Summary

MORPHOFUNCTIONAL STATE OF THE STOMACH AND CAECUM IN WHITE RATS AFTER THE COURSE OF CLARITHROMYCIN
Hryn V. H.

Key words: albino rats, stomach, caecum, clarithromycin.

Introduction. The pathogenesis of dysbacterioses associated with antibiotic therapy is an urgent medical problem, although some other exogenous and endogenous factors may contribute to the microbiocenosis distortion in the host organism. Purpose. The paper was aimed at studying the morphofunctional state of the stomach and caecum of albino rats after the course of clarithromycin. Material and methods. 30 mature albino male rats weighting 200,0±20,0 g were involved into the experiment. Antibiotic was given to the rodents as a food supplement during their two-meals-a-day feeding. Portions of the stomach and caecum have been studied. Serial paraffin sections were analyzed by using the "Konus" light microscope. Morphometric characteristics of the tissue structures were obtained by the Sigeta X 1 mm/100 Div.x0.01mm stage micrometer. Results and conclusions. In 12 out of 30 subjects, the comparative volume of the caecum was almost twice as less than the volume of the stomach due to a significant enlargement of its fundus, caused by isometric flattening and convergence between its mucous membrane and muscular tunic. In 18 experimental animals, the volumetric capacity of the caecum was twice as larger than the stomach. In contrast, a decrease in the volume of the cecum is associated with a thickening of its wall and increased formation of folds of the mucous membrane that is, probably, caused by insufficient entering of metabolic by-products from the small intestine.

DOI 10.31718/2077-1096.20.1.140
УДК 615.372:[579.864.1+579.873.13]:577.352.38

Книш О.В., Нікітченко Ю.В.

IN VITRO АНТИРАДИКАЛЬНА АКТИВНІСТЬ БЕЗКЛІТИННИХ ЕКСТРАКТІВ BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM ТА LACTOBACILLUS REUTERI

Державна установа "Інститут мікробіології та імунології
ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України", м. Харків, Україна
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, м. Харків, Україна

Пробіотичні мікроорганізми здатні виявляти антиоксидантну активність. Більшість корисних ефектів пробіотиків зумовлені дією їх дериватів (структурних компонентів та метаболітів). Метою роботи було дослідити антирадикальну активність безклітинних екстрактів, що містять деривати бактерій пробіотичних штамів Bifidobacterium bifidum 1 та Lactobacillus reuteri DSM 17938, за здатністю поглинати гідроксильні радикали в модельній системі їх генерації. Безклітинні екстракти отримували з дезінтегратів та культур пробіотичних бактерій, що культивувалися у дезінтегратах власних клітин. Препаратом порівняння було обрано метабіотик HYLAK FORTE. Безклітинні екстракти L. reuteri за вмісту в інкубаційному середовищі 20% об. забезпечували поглинання гідроксильних радикалів на рівні 75 – 90 %, а екстракти B. bifidum – на рівні 50 – 60 %. Метабіотик такий же рівень поглинання гідроксильних радикалів забезпечував за нижчого у 1,5 – 2,5 рази вмісту у середовищі інкубації. Більш виражену антирадикальну активність виявили екстракти з дезінтегратів, ніж екстракти з культур пробіотиків. Для екстрактів і метабіотика визначено концентрації 50 % поглинання гідроксильних радикалів ($ІК_{50}$) з розрахунку на масу сухого залишку. За цим показником найбільш ефективним виявився екстракт з дезінтеграту L. reuteri ($ІК_{50}$ = 1,57 мг/мл). Решта досліджених дериват-вмісних продуктів розташувалися в порядку зменшення антирадикальної активності наступним чином: екстракт з дезінтеграту B. bifidum ($ІК_{50}$ = 1,64 мг/мл) > екстракт з культури B. bifidum ($ІК_{50}$ = 1,75 мг/мл) > екстракт з дезінтеграту L. reuteri ($ІК_{50}$ = 1,86 мг/мл) > HYLAK FORTE ($ІК_{50}$ = 11,03 мг/мл). Отже, всім дослідним екстрактам притаманна антирадикальна активність по відношенню до найбільш реакційно здатного гідроксильного радикалу. Отримані результати спонукають до подальшого вивчення антиоксидантних властивостей безклітинних екстрактів L. reuteri та B. bifidum з метою з'ясування механізмів їх біологічної активності та обґрунтування доцільності їх терапевтичного застосування.

