

УДК 616.33-022.44-085+615.331

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИСЕКРЕТОРНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МУЛЬТИШТАМНОГО ПРОБІОТИКА ЗА УМОВ ДІЇ СТРЕСУ

Вірченко О.В., Фалалєєва Т.М., Берегова Т.В., Янковський Д.С.

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
E-mail: ovirchenko@gmail.com*

Отримані результати свідчать, що за одразу після дії 3-годинного водно-імобілізаційного стресу зростала базальна та стимульована гістаміном (3 мг/кг, внутрішньоочеревино) кисла шлункова секреція. В наступні 3 доби секреція гідрохлоридної кислоти поступово відновлювалася до рівня інтактних щурів. Встановлено, що введення мультиштамного пробіотика ($1,4 \cdot 10^{10}$ КУО/кг, перорально) зменшувало базальну та стимульовану секрецію гідрохлоридної кислоти до показників інтактних щурів. Антисекреторні властивості пробіотиків, підтверджені даними дослідження, є одним з механізмів стрес-протективної дії пробіотичних штамів та їх профілактично-лікувального впливу на стрес-індуковані ерозивно-виразкові ураження в шлунку.

Ключові слова: стрес, кисла шлункова секреція, мультиштамний пробіотик, ерозивно-виразкові ураження.

ВСТУП

Сьогодні в науковому світі питання пошуку нетоксичних гастропротекторних засобів природного походження є актуальним, враховуючи великий відсоток рецидивів виразки шлунка у хворих, для яких застосовували класичну схему лікування даної патології, а також нечутливості окремих пацієнтів до антисекреторних препаратів [1]. Незалежними лабораторіями отримані дані щодо профілактичного та лікувального впливу пробіотичних штамів на виразкоутворення в шлунку на моделях щурів [2-7]. Проте погляди на механізми такої дії залишаються неоднозначними. Окремі дослідження показали, що бактерії, особливо роду *Lactobacillus*, швидко колонізують слизову оболонку шлунка (СОШ) після утворення виразки [3, 8]. Було виявлено, що пробіотичні штами зменшують апоптоз клітин по відношенню до проліферації і стимулюють ангиогенез в стінці шлунка [3]. Dharmani та співавт. (2013) засвідчили ефективність пробіотичної суміші 8 штамів VSL#3 у лікуванні виразки СОШ та підтвердили дані про стимуляцію ангиогенезу в СОШ за умов виразкоутворення [5].

В наших попередніх дослідженнях був встановлений лікувальний ефект мультиштамного пробіотика (МП) «Симбітер[®] ацидофільний концентрований» на виразкоутворення в СОШ, викликане стресом [9]. Відомо, що за умов стресу зростає секреція гідрохлоридної кислоти в шлунку, яка є агресивним уражуючим фактором по відношенню до СОШ [10]. В роботах, присвячених ефектам пробіотиків на ураження в шлунку, не було приділено уваги вивченню антисекреторних

властивостей пробіотичних штамів. Тому метою даної роботи було з'ясувати, вплив МП на кислотний фактор виразкоутворення у щурів за умов дії стресу.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Схема експерименту

Дослідження проведені на 48 щурах-самцях з дотриманням нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 року, Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі. Тварин утримували в умовах акредитованого віварію згідно зі «Стандартними правилами по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)». Прилади, що використовувалися для наукових досліджень, підлягали метрологічному контролю.

Тварини були поділені на 8 груп по 6 щурів у кожній (табл.1).

Таблиця 1

Розділення щурів на дослідні групи

№ груп	Кількість лікувальних введень	Речовина, яку вводили	Тривалість (год) між нанесенням стресу і вимірюванням кислоти шлункової секреції
1	—	—	інтактні щури (не піддавалися стресу)
2	—	—	стрес-контроль (досліджували кислоту шлункову секрецію одразу після стресу)
3	2	вода	24
4	2	мультиштамний пробіотик	24
5	4	вода	48
6	4	мультиштамний пробіотик	48
7	6	вода	72
8	6	мультиштамний пробіотик	72

Щури були піддані дії 3-годинного водно-імобілізаційного стресу (ВІС) за Такагі та співавт., 1964 [11] і 1976 [12]. За добу до початку досліду щурів не годували, але вони мали вільний доступ до води. Для імобілізації щурів поміщали в металеві перфоровані камери, які опускали вертикально у воду на 3 години так, щоб рівень води досягав яремної ямки щура. Температура води становила 22-23°C.

