

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Институт развития образования

Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии



Разетдинова Алина Римовна

**«Антиоксидантная активность пробиотических комплексов
для полости рта»**

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
доцент кафедры фундаментальной
и прикладной микробиологии



К. С. Мочалов

Уфа – 2024

Оглавление

Список сокращений и условных обозначений.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	7
1.1. Пробиотики и пребиотики как средство поддержания физиологического состояния полости рта.....	7
1.2. Механизмы действия пробиотиков и пребиотиков.....	9
1.3. Оксидативные процессы и окислительный стресс.....	12
1.4. Регистрация хемилюминесценции как метод исследования оксидативных процессов и антиоксидантной активности препаратов	21
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	25
2.1. Объекты исследования	25
2.2. Модельные системы для оценки антиоксидантной активности..	25
2.2. Методы исследования	27
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	29
3.1. Антиоксидантная активность пробиотических комплексов полости рта по отношению к генерации активных форм кислорода	29
3.2. Оценка антиоксидантной активности пробиотиков для полости рта по отношению к реакциям перекисного окисления модельных липидов	31
3.3. Оценка антиоксидантной активности пробиотических комплексов в сыворотке крови.....	34
3.4. Оценка антиоксидантной активности пробиотических комплексов для полости рта в цельной крови	35
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	37
ВЫВОДЫ.....	39
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	40

Список сокращений и условных обозначений

АОА - антиоксидантная активность

АТФ - аденозинтрифосфат

АФК - активные формы кислорода

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

НАДФН - никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ПОЛ - перекисное окисление липидов

СРО – свободно-радикальное окисление

ХЛ - хемилюминесценция

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Пробиотики являются одними из наиболее часто применяемых продуктов биотехнологии и промышленной биотехнологии, и выступают инструментом в поддержании здоровья человека. Исследования показывают, что они могут помочь в укреплении иммунной системы, улучшении работы пищеварительной системы, предотвращении различных заболеваний. Активное применение пробиотики находят и для восстановления микробиома полости рта, лечения воспалительных заболеваний. Интенсивное применение пробиотиков обуславливает проведение исследований, направленных на более глубокое понимание их механизма действия

Одним из механизмов действия пробиотиков может являться их антиоксидантная активность – способность подавлять образование свободных радикалов: активных форм кислорода (АФК) и пероксидных липидных радикалов [11]. Чрезмерное образование свободных радикалов лежит в основе феномена окислительного стресса [10,11]. Окислительный стресс является универсальным звеном повреждения молекул и структур клеток, и кроме того, он является причиной апоптоза и некроза. Увеличение выработки свободных радикалов свидетельствовать о развитии окислительного стресса, снижении активности защитных ферментных систем клеток, активной выработки окислительных метаболитов.

Среди методов определения антиокислительной активности субстратов, одним из наиболее чувствительных является метод регистрации хемилюминесценции. Хемилюминесценция (ХЛ) – это свечение, которое возникает при взаимодействии свободных радикалов, которое может быть избирательно усилено при добавлении различных веществ, в частности, люциногена и люминола [10, 57].

Разные противогрибковые средства характеризуются своими особенностями действия, и потенциально, могут обладать разной прооксидантной активностью. Оценка антиоксидантных свойств противогрибковых препаратов отражает одну из сторон их эффективности - относительно окислительного повреждения, связанного с активацией оксидативного стресса.

В прикладном плане, применение хемилюминесцентных методов позволит разработать экспресс-методы определения антиоксидантных свойств пробиотиков. Сказанным и предопределен выбор темы дипломной работы.

Цель исследования: исследовать антиоксидантную активность пробиотических комплексов для полости рта.

Задачи исследования.

1. Исследовать антиоксидантную активность пробиотических комплексов для полости рта по отношению к генерации активных форм кислорода;
2. Исследовать антиоксидантную активность пробиотических комплексов для полости рта по отношению к реакциям перекисного окисления модельных липидов;
3. Исследовать антиоксидантную активность пробиотических комплексов для полости рта в сыворотке крови;
4. Исследовать антиоксидантную активность пробиотических комплексов для полости рта в цельной крови;
5. Сравнение антиоксидантного действия пробиотического комплекса Бифистим с Бактоблоссом во всех модельных системах.

Научная новизна исследования заключается в том, что впервые изучены комплексные антиоксидантные свойства пробиотических комплексов для полости рта по отношению к широкому спектру свободнорадикальных агентов.

Теоретическая значимость исследования заключается в выявлении антиоксидантных свойств пробиотических комплексов для полости рта относительно свободнорадикальных агентов различного типа.

Научно-практическое значение исследования заключается в разработке основанных на регистрации хемилюминесценции экспресс-методов определения антиоксидантных свойств пробиотиков и пребиотиков.

Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Пробиотики и пребиотики как средство поддержания физиологического состояния полости рта

Желудочно-кишечный тракт человека заселен сложной экосистемой микроорганизмов. Кишечные бактерии не только являются комменсалами, но и подвергаются синбиотической коэволюции вместе со своим хозяином. Полезные кишечные бактерии выполняют многочисленные и важные функции, например, они вырабатывают различные питательные вещества для своего хозяина, предотвращают инфекции, вызываемые кишечными патогенами, и модулируют нормальный иммунологический ответ. Следовательно, модификация кишечной микробиоты с целью достижения, восстановления и поддержания благоприятного баланса в экосистеме и активности микроорганизмов, присутствующих в желудочно-кишечном тракте, необходима для улучшения состояния здоровья хозяина. Введение пробиотиков, пребиотиков или синбиотиков в рацион человека благоприятно сказывается на кишечной микробиоте. Их можно употреблять в виде сырых овощей и фруктов, кисломолочных огурцов или молочных продуктов. Другим источником могут быть фармацевтические смеси и функциональное питание.

Спектр средств, используемых для восстановления численности и качественного состава микрофлоры кишечника, включает в себя две большие группы препаратов - пробиотики и пребиотики.

Пробиотики – это живые микроорганизмы и вещества микробного происхождения, оказывающие при естественном способе введения благоприятные эффекты на физиологические функции, биохимические и поведенческие реакции организма через оптимизацию его микрoэкологического статуса. Результаты метаанализов позволяют

предположить, что пробиотики могут обеспечить преимущества при лечении некоторых состояний, таких как инфекционная диарея и диарея, развившаяся после приема антибиотиков. Польза пробиотиков обусловлена разнообразными механизмами. Например, синтез противомикробных продуктов и конкурентное питание с другими микроорганизмами; эти механизмы напрямую управляются взаимодействием с резидентной микробиотой.

Пробиотики вытесняют патогенные микробы, вызывающие инфекции и провоцирующие развитие наиболее распространенных заболеваний полости рта. В основном они стимулируют иммунную систему. Также, они убивают патогенные микроорганизмы или подавляют их рост, производя агенты, которые мешают им жить и размножаться.

Изучение механизмов работы пробиотиков часто основывались на исследованиях *in vitro* или на животных. Не все механизмы были подтверждены у людей и имеются у каждого штамма. Вероятно, в одном пробиотике может сочетаться несколько механизмов, и важность конкретного зависит от многих факторов. Например, в воспаленном кишечнике самой важной будет способность к подавлению активности воспалительных медиаторов и улучшение функции эпителиального барьера, в то время как в толстой кишке для нормализации моторики особенно важно будет увеличение количества короткоцепочечных жирных кислот и гидратация

Пребиотики — компоненты пищи, которые не перевариваются и не усваиваются в верхних отделах желудочно-кишечного тракта, но ферментируются микрофлорой толстого кишечника человека для стимуляции ее роста и жизнедеятельности. Большая часть пребиотиков является олигосахаридными углеводами. Наиболее выраженными свойствами обладают фруктозо-олигосахариды, инулин, галакто-олигосахариды, лактулоза и лактитол.