Ключові слова: активні форми кисню (АФК); поглинання гідроксильних радикалів; дезоксирибоза; дезінтеграт; деривати пробіотиків.

Дослідження є фрагментом науково-дослідної роботи: «Мікробіологічна характеристика нових структурно-метаболітних комплексів лакто- та біфідопробіотиків», державна реєстрація № 0119U100686.

Вступ

Активні форми кисню (АФК), які у фізіологічних концентраціях необхідні для нормального функціонування клітин, в надлишковій кількості викликають пошкодження біологічних молекул та структур [1, 2]. В основі патогенезу переважної більшості захворювань лежить оксидативне пошкодження клітин, ослаблення системи антиоксидантного захисту та порушення про-/антиоксидантного балансу в бік переважання процесів оксидації [1, 8]. Тому застосування засобів посилення ферментативних і неферменти-

тивних механізмів антиоксидантного захисту в комплексній терапії захворювань є патогенетично обґрунтованим.

Дослідження останнього десятиріччя довели, що деяким пробіотичним бактеріям притаманна виражена антиоксидантна активність [1, 12, 13]. В основі антиоксидантної дії пробіотиків лежить здатність до поглинання та попередження генерації АФК, хелатування металів, пригнічення активності ферментів та аутоокислення аскорбату [1]. Для реалізації корисних ефектів введених в організм пробіотичних бактерій необхідна колонізація ними слизових оболонок. Значні функціональні та кількісні втрати під час транзиту через шлунково-кишковий тракт і низький рівень приживлення клітинних пробіотиків є причиною їх недостатньої клінічної ефективності [4, 14].

Застосування біотехнологічних продуктів, що містять готові біологічно активні пробіотичні похідні, покликане вирішити цю проблему. Очевидно, цим зумовлений значний інтерес до вивчення антиоксидантних властивостей культуральних супернатантів, екстрактів та дезінтегратів пробіотиків в останні роки [1, 6, 9, 10, 11]. Розроблений нами спосіб отримання безклітинних екстрактів дозволяє отримувати кінцевий продукт, що містить структурні компоненти і метаболіти пробіотика, але не містить компонентів поживного середовища, з яким можуть бути пов'язані негативні ефекти на організм пацієнта. Антиоксидантні властивості таких екстрактів потребують ретельного вивчення.

Дослідження *in vitro* дозволять оцінити наявність у безклітинних екстрактів прямої актиоксидантної активності. Вона не пов'язана зі здатністю впливати на метаболічні процеси, що забезпечують про-/антиоксидантний баланс в умовах цілісного організму, а зумовлена безпосередньою дією на АФК, нерадикальні індуктори та проміжні продукти вільнорадикального окислення. Гідроксильні (ОН) радикали є найбільш реакційно здатними і завдають найбільшої шкоди клітинним мембранам і ДНК, викликаючи загибель і мутації клітин [2]. Тому антирадикальну активність речовин зазвичай оцінюють за здатністю поглинати гідроксильні радикали.

Мета дослідження

Вивчити здатність безклітинних екстрактів, що містять деривати *Bifidobacterium bifidum* та *Lactobacillus reuteri*, поглинати гідроксильні радикали в модельній системі їх генерації.