Після стресу тваринам 3-8 груп вводили воду або водний розчин МП перорально (*per os*) двічі на добу в об'ємі 0,5 мл/200г. Введення починали через 1 годину після закінчення 3-годинного ВІС. МП вводили у дозі 140 мг/кг ($1,4 \cdot 10^{10}$

КУО/кг). В якості мультикомпонентного пробіотика був використаний «Симбітер® ацидофільний концентрований», у складі якого 14 пробіотичних штамів родів *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, які знаходяться в мутуалістичній взаємодії.

Дослідження кислотої шлункової секреції.

У тварин всіх груп вимірювали кислоту шлункову секрецію методом перфузії ізольованого шлунку за Гхошем та Шільдом [13, 14]. Щурів наркотизували уретаном [15] дозою 1,15 г/кг маси внутрішньоочеревино (в/о). Виконували трахеотомію, після чого робили лапаротомію по серединній лінії очеревини. З черевної порожнини діставали шлунок, знаходили дванадцятипалу кишку та нижче пілоричного сфінктера підводили лігатуру. Потім через стравохід вводили в шлунок ввідний катетер, по якому подається перфузійний розчин (NaCl, 0,9%, t=37°C), фіксували його на рівні розрізу трахеї. Робили розріз на дванадцятипалій кишці, через який в шлунок вводився ще один катетер – вивідний. Його фіксували трохи нижче пілоричного сфінктера і вище розрізу дванадцятипалої кишки. Ввідний катетер приєднували до перистальтичного насосу НП-1, за допомогою якого перфузійний розчин подавався в шлунок з постійною швидкістю (17 мл за 10 хвилин). Вивідний катетер приєднувався до колектора фракцій, за допомогою якого автоматично збиралися 10-хвилинні проби перфузату впродовж всього дослідження. Впродовж 120 хв збирали проби для визначення базальної секреції, після чого вводили гістамін у дозі 3 мг/кг (в/о) та продовжували відбирати 10-ти хвилинні фракції перфузату, ще впродовж 120 хв.

Визначали рівень базальної і стимульованої секреції кислоти методом титрування гідроксидом натрію за допомогою рН-метра. Прилад вмикали в електромережу за 30 хвилин до початку вимірювань. Мікробюретку заповнювали титрувальним розчином. Для визначення кислотності шлункового соку був використаний 0,01н NaOH. Титрування проводили наступним чином. В титрувальний стакан наливали отриманий в 10-хвилинній пробі перфузат. Стакан після внесення в нього магніту ставили на електромагнітну мішалку, включали мішалку, і в стакан обережно опускали електроди для рН-метрії, повністю занурюючи їх активну частину у воду. Реєстрували рН досліджуваного розчину. Після чого його титрували лугом до рН 7,0. Визначали об'єм лугу, що витратився на титрування об'єму шлункового соку, внесеного в стакан, після чого розраховували дебіт кислоти в мікромолях в шлунковому соці, виділеному за 10 хвилин. Просумувавши дебїти кислоти в кожній 10-хвилинній пробі, вимірювали кількість кислоти, що виділилася шлунком впродовж дослідження.

Статистична обробка результатів

Статистична обробка даних здійснювалася у пакеті програм “Statistica 8.0”. Для аналізу виду розподілу даних був використаний W критерій Шапіро-Уїлка. Оскільки отримані дані були розподілені за нормальним законом, то були використані параметричні методи порівняння вибірок. Застосований критерій Левана, для оцінки рівності дисперсій, і t-критерій Стьюдента для незалежних