Пребиотики, являясь источником энергии для микробиоты кишечника, способны модулировать состав и функционирование микроорганизмов. В процессе проведения функциональной метагеномики было выяснено, что отдельные виды бактерий в ходе филогенеза передали способность метаболизировать определенный пребиотик. Например, некоторые участки метагенома микробиоты человека идентифицированы как участники метаболизма нескольких пребиотиков в ксеногенном хозяине, таком как *E. coli*. Клоны различных видов, таких как *Actinobacteriae*, *Bacteroidetes* и *Firmicutes*, могут ферментировать фруктоолигосахариды, галактоолигосахариды и ксилоолигосахариды. Важный фактор для определения видов, способных ферментировать определенный пребиотик — длина цепочки. Например, инулин ($DP \leq 60$ — здесь и далее: степень полимеризации) может быть ферментирован только несколькими видами, тогда как фруктоолигосахариды могут метаболизироваться гораздо большим количеством микроорганизмов (с $DP \leq 10$). Побочный продукт ферментации сложного пребиотика может быть субстратом для какого-либо микроорганизма. Например, *Ruminococcus bromii* может разлагать резистентный крахмал, и некоторые виды микроорганизмов могут использовать продукты ферментации этой реакции, которые, в основном, представляют собой кислоты, снижающие pH кишечника. Изменение pH кишечника с 6,5 до 5,5 может способствовать модуляции популяции кишечной микробиоты, влияя на чувствительные к кислоте виды (например, *Bacteroides*) и оказывать бутирогенный эффект (образование бутирата бактериями *Firmicutes*)

1.2. Механизмы действия пробиотиков и пребиотиков

Несмотря на существенное разнообразие и широкое применение пробиотических штаммов, их механизмы действия окончательно не изучены. Функции пробиотиков во многом схожи с таковыми у представителей

нормальной кишечной микробиоты человека, однако их эффект может различаться в зависимости от рода, вида или даже штамма. Ниже представлены основные механизмы действия и функции пробиотиков.

Поддержание колонизационной резистентности

В основе колонизационной резистентности лежит способность пробиотических штаммов предотвращать колонизацию желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) условно-патогенными и патогенными микроорганизмами за счет угнетения их активности и способности к размножению вследствие конкуренции за питательные вещества, а также путем синтеза ряда антибактериальных метаболитов, активных в отношении патогенных бактерий (органические кислоты, бактериоцины, амины и т.д.)

Метаболизм пищевых субстратов и утилизация конечных продуктов метаболизма человека

Находясь в просвете кишечника, пробиотики метаболизируют компоненты пищи (например, растительные волокна) и некоторые другие субстанции (например, первичные желчные кислоты) за счет наличия специфических ферментов, отсутствующих у человека. К таким ферментам, в частности, относятся β -галактозидаза (осуществляет гидролиз β -галактозидов в моносахариды) и гидролаза желчных солей (участвует в деконъюгации желчных кислот и их солей).

Продукция метаболитов, необходимых для макроорганизма

В процессе своей жизнедеятельности пробиотические штаммы осуществляют синтез метаболитов, которые поступают в системный кровоток и участвуют в поддержании гомеостаза макроорганизма. В первую очередь к таким метаболитам относятся короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК) — ацетат, пропионат и бутират, которые поддерживают регуляцию энергетического гомеостаза (особенно в колоноцитах), а также служат сигнальными молекулами для клеток иммунной системы, определяя их дифференцировку и противовоспалительную активность. В ходе своей жизнедеятельности пробиотические микроорганизмы также продуцируют

различные медиаторы — допамин (участвует в формировании мотивации и поведенческих реакций, является предшественником норадреналина и адреналина), норадреналин (регулирует процессы в центральной нервной системе (ЦНС), ответственные за бодрствование, запоминание, обучение и внимание, серотонин (регулирует желудочно-кишечную секрецию и перистальтику, вазоконстрикцию и психоэмоциональный статус), гамма-аминомасляную кислоту (основной ингибиторный нейротрансмиттер в ЦНС), ацетилхолин (основной медиатор в холинергических нервных путях) и гистамин (медиатор гистаминовых рецепторов в клетках ЦНС, органов ЖКТ, сердечно-сосудистой и дыхательной и иммунной систем). Кроме этого, пробиотики синтезируют такие незаменимые для макроорганизма метаболиты, как, например, триптофан (незаменимая аминокислота, является предшественником серотонина) и витамины группы В, выполняющие роль коферментов множества биохимических процессов в организме человека — рибофлавин (витамин В2), кобаламин (витамин В12) и фолиевую кислоту.

Регуляция местного и адаптивного иммунного ответа

Взаимодействие компонентов пробиотических бактерий с иммунокомпетентными клетками хозяина прямо или опосредованно ведет к активации местного и системного противовоспалительного иммунного ответа за счет стимуляции синтеза противовоспалительных цитокинов (в основном, интерлейкина-4 и интерлейкина-10). Повышенный уровень противовоспалительных цитокинов также определяет направленность дифференцировки регуляторных иммунных клеток (в первую очередь Т-регуляторных лимфоцитов), что проявляется угнетением провоспалительных реакций и поддержанием противовоспалительного иммунного ответа.

Механизмы действия пребиотиков

Пребиотики изменяют состав и функцию кишечной микробиоты за счет избирательной стимуляции роста и размножения определенных видов бактерий, выступая для них в роли пищевых субстратов. Например, фруктоолигосахариды и галактоолигосахариды метаболизируются

преимущественно представителями родов *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* и *Firmicutes*, а крахмал и фруктаны ферментируются бактериями родов *Bifidobacterium* и *Ruminococcus*. В результате бактериального метаболизма в толстой кишке образуются КЦЖК, низкомолекулярные соединения (например, метан, сероводород, сульфиды) и другие метаболиты, являющиеся пищевым субстратом для других микроорганизмов. Также при ферментации пребиотиков бактериальными клетками образуются кислоты, которые снижают pH среды в толстой кишке и влияют на состав и функцию кишечной микробиоты (например, снижается количество *Bacteroides* и стимулируется образование бутирата представителями *Firmicutes*)

Пребиотики влияют на бактерии ЖКТ путем увеличения количества полезных анаэробных бактерий и снижения популяции потенциально патогенных микроорганизмов. Пробиотики действуют на экосистему ЖКТ, влияя на иммунные механизмы в слизистой оболочке, взаимодействуя с симбиотическими или потенциально патогенными микробами, генерируя продукты метаболического обмена, такие как короткоцепочечные жирные кислоты и коммуницируя с клетками хозяина посредством химических сигналов. Эти механизмы могут приводить к антагонизму с потенциальными патогенами, улучшению среды ЖКТ, укреплению желудочно-кишечного барьера, отрицательной обратной связи с воспалением и обратной связи с иммунным ответом на антигенные вызовы. Предположительно эти феномены оказывают наиболее положительные эффекты, включающие снижение частоты и тяжести диареи, которая является одной из самых частых причин применения пробиотиков.

1.3. Оксидативные процессы и окислительный стресс

Воздействие различных внешних факторов физической, химической и биологической природы, а также внутренние процессы существования человеческого организма приводят к тому, что в организме начинают

накапливаться свободные радикалы [17]. Свободные радикалы, образующиеся в организме, нарушают структуру мембран клеток, что, в свою очередь, ведет к развитию различных патологических состояний [9]. Гибель клетки происходит в результате некроза либо апоптоза. Механизмы некроза клетки достаточно изучены в отличие от апоптоза, в индукции которого важная роль принадлежит оксидативному стрессу, когда образуется избыточное количество свободных радикалов [35].

Свободные радикалы представляют собой короткоживущие химически активные химические промежуточные соединения, которые содержат один или несколько неспаренных электронов [38]. Атомы многих двухвалентных молекул являются свободными радикалами, например, H, N, O. Свободные радикалы имеют повышенную химическую активность [44]. Учитывая, что процессы образования активных форм кислорода и азота играют двойственную роль в организме, представляется более корректным использовать термин «окислительный стресс» для обозначения дисбаланса между продукцией оксидантов, инициирующих процессы свободнорадикального окисления, и активностью системы антиоксидантной защиты организма, нейтрализующей эти процессы [62].

Окислительный стресс (превышение продукции активных форм кислорода и азота над их инактивацией антиоксидантами) является важным патогенетическим фактором, вызывающим развитие сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний, воспалительных и инфекционных патологий, злокачественных новообразований [23]. Основным “инструментом” или движущей силой окислительного стресса служат активные формы кислорода [4]. В норме уровень АФК и антиоксидантная активность (оксидантно-антиоксидантный статус) находятся в состоянии баланса, но при определенных условиях может возникнуть его нарушение в пользу активных форм [47]. Высокие концентрации АФК в клетке - признак оксидативного стресса и причина гибели клеток [26]. Свободнорадикальное окисление (СРО) липидов является необходимым метаболическим

процессом, обеспечивающим гомеостаз для целостного организма, который зависит от состояния антиоксидантной системы [51]. Интенсивность свободно-радикального окисления (СРО) при патологических процессах обусловлена взаимодействием разнонаправленных групп факторов. Один — это прооксиданты, катализирующие ПОЛ; другой - антиоксидантный каскад, являющийся противовесом свободнорадикальных процессов и поддерживающий их на стабильном физиологическом уровне [27].