Матеріали та методи дослідження

Безклітинні екстракти (БКЕ) отримували з пробіотичних штамів *B. bifidum* 1 («Біфідумбактерин», ТОВ «Віво-Актив», Україна) та *L. reuteri* DSM 17938 («БіоГая», BioGaia Production AB, Швеція). Методика отримання БКЕ докладно описана раніше [7]. Досліджено чотири види БКЕ: L − екстракт з дезінтеграту бактерій *L. reuteri;* ML − екстракт з культури *L. reuteri*, що культивувалася у дезінтеграті власних клітин; B − екстракт з дезінтеграту бактерій *B. bifidum;* MB − екстракт з культури *B. bifidum*, що культивувалася у дезінтеграті власних клітин. Препаратом порівняння було обрано метабіотик HYLAK FORTE (HF, Ratiopharm, Німеччина).

Ефективність антирадикальної активності дослідних безклітинних екстрактів (БКЕ) та метабіотика (HF) визначали за їх здатністю поглинати ОН-радикали, що генеруються у системі залізо (Fe) − етилендиамінтетраацетат (ЕДТА), перекис водню (H_2O_2) і L-аскорбат, тим самим пригнічувати руйнування ОН-радикалами дезоксирибози (ДОР) [5]. Інкубаційне середовище містило 20 мМ KH_2PO_4 − КОН буферу pH 7,4; 100 мкМ хлориду заліза ($FeCl_3$, Sigma – Aldrich, США); 104 мкМ ЕДТА (Sigma, США); 1 мМ H_2O_2; 100 мкМ L-аскорбату (Sigma, США) та 2,8 мМ 2-Дезокси-Д-рибози (Fluka, Німеччина). Досліджувані зразки вводили в інкубаційне середовище у концентрації від 40 до 200 мкл/мл. Реакцію проводили за температури 37°С впродовж 60 хвилин при постійному помішуванні. Зупиняли реакцію 2,8 % трихлороцтовою кислотою (ТХОК). Забарвлені 1 % тіобарбітуровою кислотою (ТБК) продукти реєстрували на двопроменевому спектрофотометрі Specord UV VIS (Німеччина), вимірювали різницю екстинкцій при довжинах хвиль 535 та 580 нм. Антирадикальну активність (АРА) виражали у % руйнування дезоксирибози за формулою:

$АРА = (D_X - D_O) / D_X \times 100$ %, де D_X − оптична густина, що відображає швидкість неінгібованого руйнування дезоксирибози; D_O − оптична густина, що відображає швидкість руйнування дезоксирибози в присутності досліджуваних речовин.

Для визначення маси сухого залишку 100 мкл екстракту поміщали у термостат і висушували за температури 105 ± 3 °С впродовж ~30 хв до отримання постійної ваги.

Експерименти проводили тричі. Отримані дані виражали як середні арифметичні зі стандартним відхиленням (x ± SD), піддавали статистичній обробці з використанням Windows XP Professional OEM Software, Excel 2003 (ліцензія № 74017-640-0000106-57973). Проводили однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) з наступним множинним порівнянням із застосуванням корекції Бонферроні. Відмінності вважали достовірними при значенні p = 0,05 / кількість можливих порівнянь [3].

Результати та їх обговорення

Як видно з представлених на рис. 1 даних, обидва БКЕ *L. reuteri* за вмісту в інкубаційному середовищі 20% об. пригнічували руйнування ДОР (поглинали ОН-радикали) на рівні 75 – 90 %. При цьому більш виражене пригнічення забезпечував екстракт, отриманий з дезінтеграту (L) ($p < 0,05$). Подібні результати були отримані раніше іншими дослідниками [6]. Вони показали, що АРА супернатанту лізату клітин була вищою

порівняно з АРА культуральної рідини. Метабіотик (HF) такий же рівень пригнічення руйнування ДОР забезпечував за нижчого вмісту в середовищі інкубації у 1,5 – 1,7 разів. Відомо, що крім продуктів метаболізму пробіотичних бактерій (*Escherichia coli, Streptococcus faecalis, L. acidophilus* та *L. helveticus*), до його складу входять допоміжні речовини, серед яких присутні стабілізатори, регулятори pH та синергісти антиоксидантів. Можливо, з цим пов'язана його вища здатність пригнічувати руйнування ДОР порівняно з БКЕ.

