синтезу. На користь цього свідчать дані про підвищення вмісту ІФН- γ у крові щурів, які підлягали дії омепразолу [6].

Це припущення також пояснює факт односпрямованої дії омепразолу й АПІ на продукцію ІФН тимоцитами. Оскільки у даній роботі було визначено титр сумарного ІФН за його антивірусною активністю без ідентифікації його підтипів, цілком ймовірно, що за дії омепразолу стимулюється синтез ІФН II типу (а саме ІФН- γ), що є проявом запального процесу. Цей узгоджується з тим, що 2',5'-ОА-синтезна активність у тимоцитах тварин з гіпоацидністю не підвищується. При дії індукторів ІФН (ФГА і циклоферону) *in vitro* на тимоцити тварин, яким вводили АПІ на тлі гіпоацидності, може стимулюватися синтез ІФН I типу (наприклад, ІФН- α і - β), при цьому АПІ посилює здатність клітин до його продукції.

Як за гіпоацидності шлункового соку, так і у разі введення на її тлі мультипробіотика АПІ спостерігається подібна тенденція змін продукції ІФН та 2',5'-ОА-синтезної активності у відповідь на індуктори (ФГА і циклоферон) *in vitro*. При введенні АПІ тваринам із шлунковою гіпоацидністю обидва показники збільшуються. Це свідчить про те, що даний пробіотичний препарат збільшує здатність лімфоцитів тимусу до синтезу ІФН при дії зовнішніх стимулів і вказує на можливу активацію системи 2',5'-ОА. Ймовірно, імуномодулюючі властивості цього препарату реалізуються через активацію Т-клітинного імунітету, що впливає на сигнальні каскади, які індукуються цитокінами, не тільки у слизовій шлунка, а й у лімфоїдному органі – тимусі.

ВИСНОВКИ

1. За умов гіпоацидності шлункового соку, викликаной 28-добовим введенням омепразолу, у $2,5 \pm 1,2$ разу стимулюється порівняно з контролем (лімфоцитами інтактним тварин) продукція ІФН нестимульованими тимоцитами щурів, що супроводжується зниженням 2',5'-ОА-синтезної активності на $28 \pm 1,34\%$ у цих клітинах. Це може бути проявом реакції тимоцитів на запалення в організмі, викликане дисбактеріозом.
2. У разі введення омепразолу пригнічуються порівняно з контролем продукція ІФН тимоцитами та 2',5'-ОА-синтезна активність у відповідь на стимуляцію клітин індукторами ІФН (ФГА і циклофероном) *in vitro*, що вказує на

пригнічення здатності лімфоцитів продукувати ІФН у разі екзогенної стимуляції. Це може свідчити про зниження стійкості організму до різних патогенів.

3. Введення мультипробіотика «Апібакт®» сумісно з омепразолом посилює продукцію ІФН тимоцитами та викликає стимуляцію 2',5'-олігоаденілат-синтезазної активності у відповідь на дію індукторів ІФН (ФГА) *in vitro*, що свідчить про посилення здатності цих клітин синтезувати ІФН у відповідь на екзогенну стимуляцію і стимуляцію імунної відповіді.
4. Як при дії омепразолу, так і при сумісному введенні з ним мультипробіотика «Апібакт®» спостерігається подібна тенденція змін продукції ІФН та 2',5'-олігоаденілат-синтезазної активності у відповідь на індуктори ІФН (ФГА та циклоферону), що вказує на можливе залучення системи 2',5'-ОА до реакції лімфоцитів тимусу на запальний процес, викликаний гіпоацидністю.