В биологических объектах различают природные и чужеродные радикалы. Известно, что чужеродные радикалы на основе кислорода образуются в результате физического или химического воздействия на клетки живых организмов. Радикалы повреждают аминокислоты и белки, дезорганизуют клеточные структуры и биологические мембраны. Доказана роль чужеродных свободных радикалов в развитии таких болезней, как рак, атеросклероз, инфаркт миокарда, инсульт, ишемия; заболеваний нервной и иммунной систем, легких, печени, почек, крови, кожи; также они вызывают преждевременное старение. Для снижения агрессивного влияния радикалов на организм человека и животных в биологических объектах имеются специализированные ферментные системы, а также природные биоорганические соединения и синтетические соединения антиоксидантной защиты для нейтрализации радикалов. Роль антиоксидантной защиты выполняют биокатализаторы: супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионзависимая пероксидаза, трансфераза, которые понижают негативное воздействие радикалов путем удаления перекисных соединений.

Механизм антиоксидантной защиты сводится к их взаимодействию со свободными радикалами и превращению последних в неактивные молекулы, обеспечивая таким образом обрыв цепи свободнорадикального окисления. В отличие от чужеродных радикалов, в живых системах преобладают природные радикалы, которые образуются в результате ферментативных реакций и выполняют ключевую роль в процессах жизнедеятельности клеток: в реакциях биосинтеза, окислительного фосфорилирования,

регуляции липидного обмена, процессах митоза, метаболизма и др. Ежедневно каждая клетка генерирует миллионы соединений, обладающих естественной радикальной природой, которые участвуют в жизненно важных одноэлектронных биохимических процессах, связанных с отдачей или приобретением электронов. Существенную роль в радикальных окислительно-восстановительных реакциях клетки выполняют коферменты NAD, NADP, FAD, FMN, CoQ и др., которые являются акцепторами электронов для одной группы ферментов в полиферментном комплексе и донорами для другой. Коферменты способны образовывать промежуточные радикальные структуры и комплексы с переносом заряда в биологических мембранах, обеспечивая перенос энергии и транспорт электронов. При этом восстановление и окисление метаболитов сопровождается циклической ферментативной регенерацией коферментов [63].

Известно, что свободные кислородные радикалы образуются во всех аэробных организмах в течение как физиологических, так и патологических процессов [54]. В организме человека происходит, с одной стороны, постоянная генерация свободных радикалов, с другой - осуществляется действие антиоксидантов.

При нормальных, физиологических условиях в тканях медленно, непрерывно протекают процессы свободно-радикального окисления с образованием активных продуктов - свободных радикалов, реактивных альдегидов и кетонов. В физиологических концентрациях эти метаболиты обуславливают ряд приспособительных реакций, в числе которых:

1. Обновление липидов биологических мембран, модификация их функций.
2. Фагоцитоз: макрофаги содержат фермент НАДФН-оксидазу, который генерирует свободные радикалы, осуществляющие окислительную дегградацию антигенов белковой природы.
3. Активация ферментных систем тканевого дыхания;
4. Повышение устойчивости организма к гипоксии.

5. Нейтрализация повреждающего действия избытка катехоламинов.

В ряде случаев процессы свободно-радикального окисления могут резко усиливаться и приобретать разрушающее действие, проявляющееся:

1. Флюидизацией (увеличение жидкости) гидрофобной области липидного бислоя мембран;
2. Появлением в гидрофобном хвосте жирной кислоты гидрофильной группы;
3. Распадом веществ с антиоксидантной активностью;
4. Образованием трансмембранных перекисных кластеров;
5. Изменением функциональных свойств мембранных белков;
6. Трансформацией активности ряда мембрано-связанных ферментов и рецепторов.

Для поддержания нормального уровня свободно-радикального окисления существуют антиокислительные механизмы. Биохимическую антиоксидантную систему можно разделить на неспецифическую и специфическую. Действие первой связано с предотвращением условий и возможностей утечки электронов из дыхательной цепи митохондрий и генерации активных форм кислорода (АФК). Специфическая же направлена на разрушение АФК и продуктов их превращений и представлена ферментными (супероксиддисмутаза [СОД], каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионтрансфераза) и неферментными (аскорбатная окислительно-восстановительная система, тиолсульфидная система на основе глутатиона, ароматические соединения, витамины Е, Р, флавоноиды, полифенолы, в том числе убихинон) специализированными системами.

При патологических состояниях баланс между процессами свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты нарушается: увеличивается концентрация прооксидантов, к которым, в первую очередь, относят АФК (супероксиданион, синглетный кислород, гидроксильный и алкоксильный радикалы). Возникает состояние «окислительного, или оксидативного стресса» [37].

Свободные радикалы реагируют со всеми биологическими молекулами, которые встречаются им на пути:

Повреждение белка. В результате чего происходит резкое старение клетки. Это хорошо видно по внешности. Кожа становится сухой, дряблой. Мышцы ослабевают, утрачивая тонус. Стареем целый организм, поскольку стареют все клетки, в которых белок атакован свободными радикалами.

Повреждение ДНК – генетический код клетки, что в свою очередь приводит к изменениям в структуре его кода, его свойств и даже мутации. Со временем такие клетки образуют раковую опухоль.

Влияние на процесс развития болезней кровообращения. Наука доказала, что именно они и повинны в развитии атеросклероза, инфаркт, инсульт, ишемия, атеросклероз, заболевания нервной и иммунной систем и заболевания кожи.

Причины образования свободных радикалов.

Раньше других был установлен путь их образования под действием радиационного облучения.

Широко обсуждается и влияние курения: никотин и смолы поражают клетки организма, запуская целый ряд свободно радикальных реакций.

Самыми распространенными на сегодня причинами образования свободных радикалов считаются плохая экология, автомобильные выхлопные газы.

Ультрафиолетовое излучение. В результате окисления молекулы превращаются в радикалы, что вызывает фотостарение.

Доказано и мощное влияние стресса на активацию свободно радикальных процессов. Гормоны стресса, адреналин и кортизол, при неблагоприятных жизненных ситуациях вырабатываются в повышенных количествах, нарушая питание и нормальное дыхание клетки, что моментально приводит к накоплению и распространению радикалов во всем организме. Старение и физиологическое изнашивание организма - главные последствия свободно радикальных реакций [49].

Активные формы кислорода (АФК) — это молекулы органического или неорганического происхождения, имеющие неспаренный электрон на внешнем электронном уровне. В большей степени к ним относятся ионы кислорода, свободные радикалы и различные перекисные соединения. Образование АФК в клетках бактерий происходит в аэробных условиях на клеточной мембране и связано это с деятельностью цепи дыхательных ферментов. Утечка электронов из электронно-транспортной цепи в процессе окислительного фосфорилирования и непосредственное их взаимодействие с кислородом - основной путь образования активных форм кислорода в большинстве клеток. Тем не менее, образование продуктов неполного восстановления кислорода считается нормальным процессом. Активные формы кислорода и радикалы, синтезируемые в организме, выполняют как вредные, так и полезные для клетки функции. Высокая концентрация свободных радикалов в клетке может привести к окислительному стрессу, вызывающему повреждение различных структур: ДНК, белков и липидов. У бактерий могут образовываться гидроксильные радикалы, которые в дальнейшем окажут повреждающее действие. Гидроксильные радикалы, воздействуя на гистидиновые группы и аминокислотные составляющие белков, вызывают их разрушение, и повреждают ферменты. Мутацией и гибелью бактерий может произойти из-за разрыва нуклеиновых кислот и углеводных мостиков. Негативное воздействие АФК на клетку может привести к клеточной смерти. Вследствие высокой токсичности АФК произошло существенное сокращение биоразнообразия первичной анаэробной микро-биоты. Однако большинство видов бактерий выработало средство защиты от губительного действия активных форм кислорода - антиоксидантные системы [36].