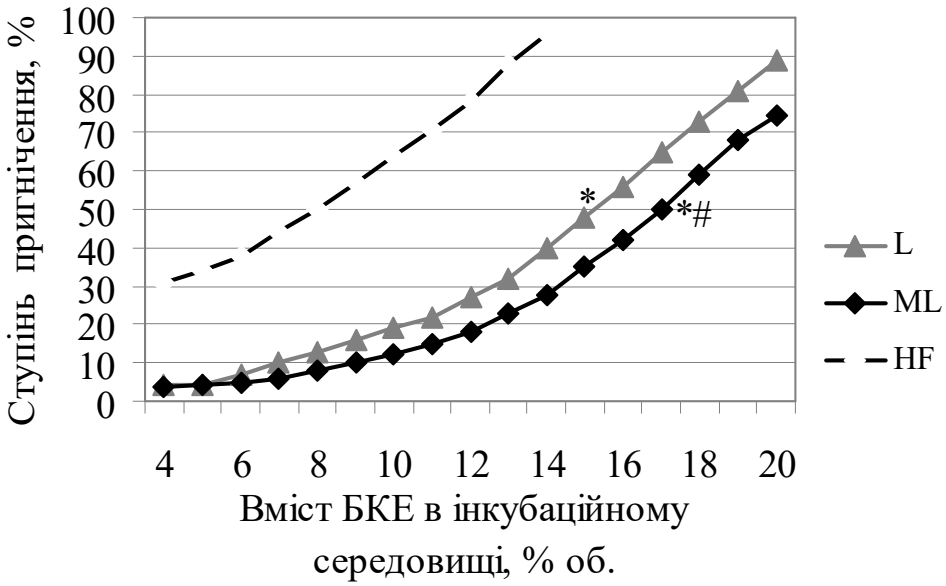

Рис. 1. *Антирадикальна активність БКЕ L. reuteri та метабіотика (HF).*

*Примітка: L − екстракт з дезінтеграту бактерій L. reuteri; ML − екстракт з культури L. reuteri, що культивувалася у дезінтеграті власних клітин; HF − HYLAK FORTE; відмінності статистично достовірні відносно: * − HF; # − L, p < 0,05.*

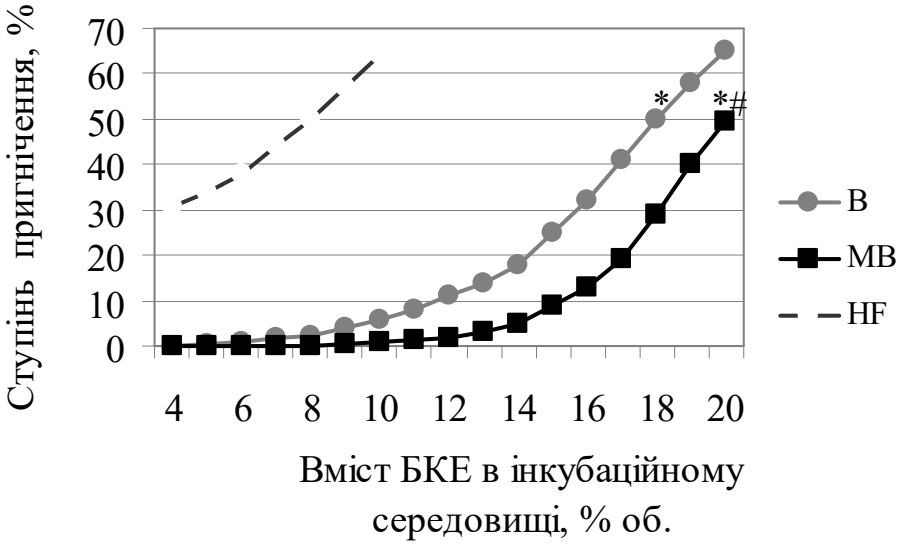

Рис. 2. *Антирадикальна активність БКЕ B. bifidum та метабіотика (HF).*

*B − екстракт з дезінтеграту бактерій B. bifidum; MB − екстракт з культури B. bifidum, що культивувалася у дезінтеграті власних клітин; HF − HYLAK FORTE; відмінності статистично достовірні відносно: * − HF; # − B, p < 0,05.*