вибірок. Розраховували середнє значення (M) і стандартну похибку середнього (m). Значущими вважали відмінності при $p \leq 0,05$ [16].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що у інтактних щурів дебіт кислоти становив $27,8 \pm 5,5$ мкмоль/120 хв. Отримані результати узгоджуються з даними інших дослідників [17]. У групах щурів, яких було піддано дії 3-годинного холодового ВІС було виявлено зростання базальної шлункової секреції кислоти. Найбільш значуще збільшення дебіту гідрохлоридної кислоти спостерігалось одразу після нанесення стресу. В групі тварин секрецію, у яких досліджували одразу після дії стресу (стрес-контроль), дебіт становив $82,5 \pm 11,9$ мкмоль/120 хв, тобто спостерігалось зростання кислоти секреції в шлунку на 197% ($p < 0,001$) за умов дії стресу (рис. 1). Стимулюючий вплив стресу на секрецію гідрохлоридної кислоти показаний і в інших дослідженнях [10]. Механізмом даного ефекту є посилення тонічної активності блукаючого нерва за умов нервово-м'язового напруження, викликаного стресовим чинником [18].

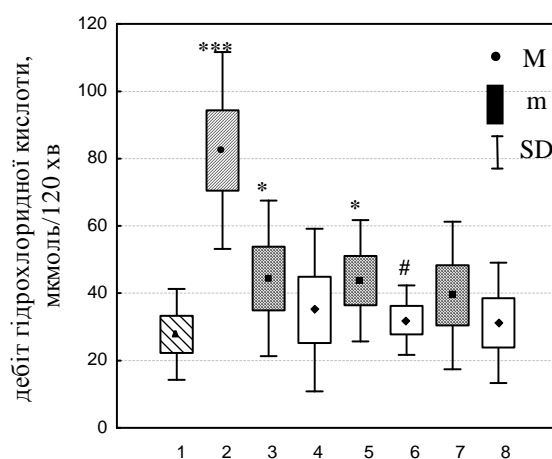


Рис. 1. Базальна секреція гідрохлоридної кислоти в шлунку щурів після нанесення водно-імобілізаційного стресу та за умов лікувального введення мультиштамного пробіотика ($n=6$ в кожній групі): 1 – інтактний контроль; 2 – стрес-контроль; 3, 5, 7 – через 24, 48, 72 години після стресу у щурів, яким вводили воду; 4, 6, 8 – через 24, 48, 72 години після стресу у щурів, яким вводили мультиштамний пробіотик. *, *** – $p < 0,05$, $p < 0,001$, порівняно з інтактним контролем, # – $p < 0,05$, порівняно з відповідною групою щурів, яким вводили воду.

Вже через 24 години після ВІС секреція гідрохлоридної кислоти зменшувалася на 46,1% ($p < 0,001$) порівняно зі стрес-контролем. Через 48 та 72 години після стресу – на 47% ($p < 0,001$) і 52,3% ($p < 0,001$) відповідно. При цьому дебіт гідрохлоридної

кислоти у групах щурів, яким вводили воду після стресу, через 24 та 48 годин залишався вищим на 60% ($p < 0,05$) та 57,3% ($p < 0,05$) порівняно з групою інтактних тварин. Через 72 години після ВІС секреція гідрохлоридної кислоти у щурів, що отримували воду, значущо не відрізнялася від рівня інтактного контролю, хоча тест Левена показав відмінність дисперсій у даних груп тварин, що свідчить про підвищену секрецію кислоти у окремих тварин порівняно з контролем.

У тварин, яким вводили МП, секреція кислоти була значущо меншою через 24, 48 та 72 години після ВІС порівняно з групою стрес-контролю на 57,5% ($p < 0,001$), 61,1% ($p < 0,001$) і 62,1% ($p < 0,001$) відповідно. Встановлено, що якщо при введенні води у перші 2 доби після нанесення стресу, кисла шлункова секреція була більшою порівняно з інтактним контролем, то введення МП відновлювало секрецію кислоти до рівня інтактного контролю. Значущі відмінності між групами, яким вводили воду і МП, були виявлені на 2 добу після нанесення стресу. Рівень базальної секреції кислоти у групі щурів, яким вводили МП, був нижчим на 26,8% ($p < 0,05$), ніж у тварин, яким вводили воду (рис. 1).

При введенні гістаміну секреція гідрохлоридної кислоти у інтактних щурів значущо зростала в 1,92 рази ($p < 0,001$) порівняно з базальним рівнем і складала $51,4 \pm 9$ мкмоль/120 хв (рис. 2).