В нормально функционирующей дыхательной цепи митохондрий генерируются активные формы кислорода (АФК), их источником являются ферментативные реакции, представляющие собой хорошо регулируемый процесс [60]. В норме в ходе клеточного метаболизма образуются активные

формы кислорода (АФК) и активные формы азота (АФА), которые являются не только побочными продуктами химических реакций, но и участвуют в различных клеточных процессах: защита от патогенных микроорганизмов (H_2O_2 , HOCl , ONOO^- , OH^-), оплодотворение (H_2O_2), деление клеток апоптоз (H_2O_2), регенерация (H_2O_2), координация направления клеточного движения (H_2O_2), регуляция тонуса сосудов (NO^-) и т.д. Однако чрезмерно продуцируемые АФК и АФА - молекулы с высокой реакционной способностью, которые могут приводить к различным повреждениям клеток [65].

В живых системах существуют два основных типа использования кислорода клеткой (два пути окисления): оксидазный и оксигеназный. В первом случае в результате последовательных реакций ферментативного дегидрирования углеводов и жиров и последующего транспорта электронов в митохондриях на конечном пункте этого транспорта - в ферменте цитохромоксидазе - происходит 4-электронное восстановление кислорода с образованием воды. Таким образом, в клетке синтезируется АТФ, а также вода и углекислота. Оксидазный путь не предусматривает включения кислорода в молекулу окисляемого субстрата. Наряду с этим в клетках протекают реакции прямого присоединения кислорода к органическим веществам (оксигеназный путь). В оксигеназных реакциях полного 4-электронного восстановления кислорода не происходит, а наблюдается в основном неполное одноэлектронное его восстановление. Появление неспаренного электрона в молекуле кислорода придает ей свойства свободного (активного) радикала.

Окислительному стрессу подвержены все организмы с аэробным дыханием, поскольку активные формы кислорода (АФК) образуются вследствие нормального метаболизма. Большинство АФК, такие как пероксид водорода, супер-оксидный и гидроксильный радикалы, являются побочными продуктами в электронно-транспортной цепи в процессе окислительного фосфорилирования. В метаболических путях у *E. coli*

встречается два пути расщепления перекиси водорода - с образованием кислорода и воды; окисление L-аскорбата до L-дегидроаскорбата. Помимо участия в метаболических путях, перекись водорода участвует в реакциях окисления и реакциях-Фентона, происходящих в клетках *E. coli*. Развитие окислительного стресса в бактериях вовлекает в работу два ключевых регулона, контролируемые транскрипционными активаторами soxR и oxyR. Белки, экспрессия которых индуцируется системой SoxRS, действуют совместно и устраняют возможный ущерб от окислительного стресса, используя механизмы удаления оксидантов (супероксид дисмутаза), репарацию ДНК (эндонуклеаза IV), восстановление окисленных металлов в простетических группах (флаводоксин и ферредоксин редуктаза) и системы НАДФН (глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа), снижение проницаемости (micF) и экскрецию токсинов (порины). Активация генов регулона SoxRS увеличивает устойчивость клетки не только к супероксид генерирующим агентам, но и к органическим растворителям, а также оксиду азота (NO), который может генерироваться антибиотиками [30].

Скорость продукции активных форм кислорода (АФК) не является постоянной, определяется количеством редокс-активных сайтов и зависит от условий культивирования.

АФК способны повреждать все виды макромолекул в клетке, включая ДНК, липиды и белки, и нарушать метаболизм клетки путем инактивации ферментов, содержащих железо.

Для борьбы с этими окислительными повреждениями клетки *E. coli* используют ряд ферментативных защитных систем, включая супероксиддисмутазы (MnSOD, FeSOD и CuZnSOD), каталазы (HPI и HPII) и алкилгидропероксидредуктазу (AhpFC). Активность антиоксидантных систем регулируется таким образом, чтобы снизить концентрацию АФК до безопасного уровня. Различные стрессы у бактерий часто сопровождаются торможением дыхания, что может приводить к повышению скорости образования АФК. При этом степень индукции антиоксидантных ферментов

может играть важную роль для процесса адаптации к новым условиям окружающей среды [42].

1.4. Регистрация хемилюминесценции как метод исследования оксидативных процессов и антиоксидантной активности препаратов

Методы определения концентрации свободных радикалов можно разделить на прямые и косвенные. Прямые методы - электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) и, с некоторыми оговорками, хемилюминесценция (ХЛ). Косвенные методы - определение продуктов реакций, протекавших с участием свободных радикалов, и ингибиторный анализ. Прямое определение концентрации свободных радикалов в клетках и тканях, в растворах и суспензиях клеточных органелл осложняется их высокой реакционной способностью и малым временем жизни, в результате их концентрация в исследуемых объектах очень низка и отличается от концентрации в живом организме. Решить часть проблемы, связанную с коротким временем жизни свободных радикалов, позволило использование спиновых ловушек - молекул, которые при взаимодействии с нестабильными радикалами образуют стабильные нитроксильные радикалы (спиновые аддукты), сигналы ЭПР, которых затем измеряют с целью качественного и количественного определения концентрации соответствующих радикалов. Аналогичная ситуация сложилась и с применением ХЛ. Реакции рекомбинации супероксид-, гидроксил- и липидных радикалов и оксида азота сопровождаются очень слабой собственной или неактивированной ХЛ. Изучение этой ХЛ внесло большой вклад в исследование процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в биологических мембранах, однако существенным недостатком этого метода является низкая интенсивность сигнала. В связи с этим получили широкое применение так называемые активаторы хемилюминесценции: - химические, вступающие с определенными радикалами в реакции, сопровождающиеся свечением:

люцигенин, дающий свечение с супероксид-радикалами, и люминол, дающий мощное свечение в присутствии гидроксил-радикалов; - физические (сенсibilизаторы), не вступающие в реакцию с радикалами [61].

На сегодняшний день ХЛ представляет большую область науки, находящуюся на стыке между химией, физикой и биологией. Хемилюминесценция — это люминесценция (свечение) тел, вызванная химическим воздействием или протеканием химической реакции. В ходе реакции хемилюминесценции получают возбужденные продукты, которые затем отдают избыток энергии, излучая свет, т. е. химическая энергия, превращается в энергию электромагнитного излучения. Хемилюминесценция всегда привлекала повышенное внимание исследователей. Этот интерес обусловлен как чисто фундаментальными аспектами, так и возможностями разнообразных практических приложений. Действительно, био- и хемилюминесценция широко используются в различных аналитических целях в промышленности, биологии, медицине и т.д. Используя явление хемилюминесценции, можно узнать о том, как протекает реакция, каков ее механизм, что необходимо для эффективного и рационального проведения технологических процессов. Если технологический процесс получения какого-либо химического продукта сопровождается хемилюминесценцией, то ее интенсивность может служить мерой скорости процесса: чем быстрее идет реакция, тем ярче свечение [3]. Метод отличается высокой избирательностью при низком количестве анализируемого образца. С его помощью можно обнаружить наличие свободно-радикальной патологии, проанализировать интенсивность процессов ПОЛ, эффективность лечения антиоксидантными препаратами. Измерение показателей хемилюминесценции (ХЛ) не требует подготовки пробы, в результате которой количество свободных радикалов может измениться [6].

Хемилюминесценция-излучение света, сопровождающее реакции с участием свободных радикалов [28]. ХЛ, основанная на окислении люминола (LH2) (5-амино-2,3-дигидро-1,4фталазиндиона), является одной из наиболее

широко изученных и наиболее известных систем ХЛ. Окисление обычно проводят в щелочном растворе с использованием окислителя, такого как пероксид водорода, гипохлорит, перманганат йод. Известно, что система люминола- H_2O_2 является одной из наиболее эффективных систем ХЛ. Люминол-ХЛ в воде в основном применяется для аналитических целей, особенно для судебной медицины (для определения следовых количеств крови) [25].

Хемилюминесценция биологических объектов обычно представляет собой излучение света от электронно-возбуждённых состояний (ЭВС), возникающих в процессе химических реакций свободно-радикального окисления. Электронно-возбуждённое состояние — это такое состояние атома, при котором электрон находится не на своей типичной орбите, а на более высоких энергетических уровнях. При возвращении «падении» электрона с более высоких энергетических уровней на своё законное место на свой «родной» энергетический уровень выделяется квант света. Энергия этого кванта от которой зависит его частота и длина волны равна разности между этими энергетическими уровнями [22].