Як показують результати дослідження, подані на рис. 2, БКЕ *B. bifidum* виявили значно меншу здатність пригнічувати руйнування ДОР, ніж БКЕ *L. reuteri* та метабіотик (HF). За вмісту в інкубаційному середовищі 20 % об. вони забезпечували пригнічення руйнування ДОР на рівні 50 – 65 %. Відомо, що антиоксидантна активність може бути різною навіть серед штамів одного виду, тобто є штамоспецифічною [1]. Слід зазначити, що екстракт з дезінтеграту біфідобактерій теж виявив вищу АРА, ніж екстракт з культури, що культивувалася у власному дезінтеграті (p <

0,05). Для забезпечення еквівалентного рівня пригнічення руйнування ДОР метабіотик (HF) необхідно було додавати у середовище інкубації у 2 – 2,5 рази меншому об'ємі, ніж БКЕ *B. bifidum*.

Склад та біологічні властивості кінцевого продукту залежать як від мікроорганізму, джерела структурних компонентів та продуцента метаболітів, так і від технології його отримання. Очевидно, відмінності між АРА дослідних екстрактів зумовлені їхнім різним кількісним і якісним компонентним складом. З огляду на спосіб отримання, екстракти з отриманих термоциклюванням дезінтегратів повинні містити структурні компоненти та продукти зміненого за шоковим типом метаболізму пробіотичних клітин, а екстракти з культур – переважно метаболіти бактерій, що продукуються ними під час культивування у власних дезінтегратах.

Для більш коректного порівняння АРА дослідних БКЕ і метабіотика було вирішено визначити для них показники 50 % поглинання ОН-радикалів з розрахунку на масу сухого залишку (Табл. 1).

Таблиця 1

Концентрації БКЕ та метабіотика (HF), що забезпечують 50% поглинання ОН-радикалів в модельній системі

Показник	Дослідні екстракти та метабіотик (HF)				
	L	ML	B	MB	HF
IK_{50}, мг/мл	1,57	1,86	1,64	1,75	11,03

Притмітка. IK_{50} – 50 % інгібіторна концентрація.

Дані таблиці свідчать, що серед дослідних дериват-вмісних продуктів найбільш ефективним за АРА виявився екстракт з дезінтеграту *L. reuteri* (L). Для досягнення 50 % поглинання ОН-радикалів в модельній системі решту екстрактів необхідно було вводити в модельну систему у вищій концентрації. Але найбільша різниця за цим показником спостерігалася між дослідними екстрактами та метабіотиком. Останній забезпечував 50 % пригнічення руйнування ДОР за умови вмісту в модельній системі у 7 разів вищому, ніж екстракт L.

Висновки та перспективи подальших досліджень

Всім дослідженим екстрактам притаманна антирадикальна активність по відношенню до найбільш реакційно здатного гідроксильного радикалу. Екстракти з дезінтегратів показали більш виражену антирадикальну активність, ніж екстракти з культур, що культивувалися у власних дезінтегратах. Серед досліджених безклітинних екстрактів найбільш виражену антирадикальну активність виявив екстракт з дезінтеграту *L. reuteri* (L). Решта екстрактів та метабіотик розташувалися в порядку зменшення зазначеної активності наступним чином: B > MB > ML > HF.

Отримані результати спонукають до подальшого вивчення антиоксидантних властивостей безклітинних екстрактів *L. reuteri* та *B. bifidum* з метою з'ясування механізмів їх біологічної активності та обґрунтування доцільності їх терапевтичного застосування.