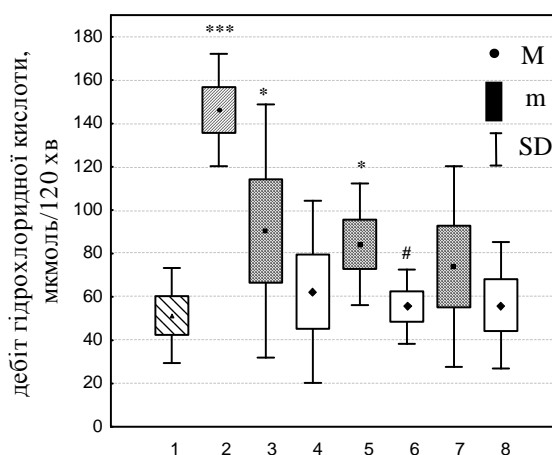


Рис. 2. Стимульована гістаміном (3 мг/кг, в.о.) секреція гідрохлоридної кислоти в шлунку щурів після нанесення водно-імобілізаційного стресу та за умов лікувального введення мультиштамного пробіотика ($n=6$ в кожній групі): 1 – інтактний контроль; 2 – стрес-контроль; 3, 5, 7 – через 24, 48, 72 години після стресу у щурів, яким вводили воду; 4, 6, 8 – через 24, 48, 72 години після стресу у щурів, яким вводили мультиштамний пробіотик. *, *** – $p < 0,05$, $p < 0,001$, порівняно з інтактним контролем, # – $p < 0,05$, порівняно з відповідною групою щурів, яким вводили воду.

Стимульована секреція гідрохлоридної кислоти одразу після нанесення стресу складала $146,2 \pm 25,9$ мкмоль/120 хв, що перевищувало показники інтактного контролю в 2,86 рази ($p < 0,001$) (рис. 2).

Через 24, 48 та 72 години після ВІС в групах щурів, яким вводили воду, стимульована секреція гідрохлоридної кислоти була меншою, ніж у групі стрес-контролю на 38,5% ($p < 0,05$), 42,7% ($p < 0,001$), 49,6% ($p < 0,001$) (рис. 2).

При введенні МП стимульована секреція гідрохлоридної кислоти через 1, 2 та 3 доби після стресу не відрізнялася від рівня інтактного контролю, хоча тест Левена показав відмінність дисперсій в інтактному контролі та у тварин через 24 години після ВІС, що свідчить про підвищену секрецію кислоти у окремих тварин порівняно з контролем. Значущі відмінності між групами, яким вводили воду і МП, були виявлені на 2 добу після нанесення стресу. Рівень стимульованої секреції кислоти у групі щурів, яким вводили МП, був нижчим на 34,1% ($p < 0,05$), ніж у тварин, яким вводили воду (рис. 2).

Таким чином, отримані результати свідчать про відновлення секреції кислоти до показників контролю при введенні МП, що підтверджує антисекреторний вплив пробіотичних штамів за умов стресу. Подібні результати були отримані Бобровою та співавт. (2012), які встановили нормалізуючий вплив пробіотика «Біогайя» на кислотоутворюючу функцію у дітей з хронічним гастродуоденітом [19]. Одним з механізмів впливу МП може бути утворення коротколанцюгових жирних кислот, які є фізіологічно активними речовинами. Дані літератури свідчать, що вони після всмоктування в кров знижують тонічну активність блукаючих нервів, внаслідок чого знижується секреція кислоти у шлунку. Це створює сприятливі умови для гоєння ерозивно-виразкових уражень слизової оболонки шлунка [20].

ВИСНОВКИ

1. МП знижував базальну та стимульовану гістаміном секрецію гідрохлоридної кислоти після стресу до рівня інтактних щурів.
2. Антисекреторні властивості МП є одним з механізмів його лікувального ефекту на виразкоутворення в слизовій оболонці шлунка, викликане стресом.