В современных медико-биологических исследованиях для оценки свободно-радикальной активности различных материалов широко применяются методики с использованием биологических объектов. Самый распространенный метод основан на измерении собственной хемилюминесценции различных биологических субстратов. Другой метод основан на применении люминесцентного бактериального теста. В ходе эксперимента фиксируют изменение интенсивности биолюминесценции генно-инженерного штамма при воздействии токсичных веществ, присутствующих в анализируемой пробе, по сравнению с контролем [55].

Люминесценцию разделяют на множество видов, где каждое название обычно подразумевает физический процесс, за счет которого появляется лучеиспускание:

Фотолюминесценция - свечение от воздействия света. Здесь различают два случая - первый, когда свечение продолжается после облучения в течение более длительного периода времени — это фосфоресценция и второй, когда свечение наблюдается лишь в процессе освещения флуоресценция. Стоит отметить, что иногда слово фотолюминесценция заменяют на выражение квантовая люминесценция, так как фотон это и есть квант света. В зависимости от способа возбуждения, где носителями являются частицы, обладающие зарядом, люминесценция подразделяется на электронную или ионную.

ХЛ - свечение, как результат химических процессов. Примером могут служить так называемые светящиеся палочки, состоящие из прозрачного корпуса, внутри которого содержится ампула, при разрушении которой вещества смешиваются друг с другом и могут светиться порядка нескольких часов.

Биолюминесценция - способность живых организмов испускать свет. Биолюминесценция рассматривается как отдельный вид люминесценции, но является разновидностью хемилюминесценции, так как основывается на химических процессах. Простым примером животных, использующих биолюминесценцию, являются обыкновенные светлячки или медузы [29].

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

В работе объектами исследования были использованы пробиотики для полости рта. Бактоблiss, содержащие микроорганизмы *Streptococcus salivarius* K12 препятствуют прикреплению бактерий к слизистым и их инфицированию. *Streptococcus salivarius* K12 способны устранить запах изо рта, вызванный продуктами метаболизма бактерий, находящихся в ротоглотке. Бифистим – содержащий микроорганизм *Lactobacillus plantarum* CECT 7481, *Lactobacillus brevis* CECT 7480.

2.2. Модельные системы для оценки антиоксидантной активности

Модельная система генерации активных форм кислорода

В качестве модели, в которой оценивалась антиокислительная активность сред культивирования выступал фосфатный буфер (KH_2PO_4 - 20 мМ, KCl - 105 мМ, pH 7,45 ед.), с добавлением цитрата натрия (50 мМ). Инициация цепных реакций образования свободных радикалов, в первую очередь активных форм кислорода проводилось введением раствора сернокислого железа ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 50 мМ).

Модельная система липидных радикалов

Для изучения эффекта препаратов на процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), их добавляли к липидам, полученным из куриного желтка. Желток смешивали с фосфатным буфером в соотношении 1:5, доводили содержание белка до 1 мг на мл путем разведения, полученного гомогената в среднем 25 мл на 1 л буфера. Затем из гомогената отбирали 20 мл, далее хемилюминесценция инициировалась добавлением 1 мл 50 мМ раствора сернокислого железа при постоянном перемешивании. Ненасыщенные жирные кислоты, содержащиеся в липидах, окислялись и происходила

развитие хемилюминесценции, интенсивность которой оценивалась как процесс перекисного окисления липидов.

Модельная система цельной крови

Перед началом исследования выбирают необходимое количество рабочего раствора, исходя из соотношения 2 мл на 1 пробу, после чего рабочий раствор нагревается в термостате до 37°C. Для измерения ХЛ заранее разливают по 2 мл раствора в стаканчики, которые также помещаются в термостат. Далее гепаринизированная кровь в объеме 0,1 мл добавляется в 2 мл теплого рабочего раствора люминола и тщательно размешивается. Затем полученное растворное смесь помещается в камеру прибора, настроенного на исследование по программе КРОВЬ, при условии, что термостат включен, мешалка выключена. Запись ХЛ проводится в течение 5 минут. Стоит отметить, что люминол-зависимое свечение крови главным образом связано с генерацией активных форм кислорода клетками при фагоцитозе. Таким образом, данное исследование позволяет оценить состояние гуморально-клеточного иммунитета.

Модельная система сыворотки крови

Выполняется процедура отбора крови, после чего полученную кровь выдерживают в течение 30 минут. Далее производится центрифугирование при 1500 оборотах в минуту в течение 15 минут, что позволяет получить сыворотку. Для продолжения исследования отбирается 0,5 мл приготовленной сыворотки, разбавляют её в 20 мл фосфатного буфера. Состав буфера, следующий: 2,72 г. KH_2PO_4 , 7,82 г. KCL , 1,5 г. цитрата натрия $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 5,5\text{H}_2\text{O}$ на 1 литр дистиллированной воды. Полученный раствор затем доводят до величины рН 7,45 ед. проведением титрования насыщенным раствором КОН (фосфатный буфер + цитрат натрия). После этого полученный раствор помещают в кюветную камеру прибора и запускают программу, которая зависит от исследуемого материала - сыворотки или плазмы. В данной программе предусмотрено быстрое перемешивание, а время измерения составляет 5 минут. Чтобы индуцировать

свечение, к раствору добавляют 1 мл 50 мМ раствора $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, который ускоряет процессы перекисного окисления липидов.

2.2. Методы исследования

Регистрация хемилюминесценции – чувствительный метод, позволяющий оценивать окислительные процессы в различных субстратах, в том числе и в средах культивирования. Принцип измерения основан на детекции квантов света, выделяемых при взаимодействии чрезвычайно активных агентов – свободных радикалов. Добавление люминофоров позволяет усилить выделяемые кванты света. В качестве люминофора был использован люминол - люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион).

Регистрация ХЛ проводилась на приборе Хемилюминомер-003.

Измерение образцов описывалось в параметрах кинетики ХЛ. Измерение проводилось 5 минут (рисунок 1).

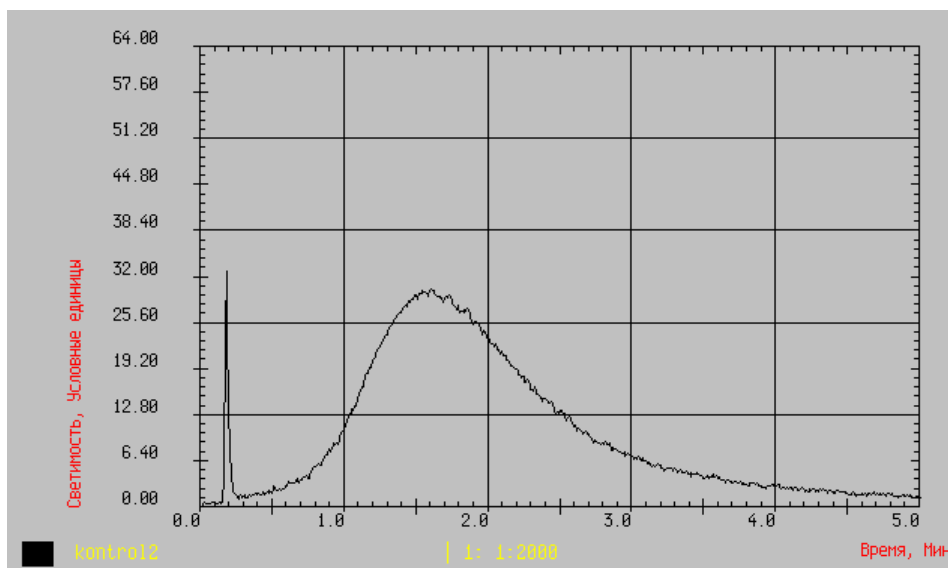


Рисунок 1 – Типичная запись ХЛ модельной системой активных форм кислорода

При оценке результатов анализировался основной параметр ХЛ: светосумма свечения (S)

Методы обработки данных

Статистическую обработку результатов проводили, используя пакет программ «StatisticaforWindows». Параметры ХЛ выражали в условных единицах (одна условная единица - $5,1 \times 10^5$ квант/с). Для сравнения образцов сред с образцами контроля и между собой применяли критерий Манна-Уитни.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Антиоксидантная активность пробиотических комплексов полости рта по отношению к генерации активных форм кислорода

Для проведения сравнительной антиоксидантной оценки пробиотиков и пребиотиков относительно различных форм оксидативных процессов были использованы различные модельные системы. В первую очередь была использована модельная система, в которой происходило образование активных форм кислорода (АФК). Активные формы кислорода - это молекулы кислорода, содержащие более одного электрона в валентной оболочке. Такие молекулы, например, перекись водорода (H_2O_2), супероксидный радикал ($O_2^{\bullet-}$), гидроксильный радикал ($OH^{\bullet}$) и другие, обладают высокой реакционной способностью и могут вызывать окислительный стресс в организме, повреждая клетки и ткани. Некоторые активные формы кислорода участвуют в регуляции клеточных процессов и имеют важную роль в метаболизме.