Література

1. Amaretti A, di Nunzio M, Pompei A, Raimondi S, Rossi M, Bordoni A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: *in vitro* and *in vivo* activities. Applied Microbiology and Biotechnology. 2012 Jul 12; 97(2):809–17.
2. Borra SK. Effect of curcumin against oxidation of biomolecules by hydroxyl radicals. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2014 Oct; 8(10):CC01-CC05.
3. Glantz SA. Primer of biostatistics. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 2012. 327 p.
4. González-Rodríguez I, Ruiz L, Gueimonde M, Margolles A, Sánchez B. Factors involved in the colonization and survival of bifidobacteria in the gastrointestinal tract. FEMS Microbiology Letters. 2012 Dec 17; 340(1):1–10.
5. Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI. The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. Analytical Biochemistry. 1987 Aug; 165(1):215–9.
6. Karamova NS, Khabibullin RE. Antiradikal`ny`e svojstva *Lactobacillus acidophilus* n.v.Ep. 317/402 *in vitro* [The antiradical activity of *Lactobacillus acidophilus* n.v.Ep. 317/402 *in vitro*]. Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta. 2013; 16(23):127-9. (Russian).
7. Knysh OV, Isayenko OY, Voyda YV, Kizimenko OO, Babych YM. Influence of cell-free extracts of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri* on proliferation and biofilm formation by *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2019 Apr 17; 10(2):251–6.
8. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. Clinical Interventions in Aging. 2018 Apr; 13:757–72.
9. Prosekov AY, Dyshlyuk LS, Milentyeva IS, Sykhikh SA, Babich OO, Ivanova SA, Pavsky VA, Shishin MV, Matskova LV. Antioxidant and antimicrobial activity of bacteriocin-producing strains of lactic acid bacteria isolated from the human gastrointestinal tract. Progress in Nutrition. 2017 Apr; 19(1):67-80.
10. Saadatzadeh A, Fazeli MR, Jamalifar H, Dinarvand R. Probiotic Properties of Lyophilized Cell Free Extract of Lactobacillus casei. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products. 2013 Jul 23; 8(3):131–7.
11. Sarojini G. Antioxidant and anti-cancer potential of marine lactic acid bacteria. European Journal of Biomedical and Pharmaceutical sciences. 2017; 4(10):290-296.
12. Wang AN, Yi XW, Yu HF, Dong B, Qiao SY. Free radical scavenging activity of *Lactobacillus fermentum in vitro* and its antioxidative effect on growing-finishing pigs. Journal of Applied Microbiology. 2009 Mar 30; 107(4):1140–8.
13. Wang Y, Wu Y, Wang Y, Xu H, Mei X, Yu D, et al. Antioxidant Properties of Probiotic Bacteria. Nutrients. 2017 May 19; 9(5):521.
14. Zmora N, Zilberman-Schapira G, Suez J, Mor U, Dori-Bachash M, Bashiardes S, et al. Personalized Gut Mucosal Colonization Resistance to Empiric Probiotics Is Associated with Unique Host and Microbiome Features. Cell. 2018 Sep; 174(6):1388–1405.e21.

Реферат

IN VITRO АНТИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ БЕСКЛЕТОЧНЫХ ЭКСТРАКТОВ BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM И LACTOBACILLUS REUTERI

Кныш О.В., Никитченко Ю.В.

Ключевые слова: активные формы кислорода (АФК); поглощение гидроксильных радикалов; дезоксирибоза; дезинтеграт; дериваты пробиотиков.

Пробиотические микроорганизмы способны проявлять антиоксидантную активность. Большинство полезных эффектов пробиотиков обусловлено действием их дериватов (структурных компонентов и метаболитов). Целью работы было исследовать антирадикальную активность бесклеточных экстрактов, содержащих дериваты бактерий пробиотических штаммов *Bifidobacterium bifidum* 1 и *Lactobacillus*