1. Берегова Т.В., Непорада К.С., Цирюк О.І. та ін. Зміни у функціонуванні слизового бар'єру проксимального відділу травного тракту в умовах тривалої гіпоацидності та їх корекція. **Доповіді національної Академії Наук України**, 2010; 8: 163–166.
2. Вороніна О.К., Гришук В.М. Динаміка змін в слизовій оболонці шлунка щурів при гіпергастринемії різної тривалості. В кн.: **Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології**: тези доповідей III Всеукр. наук. конф. (м. Київ, 4–6 жовтня 2006 р.). Київ, 2006: 24–25.
3. Цирюк О.І., Берегова Т.В. Вплив мультипробіотика “Симбітер ацидофільний” концентрований на стан мікроекології шлунка у щурів. **Проблеми екол. та мед. генетики і клініч. імунології**, 2007; 3–4(78–79): 62–70.
4. Vesper B.J., Jawdi A., Altman K.W. et al. The effect of proton pump inhibitors on the human microbiota. **Curr Drug Metab**, 2009; 10(1): 84–89.
5. Ali T., Roberts D.N., Tierney W.M. Long-term safety concerns with proton pump inhibitors. **The American Journal of Medicine**, 2009; 122(10): 986–903.
6. Короткий О., Пилипенко С., Цирюк О. та ін. Вплив мультипробіотиків на вміст інтерферону-гамма в сироватці крові щурів за умов тривалої гіпоацидності. **Вісник Київ. нац. ун-ту. Біологія**, 2009; 54: 47–49.
7. Радчук О.М., Короткий О.Г., Цирюк О.І. та ін. Порівняльна характеристика впливу мультипробіотиків «Симбітер® ацидофільний» концентрований та «Апібакт®» на морфометричні показники слизової оболонки товстої кишки щурів за умов тривалої гіпергастринемії. **Вестник морфології**, 2009; 15(1): 7–12.
8. Sforcin J.M., Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **J. Ethnopharmacol**, 2011; 133(2): 253–260.
9. Янковский Д.С. **Микробная экология человека: современные возможности ее поддержания и восстановления**. К.: Эксперт АТД, 2005. 362 с.
10. Hemarajata P., Versalovic J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. **Therap. Adv. Gastroenterol**, 2013; 6(1): 39–51.
11. Isolauri E., Sutas Y., Kankaanpaa P. et al. Probiotics: effects on immunity. **Am. J. Clin. Nutr**, 2001; 73(suppl): 444S–50S.
12. Шадрін О.Г., Муквіч О.М., Лисяна Т.О. Порушення мікробіоценозу кишечника та його корекція при гастроентерологічних захворюваннях дітей раннього віку. **Здоров'я жінщини**, 2008; 3(34): 171–175.
13. Kang W., Rathinavelu S., Samuelson L.C., Merchant J.L. Interferon gamma induction of gastric mucous neck cell hypertrophy. **Lab. Invest**, 2005; 85(5): 702–715.
14. Короткий О.Г., Карповець Т.П., Пилипенко С.В. та ін. Концентрація фактора некрозу пухлин альфа в сироватці крові щурів з тривалою гіпоацидністю за умов введення мультипробіотиків. **Медична хімія**, 2009; 11(4): 89–91.
15. Korotky O., Karpovets T., Pilipenko S. et al. Proinflammatory cytokines concentrations in blood serum of rats with the long-term suppression of gastric secretion of hydrochloric acid in

- conditions of injection of probiotic. **35th FEBS Congress**, Goteborg (Gothenburg), Sweden, June 26 – July 1, 2010 Goteborg, 2010: 65–66.
16. *Hovanessian A.G.* On the discovery of interferon-inducible, double-stranded RNA activated enzymes: the 2'-5'-oligoadenylate synthetases and the protein kinase PKR. **Cytokine Growth Factor Rev**, 2007; 18(5–6): 351–361.
 17. *Lee P.Y., Li Y., Kumagai Y.* et al. Type I interferon modulates monocyte recruitment and maturation in chronic inflammation. **Am. J. Pathol**, 2009; 175(5): 2023–2033.
 18. *Морозов В.Г., Хавинсон В.Х.* Иммунологическая функция тимуса. **Успехи совр. биологии**, 1985; 97(1): 36–49.
 19. *Vaquero C., Sanceau J., Weissenbach J.* et al. Regulation of human gamma-interferon and beta-interferon gene expression in PHA-activated lymphocytes. **J. Interferon Res**, 1986; 6(2): 161–170.
 20. *Романцов М.Г., Ершов Ф.И., Коваленко А.Л.* Циклоферон в лечении инфекционных заболеваний. **Антибиотики и химиотерапия**, 2008; 53(3–4): 36–45.
 21. *Stewart W.E.* In: **Interferon systems**. Vienna/New York: Springer, 1979.
 22. *Justesen J., Kjeldgaard N.O.* Spectrophotometric pyrophosphate assay of 2',5'-oligoadenylate synthetase. **Anal. Biochem**, 1992; 207(1): 90–93.
 23. *Шоно Н.И., Баскаева Е.М.* Метод определения белка по Бредфорду: область применения, преимущества, недостатки. **Лабораторное дело**, 1980; 4: 4–7.
 24. *Радчук О., Карпезо Н., Рибальченко В.* Морфофункціональні ефекти пролінвмісних пептидів, мультипробіотиків і похідних малеїміду та дигідропіролу за умов кислотно-залежних захворювань органів травлення. **Вісник Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій**, 2012; 15: 8–10.
 25. *Короткий О.Г., Пилипенко С.В., Компанець І.В., Остапченко Л.І.* Реакція лімфоїдних органів щурів на введення мультипробіотика «Симбітер® ацидофільний» концентрованої за умов тривалого зниження шлункової секреції соляної кислоти. **Вісник проблем біології і медицини**, 2010; 3: 55–60.
 26. *Антипкин Ю.Г., Радченко Н.А.* Влияние пробиотика «апибакт» на состояние биоценоза кишечника и иммунитета у детей. **Современная педиатрия**, 2011; 3(37): 149–153.
 27. *Sen G.C., Sarkar S.N.* The interferon-stimulated genes: targets of direct signaling by interferons, double-stranded RNA, and viruses. **Curr. Top. Microbiol. Immunol**, 2007; 316: 233–250.