Добавление пробиотиков в модельную систему, генерирующую АФК выявило их способность подавлять значения ХЛ. Следовательно соединения обладали антиоксидантной активностью (Таблица 2).

Таблица 2. Антиоксидантная активность пробиотиков для полости рта по отношению к генерации активных форм кислорода

	Светосумма (Me (IQR))	
	Концентрация 0,1 мл	Концентрация 0,5 мл
Контроль	20,1 (18,1-26,5)	
Бактоблисс	17,3 (14,7-24,7)*,**	15,4 (13,2-17,6)*,**

Бифистим	13,4 (11,6-17,6)*,**	8,4 (5,3-10,3) *,**
----------	----------------------	---------------------

*Различия статистически значимы по сравнению с контролем,

** Различия статистически значимы между пробиотиками

Из таблицы хорошо отображаются различия оксидативных процессов генерации АФК в модельных системах. Причем отмечался дозозависимый эффект: с ростом дозы средства, происходило усиление антиоксидантного эффекта. Бактоблисс и Бифистим – средства, содержащие в себе живые культуры. В то же время Бифистим в большей степени подавлял образование АФК, что очевидно связано с наличием в его составе Коэнзима Q10. Коэнзим Q10 предотвращает образование в организме избыточного образования свободных радикалов, оксидативного стресса, составляя один из важнейших элементов антиоксидантной системы организма.

Таким образом, пробиотики для полости рта проявляют антиоксидантную активность, что означает, что они могут предотвращать повреждение клеточных структур, вызванное активными формами кислорода. Употребление пробиотиков может увеличить уровень антиоксидантов в организме и защитить от различных заболеваний, связанных с повреждением клеток.

Стимуляция роста полезных бактерий, таких как *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, которые могут иметь антиоксидантную активность и защищать клетки от повреждений. Однако необходимы дополнительные исследования, чтобы более полно изучить этот эффект и определить его эффективность в профилактике и лечении заболеваний, связанных со стрессом оксидативного типа. В этой связи было произведено исследование антиоксидантной активности пробиотиков по отношению к реакциям перекисного окисления модельных липидов методом регистрации хемилюминесценции.

3.2. Оценка антиоксидантной активности пробиотиков для полости рта по отношению к реакциям перекисного окисления модельных липидов

Активные формы кислорода являются инициаторами последующих свободнорадикальных реакций, в том числе молекул липидов, липидных радикалов. Липидные радикалы являются результатом окисления липидов, в том числе входящих в структуру мембран. Это может приводить к разрушению клеточных стенок, апоптозу и некрозу. Поэтому важным компонентом антиоксидантной активности является способность нейтрализовать образующие перекисные радикалы липидов. Для этого была использована модельная система, в которой инициировали перекисное окисление липидов. В данную модельную систему добавляли пробиотики и в двух концентрациях. Результаты приведены в таблице 3.

Таблица 2. Антиоксидантная активность пробиотиков для полости рта относительно перекисного окисления липидов по данным регистрации хемилюминесценции

	Светосумма (Me (IQR))	
	Концентрация 0,1 мл	Концентрация 0,5 мл
Контроль	57,5 (54,8-64,9)	
Бактоблисс	46,6 (43,2-54,9)*,**	23,7 (19,3-27,7)*,**
Бифистим	31,8 (27,2-36,7)*,**	15,6 (12,5-18,3)*,**

*Различия статистически значимы по сравнению с контролем,

** Различия статистически значимы между пробиотиками

Из данных таблицы следует, что исследуемые средства обладали способностью предотвращать процессы образования липидных радикалов. ХЛ снижалась во всех образцах. А с ростом концентрации это снижение усиливалось. То есть, также, как и для модельной системы генерации АФК отмечался дозозависимый эффект.

Пробиотик Бифистим проявил более выраженную антиоксидантную, в сравнении с Бактоблоссом. Антиоксидантная активность пробиотиков относится к их способности предотвращать окисление липидов или жиров в организме. Это особенно важно для защиты клеток от повреждения свободными радикалами, которые могут возникать в результате стрессовых ситуаций, воздействия окружающей среды и пищевых факторов. Пробиотики, благодаря своим антиоксидантным свойствам, могут способствовать снижению риска развития воспалительных заболеваний полости рта, нарушения функции иммунной системы и других патологий.

Для оценки антиоксидантной активности пробиотиков часто используют методы, основанные на определении уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) в тканях или биологических жидкостях. При ПОЛ свободные радикалы атакуют молекулы липидов, вызывая их окисление и образование токсичных продуктов. Пробиотики могут снижать уровень ПОЛ и тем самым защищать клетки от повреждения.

Исследования показывают, что некоторые штаммы пробиотиков, обладают выраженной антиоксидантной активностью и могут защищать клетки от ПОЛ. Однако, не все пробиотические культуры имеют одинаковую антиоксидантную активность, и эффекты могут различаться в зависимости от условий их применения. Также необходимы дополнительные исследования, чтобы более точно оценить механизмы действия пробиотиков на уровне антиоксидантной защиты и определить оптимальные условия их применения.

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) — это процесс, при котором свободные радикалы атакуют жирные кислоты в липидных молекулах, что

приводит к их разложению. Этот процесс может приводить к разрушению клеточных мембран и другим повреждениям.

3.3. Оценка антиоксидантной активности пробиотических комплексов в сыворотке крови

Рассмотренная выше модельная система позволяет оценивать антиоксидантную активность по отношению к липидным радикалам. Для более интегральной оценки антиоксидантной активности пробиотиков в более естественных условиях была использована модельная система сыворотки крови (Таблица 3).

Таблица 3. Антиоксидантная активность пробиотических комплексов в системе сыворотки крови

	Светосумма (Me (IQR))	
	Концентрация 0,1 мл	Концентрация 0,5 мл
Контроль	44,1 (35,7-50,6)	
Бактоблисс	33,5 (32,7-39,3)*,**	24,1 (22,2-27,4)*,**
Бифистим	27,5 (25,3-33,4)*,**	17,4 (13,5-20,6)*,**

*Различия статистически значимы по сравнению с контролем,

** Различия статистически значимы между пробиотиками

Исходя из этой информации, можно сделать вывод, что пробиотические комплексы показали увеличение антиоксидантной активности, так как их средние значения ниже, а значит, имеет место снижение значений по сравнению с контрольным значением. Также, была выявлены статистически достоверные статистические различия между Бактоблиссом и Бифистимом.

3.4. Оценка антиоксидантной активности пробиотических комплексов для полости рта в цельной крови

Антиоксидантную активность можно оценивать не только непосредственно по воздействию на оксидативные процессы, но и опосредованно - при воздействии на свободно-радикальные метаболиты, образующиеся при активации клеток. Для реализации данного подхода были использованы фагоцитарные клетки крови. Фагоцитарные клетки крови обладают механизмами кислород-зависимого метаболизма, активация которого сопровождается генерацией активных форм кислорода.

При добавлении пробиотических комплексов в систему цельной крови отмечалось снижение ХЛ, отражающей уменьшение генерации АФК фагоцитарными клетками (Таблица 4).

Таблица 4. Антиоксидантная активность пробиотиков для полости рта в системе цельной крови по данным регистрации хемилюминесценции

	Светосумма (Me (IQR))	
	Концентрация 0,1 мл	Концентрация 0,5 мл
Контроль	16,5 (14,6-19,3)	
Бактоблисс	14,9 (10,6-16,2)*	12,6 (9,4-13,6)*
Бифистим	10,5(8,5-13,7)*	6,7 (9,4-7,4)*

*Различия статистически значимы по сравнению с контролем,

** Различия статистически значимы между пробиотиками

Данные таблицы показывают, что все исследуемые образцы вызвали подавление параметров ХЛ, то есть обладали антиоксидантной активностью. При этом увеличение концентрации вызывало усиление угнетения ХЛ, то есть характер действия исследуемых средств носил дозозависимый характер.