Список літератури

1. Arakawa T.. Quality of ulcer healing in gastrointestinal tract: its pathophysiology and clinical relevance / T. Arakawa, T. Watanabe, T. Tanigawa [et al.] // *World J Gastroenterol.* – 2012– Vol.18, № 35. – P.4811-4822.
2. Konturek P. C. Probiotic bacteria *Escherichia coli* strain Nissle 1917 attenuates acute gastric lesions induced by stress / P. C. Konturek, Z. Sliwowski, J. Koziel [et al.] // *J Physiol Pharmacol.* – 2009. – Vol.60 Suppl 6, № – P.41-48.
3. Lam E. K. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG enhances gastric ulcer healing in rats / E. K. Lam, L. Yu, H. P. Wong [et al.] // *Eur J Pharmacol.* – 2007. – Vol.565, № 1-3. – P.171-179.
4. Senol A. Effect of probiotics on aspirin-induced gastric mucosal lesions / A. Senol, M. Isler, A. G. Karahan [et al.] // *Turk J Gastroenterol.* – 2011. – Vol.22, № 1. – P.18-26.
5. Dharmani P. The probiotic mixture VSL#3 accelerates gastric ulcer healing by stimulating vascular endothelial growth factor / P. Dharmani, C. De Simone, K. Chadee // *PLoS One.* – 2013. – Vol.8, № 3. – P.e58671.

6. Singh P. K. Entrapment of *Lactobacillus acidophilus* into alginate beads for the effective treatment of cold restraint stress induced gastric ulcer / P. K. Singh, P. K. Deol, I. P. Kaur // *Food Funct.* – 2011. – Vol.3, № 1. – P.83-90.
7. Singh P. K. Synbiotic (probiotic and ginger extract) loaded floating beads: a novel therapeutic option in an experimental paradigm of gastric ulcer / P. K. Singh, I. P. Kaur // *J Pharm Pharmacol.* – 2012. – Vol.64, № 2. – P.207-217.
8. Elliott S. N. Bacteria rapidly colonize and modulate healing of gastric ulcers in rats / S. N. Elliott, A. Buret, W. McKnight [et al.] // *Am J Physiol.* – 1998. – Vol.275, № 3 Pt 1. – P.G425-432.
9. Вірченко О.В. Дослідження лікувально-профілактичного впливу мультипробіотика «Симбітер» при розвитку гострих уражень в слизовій оболонці шлунка щурів / О. В. Вірченко, Т. В. Берегова, О. І. Цирюк // *Вісник проблем біології і медицини.* – 2010. – № 1. – С.41-46
10. Li Y.M. Dynamic functional and ultrastructural changes of gastric parietal cells induced by water immersion-restraint stress in rats / Y. M. Li, G. M. Lu, X. P. Zou [et al.] // *World J Gastroenterol.* – 2006. – Vol.12, № 21. – P.3368-3372.
11. Takagi K. Studies on the Drugs for Peptic Ulcer. A Reliable Method for Producing Stress Ulcer in Rats / K. Takagi, Y. Kasuya, K. Watanabe // *Chem Pharm Bull (Tokyo).* – 1964. – Vol.12, № – P.465-472.
12. Takeuchi K. A new model of stress ulcer in the rat with pylorus ligation and its pathogenesis / K. Takeuchi, S. Okabe, K. Takagi // *Am J Dig Dis.* – 1976. – Vol.21, № 9. – P.782-788.
13. Ghosh M.N. Continuous recording of acid gastric secretion in the rat / M. N. Ghosh, H. O. Schild // *Br J Pharmacol Chemother.* – 1958. – Vol.13, № 1. – P.54-61.
14. Goel R.K. Effect of graded doses of methysergide on basal and pentagastrin stimulated gastric secretion in anaesthetised rats / R. K. Goel, R. N. Maiti, S. K. Bhattacharya // *Indian J Exp Biol.* – 1996. – Vol.34, № 2. – P.115-117.
15. Maggi C.A. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 1: General considerations / C. A. Maggi, A. Meli // *Experientia.* – 1986. – Vol.42, № 2. – P.109-114.
16. Реброва Ю.О. Статистический анализ медицинских данных / Ю. О. Реброва // – *МедиаСфера*, 2012 – 312 с.
17. John T.A. Effect of the aqueous extract of *entandrophragma utile* bark on gastric acid secretion in ghosh and schild rat preparations / T. A. John, A. O. Onabanjo // *Niger Postgrad Med J.* – 2011 – Vol.18, № 2. – P.111-117.
18. Xie Y. F. Role of parasympathetic overactivity in water immersion stress-induced gastric mucosal lesion in rat / Y. F. Xie, Q. Jiao, S. Guo [et al.] // *J Appl Physiol* (1985). – 2005. – Vol.99, № 6. – P.2416-2422.
19. Боброва В.І. Антисекреторні та пробіотичні паралелі при лікуванні дітей з хронічним гастродуоденітом / В. І. Боброва, С. С. Вороніна, Т. В. Рубан [та ін.] // *Перинатологія та педіатрія* – 2010. – Vol.41, № 1. – P.148-151.
20. Берегова Т.В. Значення коротколанцюгових жирних кислот і лактату в регуляції шлункової секреції / Т.В. Берегова, Т.М. Фалалєєва // *Фізіологічний журнал.* – 2006. – Т.52, № 3. – С.41-50.