THE EFFECT OF MULTIPROBIOTIC “APIBACT®” ON INTERFERON PRODUCTION AND 2',5'-OLIGOADENYLATE SYNTHETASE ACTIVITY IN RAT THYMUS LYMPHOCYTES UNDER HYPOACIDITY EVOKED BY OMEPRAZOLE INJECTION

I. V. Kompanets¹, S. V. Pilipenko¹, A. G. Korotkiy¹, T. P. Karpovets¹, V. V. Nikolska¹, L. I. Ostapchenko¹, T. V. Beregova¹, D. S. Yankovskiy²

¹ Department of Biochemistry of Educational and Scientific Centre “Institute of Biology” Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64/13, Volodymyrska St., Kyiv 01601, Ukraine
e-mail: i_kompanets@mail.ua

² Co Ltd “Prolisok”, 11, Smilyanska St., Kyiv 03151, Ukraine

The interferon (IFN) production by rat thymus lymphocytes and the activity of IFN-induced 2',5'-oligoadenylate synthetase (2',5'-OA-synthetase) in these cells were studied at hypoacidity of gastric juice evoked by omeprazole injection and also at combined omeprazol and multiprobiotic “Apibact®” treatment. The IFN production by thymocytes of rats with hypoacidity of gastric juice was shown to increase by 2.5 ± 1.2 times in comparison to control (intact animals), the 2',5'-OAS activity decreased by $28 \pm 1.34\%$. Both the IFN production and enzyme activity were increased comparative to unstimulated cells in response to IFN inducers – phytohemagglutinin A (PHA) (20 $\mu\text{g/ml}$) and cycloferon

(50 µg/ml) treatment *in vitro*. Administration of "Apibact®" in parallel with omeprazole administration, led to amplification of the PHA action on IFN production and 2',5'-OAS activity in thymocytes. Probably, the IFN synthesis by thymocytes is stimulated under hypoacidity of gastric juice. It may be a result of activation of immune response to opportunistic microflora colonization of stomach. "Apibact®" exhibit immunomodulatory properties, amplifying the ability of thymocytes to synthesize IFN in response to exogenous stimulation in rats with hypoacidity of gastric juice.

Keywords: hypoacidity, omeprazol, multiprobitics, "Apibact®", thymocytes, 2',5'-oligoadenylate synthetase, interferon inducers.

ВЛИЯНИЕ МУЛЬТИПРОБИОТИКА «АПИБАКТ®» НА ПРОДУКЦИЮ ИНТЕРФЕРОНА И АКТИВНОСТЬ 2',5'-ОЛИГОАДЕНИЛАТ-СИНТЕТАЗЫ В ЛИМФОЦИТАХ ТИМУСА КРЫС ПРИ ГИПОАЦИДНОСТИ, ВЫЗВАННОЙ ОМЕПРАЗОЛОМ

**I. В. Компанец¹, С. В. Пилипенко¹, А. Г. Короткий¹, Т. П. Карповец¹,
В. В. Никольская¹, Л. И. Остапченко¹, Т. В. Береговая¹, Д. С. Янковский²**

¹ Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,
УНЦ «Институт биологии», ул. Владимирская, 64, Киев 01601, Украина
e-mail: i_kompanets@mail.ua

² ТОВ фирма «О. Д. Пролісок», ул. Смелянская, 11, Киев 03151, Украина

Изучена продукция интерферона (ИФН) лимфоцитами тимуса крыс и активность ИФН-индуцированного фермента 2',5'-олигоаденилат-синтетазы (2',5'-ОА-синтетазы) в этих клетках при гипоацидности желудочного сока, вызванной введением омепразола в течение 28 дней, а также при совместном действии омепразола и мультипробиотика «Апибакт®». Обнаружено, что на фоне длительной гипоацидности желудочного сока продукция ИФН тимоцитами усиливается в $2,5 \pm 1,2$ раза в сравнении с контролем, при этом активность 2',5'-ОА-синтетазы в них уменьшается на $28 \pm 1,34\%$. В тимоцитах животных с гипоацидностью, стимулированных индукторами ИФН – фитогемаглютинином А (ФГА) (20 мкг/мл) и циклофероном (50 мкг/мл) *in vitro*, увеличиваются продукция ИФН и активность данного фермента сравнительно с нестимулированными клетками этих же животных. «Апибакт®» на фоне введения омепразола усиливал действие ФГА на продукцию ИФН и 2',5'-олигоаденилат-синтетазную активность в тимоцитах. Вероятно, в условиях гипоацидности желудочного сока стимулируется синтез ИФН лимфоцитами тимуса, что может происходить вследствие активации иммунного ответа на колонизацию желудка условно-патогенной микрофлорой. «Апибакт®» проявляет иммуномодулирующие свойства, увеличивая способность лимфоцитов тимуса к синтезу ИФН в ответ на экзогенную стимуляцию у крыс с гипоацидностью желудочного сока.

Ключевые слова: гипоацидность, омепразол, мультипробиотики, «Апибакт®», тимоциты, интерферон, 2',5'-олигоаденилат-синтетаза, индукторы интерферона.

Одержано: 29.04.2013