Также были выявлены статистические различия между Бактоблиссом и Бифистимом. Таким образом, воздействие здесь происходит не только непосредственно воздействие на вырабатываемые АФК, но и на само клеточное звено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При выполнении дипломной работы были изучены фундаментальные аспекты микробиологии и биофизики и освоены отдельные методы: метод оценки антиоксидантной активности методом регистрации хемилюминесценции, проанализированы источники литературы по теме работы, в первую очередь для обзора литературы.

В данной работе оценивалась антиоксидантная активность пробиотиков для полости рта. Исследование проводилось в модельных системах, каждая из которых отражала один из аспектов антиоксидантной активности. В дипломной работе были поставлены следующие задачи:

- 1) Оценка антиоксидантной активности пробиотических комплексов для полости рта по отношению к генерации активных форм кислорода;
- 2) Оценка антиоксидантной активности пробиотических комплексов по отношению к реакциям перекисного окисления модельных липидов;
- 3) Оценка антиоксидантной активности пробиотических комплексов в сыворотке крови;
- 4) Оценка антиоксидантной активности пробиотических комплексов в цельной крови.

Исследование показало, что пробиотические комплексы для полости рта обладают антиоксидантной активностью. Они подавляют выработку активных форм кислорода и липидных радикалов. Кроме того, проявляют антиоксидантные свойства в цельной крови и сыворотки крови. Результаты исследования показали, что пробиотик Бифистим обладает большей антиоксидантной активностью, чем Бактоблисс. Это, очевидно обусловлено входящим в его состав Коэнзима Q10.

Пробиотические комплексы для полости рта имеют потенциальную возможность защиты организма от окислительного стресса. Дальнейшие исследования позволят более точно определить механизмы данного действия

и разработать рекомендации по использованию пробиотиков для профилактики и лечения окислительного стресса в ротовой полости.

Проведенные исследования создают предпосылки для практического применения используемых в данной работе методик, а именно разработки основанных на регистрации хемилюминесценции экспресс-методов определения антиоксидантных свойств пробиотиков.

ВЫВОДЫ

1. Пробиотические комплексы для полости рта обладают антиоксидантной активностью по отношению к активным формам кислорода.
2. Пробиотические комплексы для полости рта обладают антиоксидантной активностью по отношению к липидным радикалам.
3. Пробиотические комплексы для полости рта обладают антиоксидантной активностью в сыворотке крови.
4. Пребиотики и пробиотики обладают антиоксидантной активностью в системе цельной крови.
5. Пробиотический комплекс Бифистим, содержащий Коэнзим Q10 проявлял большее антиоксидантное действие в сравнении с Бактоблиссом во всех модельных системах

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антропов, А.П. Физико-химическое исследование хемилюминесцентной реакции люминола в организованных молекулярных системах / А.П. Антропов, А.В. Рагуткин, Т.В. Янькова, Н.К. Зайцев // [Фундаментальные проблемы радиоэлектронного приборостроения](#). 2017. Т. 17. № 3. С. 738-741.
2. Асташкина, А.П. Приготовление питательных сред и культивирование микроорганизмов / А.П. Асташкина // Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2015. – 19 с.
3. Ахова, А.В. [Формирование сопутствующего окислительного стресса в клетках *Escherichia coli*, подвергнутых действию различных экологических стрессоров](#) / А.В. Ахова П.А. Секацкая, А.Г. Ткаченко // [Прикладная биохимия и микробиология](#). 2019. Т. 55. № 6. С. 535-541.
4. Барсукова, М. Е. Основные методы и подходы к определению маркеров окислительного стресса – органических пероксидных соединений и пероксида водорода / М. Е. Барсукова, Ю И. А. Веселова, Т. Н. Шеховцова // [Журнал аналитической химии](#). 2019. Т. 74. № 5. С. 335-349.
5. Бельская, Л.В. Оценка уровня окислительного стресса по изменению кинетики хемилюминесценции слюны / Л. В. Бельская, Е.А. Сарф // [Актуальные вопросы биологической физики и химии](#). 2018. Т. 3. № 4. С. 847-852.
6. Бричагина, А.С. Метод хемилюминесценции в изучении процессов липопероксидации при артериальной гипертензии и стрессе / А.С. Бричагина, М.И. Долгих, Л.Р. Колесникова, Л.В. Натяганова // [Acta Biomedica Scientifica \(East Siberian Biomedical Journal\)](#). 2019. Т. 4. № 1. С. 133-137.
7. Бурова, Л. Г. Изучение антибактериальной активности производных изоалантолактона в отношении *Escherichia coli* / Л. Г. Бурова, И. В. Широких,

- С. С. Патрушев, Э. Э. Шульц // [Научные конференции НГМУ](#). 2017. [№ 1](#). С. 10-13.
8. Бухарин, О.В. Механизмы выживания бактерий / О.В. Бухарин, А.Л. Гинцбург, Ю.М. Романова, Г. И. Эль-Регистан // Москва, 2005.
9. Владимиров, Г. К. Хемилюминесцентная методика определения общей антиоксидантной емкости в лекарственном растительном сырье / Г. К. Владимиров, Е. В. Сергунова, Д. Ю. Измайлов, Ю. А. Владимиров // [Вестник Российского государственного медицинского университета](#). 2016. [№ 2](#). С. 65-72.
10. Владимиров Ю. А., Азизова О. А., Деев А. И., Козлов А. В., Осипов А. Н., Рощупкин Д. И. // - Ред. ВИНТИ, Москва, 1992, С. 3-250.
11. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. // Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, Наука, Москва, 1972
12. Владимиров Ю.А. Активные формы кислорода и азота: значение для диагностики, профилактики и терапии // Биохимия. 2004. Т. 69. Вып. 1. С. 5-7
13. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестник РАМН. 1998. № 8. С. 43-51.
14. Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов. М 1984; 123—188.
15. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. Лекции по медицинской биофизике. Академкнига, 2007, 432 с.
16. Волкова, П.О. Определение гидропероксидов липидов методом активированной хемилюминесценции / П.О. Волкова, А.В. Алексеев, А.А. Джатдоева, Е.В. Проскурнина, Ю.А. Владимиров // [Вестник Московского университета. Серия 2: Химия](#). 2016. Т. 57. [№ 1](#). С. 41-52.
17. Вяткин, А.В. Напитки антиоксидантной направленности как метод борьбы с окислительным стрессом / А.В. Вяткин, О.В. Чугунова // [Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология](#). 2016. Т. 6. [№ 4 \(19\)](#). С. 119-126.

18. Домотенко, Л.В. Этапы развития производства питательных сред в ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии / Л.В. Домотенко, О.В. Полосенко, А.П. Шепелин // [Бактериология](#). 2019. Т. 4. [№ 4](#). С. 61-67.
19. Егорова, И.Ю. Микробиологические питательные среды нового формата в ветеринарно-санитарной оценке продуктов питания и сырья животного происхождения / И.Ю. Егорова, В.Е. Никитченко, Д.В. Никитченко, А.Н. Чернышева, Е.О. Рысцова // [Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство](#). 2017. Т. 12. [№ 1](#). С. 76-85.
20. Еропкин, М. Ю. Культура клеток как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов / М.Ю. Еропкина, Е. М. Еропкина. - СПб.: МОРСАР, 2003. – 240 с.
21. Завадский, С.П. Физико-химические методы изучения антиоксидантной активности растительного сырья и продуктов его переработки / И.И. Краснюк, Ю.Я. Харитонов, В.В. Тарасов, А.Н. Кузьменко, Д.А. Козин, Н.Б. Саидов, О.В. Ольшанская, А.А. Евграфов // [Разработка и регистрация лекарственных средств](#). 2017. [№ 2 \(19\)](#). С. 214-221.
22. Закотеев, Ю. А. Хемилюминесценция. Принципы и методики регистрации, оборудование, задачи / Ю. А. Закотеев // Москва 2015 г.
23. Зенков, Н.К. Аутофагия как механизм защиты при окислительном стрессе / Н.К. Зенков, А.В. Чечушков, П.М. Кожин, Г.Г. Мартинович, Н.В. Кандалинцева, Е.Б. Меньщикова // [Бюллетень сибирской медицины](#). 2019. Т. 18. [№ 2](#). С. 195-214.
24. Ибрагимова, Д.А. Влияние поверхностно-активных веществ на хемилюминесцентную реакцию люминол–пероксид водорода / Д.А. Ибрагимова, О.М. Камиль, Т.В. Янькова, Н.А. Яштулов, Н.К. Зайцев // [Тонкие химические технологии](#). 2017. Т. 12. [№ 6](#). С. 71-76.
25. Камиль, О. М. Обзор влияние условий процесса на хемилюминесценции (хл) в ходе химической реакции люминола - перекисью