Вірченко А.В. Исследование антисекреторных свойств мультиштамного пробиотика / А.В. Вірченко, Т.М. Фалалєєва, Т.В. Береговая, Д.С. Янковский // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2013. – Т. 26 (65), № 4. – С.22-29.

Полученные результаты свидетельствуют, что за сразу после действия 3-часового водно-иммобилизационного стресса увеличивалась базальная и стимулированная гистамином (3 мг/кг, внутривенно) кислая желудочная секреция. В последующие 3 суток секреция гидрохлоридной кислоты постепенно восстанавливалась до уровня интактных крыс. Установлено, что введение мультиштамного пробиотика ($1,4 \cdot 10^{10}$ КОЕ/кг, перорально) уменьшало базальную и стимулированную секрецию гидрохлоридной кислоты к показателям интактных крыс. Антисекреторные свойства пробиотиков, подтвержденные данными исследования, являются одним из механизмов стресс-протективного действия пробиотических штаммов и их профилактического и лечебного воздействия на стресс-индуцированные эрозивно-язвенные поражения в желудке.

Ключевые слова: стресс, кислая желудочная секреция, мультиштамный пробиотик, эрозивно-язвенные поражения.

STUDY OF ANTISECRETORY PROPERTIES OF MULTISTRAIN PROBIOTIC
UNDER INFLUENCE OF STRESS

Virchenko O.V., Falalyeyeva T.M., Beregova T.V., Yankovsky D.S.

Taras Shevchenko' Kyiv National University, Kiev, Ukraine

E-mail: ovirchenko@gmail.com

The search of natural non-toxic medicines with gastoprotective action is of a great importance. There are a few studies that confirm preventive and therapeutic action of probiotics on gastric lesions induced by various factors. However, the probiotics effects on gastric acid secretion (GAS) in ulcerative state were not examined. In our previous work we established therapeutic influence of multistrain probiotic, which consists of 14 strains of genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, on gastric lesions induced by water-immersion restraint stress (WIRS). So the aim of this study was to investigate antisecretory properties of multistrain probiotic under condition of stress action.

Rats were divided into 8 groups 6 animals in each. 1st group – intact rats, others were subjected to WIRS. GAS was studied immediately and in 3 consecutive days after stress. The treatment with probiotic or water was performed during 1, 2 or 3 days after WIRS. Probiotic was administered at a dose 1.4×10^{10} CFU / kg, orally, dissolved in water in a volume 0,5 ml/200g. GAS was studied by the method of Ghosh and Shild.

Results of the research indicated that basal and stimulated by histamine (3 mg / kg, intraperitoneally) GAS increased immediately after the 3-hour WIRS. For the next 3 days the GAS is gradually restored. The introduction of multistrain probiotic reduced basal and stimulated GIS to the level of intact rats. Antisecretory properties of probiotics proved by this study are one of the mechanisms of stress-protective action of probiotic strains and their preventive and therapeutic effects on stress-induced erosive and ulcerative lesions of the stomach.

Keywords: stress , gastric acid secretion, multistrain probiotic, erosive and ulcerative lesions.

Поступила в редакцію 27.11.2013 г.