reuteri DSM 17938, по способности поглощать гидроксильные радикалы в модельной системе их генерации. Бесклеточные экстракты получали из дезинтегратов и культур пробиотических бактерий, которые культивировались в дезинтегратах собственных клеток. Препаратом сравнения был выбран метабиотик HYLAK FORTE. Бесклеточные экстракты *L. reuteri* при содержании в инкубационной среде 20% об. обеспечивали поглощение гидроксильных радикалов на уровне 75 – 90%, а экстракты *B. bifidum* – на уровне 50 – 60%. Метабиотик такой же уровень поглощения гидроксильных радикалов обеспечивал при содержании в среде инкубации ниже в 1,5 – 2,5 раза. Более выраженную антирадикальную активность проявили экстракты дезинтегратов, чем экстракты из культур пробиотиков. Для экстрактов и метабиотика определены концентрации 50% поглощения гидроксильных радикалов ($ИК_{50}$) в расчете на массу сухого остатка. По этому показателю наиболее эффективным оказался экстракт из дезинтеграта *L. reuteri* ($ИК_{50}$ = 1,57 мг/мл). Остальные исследованные дериват-содержащие продукты расположились в порядке убывания антирадикальной активности следующим образом: экстракт из дезинтеграта *B. bifidum* ($ИК_{50}$ = 1,64 мг/мл) > экстракт из культуры *B. bifidum* ($ИК_{50}$ = 1,75 мг/мл) > экстракт из культуры *L. reuteri* ($ИК_{50}$ = 1,86 мг/мл) > HYLAK FORTE ($ИК_{50}$ = 11,03 мг/мл). Таким образом, все исследованные экстракты обладали антирадикальной активностью по отношению к наиболее реакционно способному гидроксильному радикалу. Полученные результаты побуждают к дальнейшему изучению антиоксидантных свойств бесклеточных экстрактов *L. reuteri* и *B. bifidum* с целью выяснения механизмов их биологической активности и обоснования целесообразности их терапевтического применения.

Summary

IN VITRO ANTI-RADICAL ACTIVITY OF BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM AND LACTOBACILLUS REUTERI CELL-FREE EXTRACTS

Knysh O.V., Nikitchenko Yu.V.

Key words: reactive oxygen species (ROS); hydroxyl radical scavenging; deoxyribose; disintegrate; probiotics derivatives.

Probiotic microorganisms are known to be able to exhibit antioxidant activity. Most of beneficial probiotics effects are due to the action of their derivatives (structural components and metabolites). The aim of the work was to investigate the antiradical activity of cell-free extracts containing bacterial derivatives of *Bifidobacterium bifidum* 1 and *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 probiotic strains, by their hydroxyl radical scavenging activity in the model system of their generation. Cell-free extracts were obtained from disintegrators and cultures of probiotic bacteria cultured in the disintegrators of their own cells. A metabiotic HYLAK FORTE was chosen as the reference drug. At a concentration 20% vol. in the incubation medium the hydroxyl radical scavenging by *L. reuteri* cell-free extracts was at a level of 75–90 %, and the hydroxyl radical scavenging by *B. bifidum* cell-free extracts was at a level of 50–60%. The metabiotic provided the same level of the hydroxyl radical scavenging activity when its content in the incubation medium was lower in 1.5 – 2.5 times. Extracts obtained from disintegrators showed a more pronounced antiradical activity than extracts from probiotic cultures. Based on the weight of the dry residue, concentrations for 50% hydroxyl radical scavenging (IC_{50}) by extracts and metabiotic were calculated. According to this indicator, *L. reuteri* extract obtained from disintegrate was the most effective (IC_{50} = 1.57 mg/ml). Other investigated derivative-containing products were arranged in decreasing order of antiradical activity as follows: *B. bifidum* extract from disintegrate (IC_{50} = 1, 64 mg/ml) > *B. bifidum* extract from culture (IC_{50} = 1, 75 mg/ml) > *L. reuteri* extract from culture (IC_{50} = 1, 86 mg/ml) > HYLAK FORTE (IC_{50} = 11, 03 mg/ml). Thus, all the studied extracts showed antiradical activity with respect to the most reactive hydroxyl radical. The obtained results encourage further study of the antioxidant properties of *L. reuteri* and *B. bifidum* cell-free extracts in order to elucidate the mechanisms of their biological activity and justify the appropriateness of their therapeutic use.