- водорода в присутствии катализатора / О. М. Камиль // [Аллея науки](#). 2017. [№ 7](#). С. 207-220.
26. Карпенко, Е. А. Анализ про- и антиоксидантной систем в плазме крови больных аденомой и раком простаты / Е. А. Карпенко // Красноярск: СФУ, 2019.
27. Кичерова, О. А. Вред и польза окислительного стресса / О. А. Кичерова, Л. И. Рейхерт, К. П. Кичерова // [Медицинская наука и образование Урала](#). 2019. Т. 20. [№ 4 \(100\)](#). С. 193-196.
28. Колтовой, Н. А. Книга 4. Часть 1. Хемилюминесценция / Колтовой Н. А. // Москва. 2017. 145с.
29. Кулыгин, Д.А. Разновидности люминесценции / Д.А. Кулыгин // 1. [Инновационная наука](#). 2016. [№ 12-4](#). С. 36-38.
30. Куликова, Н.А. Влияние антибиотиков на формирование окислительного стресса бактерий / Н.А. Куликова // [Международный студенческий научный вестник](#). 2017. [№ 4-5](#). С. 614-615.
31. Кустова, И. А. Разработка технологии новых пищевых продуктов с использованием экстрактов из вторичного виноградного сырья / И. А. Кустова // автореферат дис. кандидата технических наук / Сев.-Кавказ. зон. науч.-исслед. ин-т садоводства и виноградарства. Краснодар, 2016
32. Лаврский, А.Ю. Влияние микроволнового излучения различных частот на рост культур *Escherichia coli* / А.Ю. Лаврский, Н.Ю. Калугина // [Вестник Пермского государственного гуманитарно-педагогического университета. Серия № 2. Физико-математические и естественные науки](#). 2020. [№ 1](#). С. 36-44.
33. Литусов, Н.В. Эшерихии / Н.В. Литусов // Иллюстрированное учебное пособие. – Екатеринбург: Изд-во УГМА, 2016. - 36 с.
34. Лудан, В.В Роль антиоксидантов в жизнедеятельности организма / В.В. Лудан Л. В. Польская // [Таврический медико-биологический вестник](#). 2019. Т. 22. [№ 3](#). С. 86-92

35. Лысенко, В.И. Оксидативный стресс как неспецифический фактор патогенеза органных повреждений (обзор литературы и собственных исследований) / В.И. Лысенко // [Медицина неотложных состояний](#). 2020. Т. 16. № 1. С. 24-35.
36. Мелихова, Л.А. Теоретические основы определения уровня токсичности свободных радикалов с использованием люминесцирующих бактериальных клеток / Л.А. Мелихова Ю.В. Миндолина // [Международный студенческий научный вестник](#). 2017. № 4-3. С. 269-270.
37. Небесная, Е.Ю. Влияние окислительного стресса на регуляцию сосудистого тонуса / Е.Ю. Небесная // [Международный студенческий научный вестник](#). 2017. № 6. С. 165.
38. Николаев, А.А. Свободные радикалы и биоантиоксиданты в репродуктивных процессах (обзор литературы) / А.А. Николаев, П.В. Логинов, Е.Б. Мавлютова, А.А. Белявская // [Проблемы репродукции](#). 2018. Т. 24. № 1. С. 21-26.
39. Павлов, В.Н. Свободнорадикальное окисление и канцерогенез: дискуссионные вопросы/В.Н. Павлов, И.Р. Рахматуллина, Р.Р. Фархутдинов, В.А. Пушкарев, К.В. Данилко, Э.Ф. Галимова, Ю.Л. Баймурзина, И.В. Петрова, К.С. Мочалов// Креативная хирургия и онкология. 2017. Т. 7. № 2. - с. 54-61.
40. Павлов, В.Н. Сравнительный анализ антиоксидантных эффектов коэнзима q и l-карнитина у мужчин с идиопатической патоспермией / В.Н. Павлов, Э.Ф. Галимова, В.А. Катаев, Р.Р. Фархутдинов, К.С. Мочалов, Ю.Л. Баймурзина, Ш.Н. Галимов // Медицинский вестник Башкортостана. 2013. Т. 8. № 6. - С. 161-163.
41. Панкратова, Н.А. Исследование процесса культивирования *E. coli* в реакторе периодического действия / Н.А. Панкратова Д.А. Табакова, Е.В. Гусева // [Успехи в химии и химической технологии](#). 2017. Т. 31. № 9 (190). С. 32-33.

42. Петерса, М. А. Изменение экспрессии антиоксидантных генов при росте *Escherichia coli* на различных источниках углерода и энергии / М. А. Петерс, Н. Г. Музыка, А. В. Тюленев, О. Н. Октябрьский, Г. В. Смирнова // [Вестник Пермского университета. Серия: Биология](#). 2016. № 4. С. 356-361.
43. Пельтек, С.Е. Стрессовые системы *Escherichia coli* и их роль в реакциях на воздействие терагерцового излучения / С.Е. Пельтек, Е.В. Демидова, В.М. Попик, Т.Н. Горячкова // [Вавиловский журнал генетики и селекции](#). 2016. Т. 20. № 6. С. 876-886.
44. Пискарев, И. М. Инициирование и исследование свободно-радикальных процессов в биологических экспериментах / И. М. Пискарев, И. П. Иванова, А. Г. Самоделкин, М. Н. Иващенко // — Н. Новгород: ФГБОУ ВО Нижегородская ГСХА, 2016. — 140 с.
45. Поляк М.С., Сухаревич В.И., Сухаревич М.Э. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии. СПб: ЭЛБИ, 2008. - С. 78-96
46. Постникова, Л.Б. Оксидативный стресс, индуцированный антибактериальными препаратами, и антибиотикорезистентность бактерий / Л.Б. Постникова, С.К. Соодаева, И.А. Климанов, Н.И. Кубышева, К.И. Афиногенов, М.В. Глухова, Л.Ю. Никитина // [Пульмонология](#). 2017. Т. 27. № 5. С. 664-671.
47. Проскурнина, Е.В. Свободные радикалы как участники регуляторных и патологических процессов / Е.В. Проскурнина, Ю.А. Владимиров // Сборник: [Фундаментальные науки – медицине. Биофизические медицинские технологии. Под редакцией А.И. Григорьева и Ю.А. Владимирова](#)
48. Романцева, Ю.Н. Усовершенствование питательных сред с использованием пантолизата / Ю.Н. Романцева // [Вестник Алтайского государственного аграрного университета](#). 2018. № 7 (165). С. 127-132.
49. Рекша, В. Э. Антиоксиданты и свободные радикалы / В. Э. Рекша // В сборнике: ДЕКАДА ЭКОЛОГИИ. материалы XI Международного конкурса. 2017. С. 126-129.

50. Скоморина, Ю.А. Сравнительная оценка дифференциальнодиагностических сред для выделения *Escherichia coli* с целью применения в ветеринарных лабораториях / Ю.А. Скоморина, А.А. Кремлева, Л.Ш. Ахметова, Т.А. Подольская, А.П. Шепелин, О.В. Полосенко // [Бактериология](#). 2020. Т. 5. № 2. С. 24-32.
51. Ситникова, О. Г. Исследование хемилюминесценции сыворотки крови в присутствии нанокompозита полистирол/бентонит/ магнетит in vitro / О. Г. Ситникова, О. В. Алексеева, М. М. Клычева, А. Н. Родионова, С. Б. Назаров, А. В. Агафонов // [Таврический медико-биологический вестник](#). 2018. Т. 21. № 2-1. С. 83-87.
52. Сутормина, Л.В. Исследование бактериостатической и антиоксидантной активности экстракта левзеи сафлоровидной (*Rhaponticum carthamoides*) в растущих культурах *Escherichia coli* / Л.В. Сутормина, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // [Химия. Экология. Урбанистика](#). 2020. Т. 2020-2. С. 191-195.
53. Сулейманова, А.Д. Роль минеральных веществ в регуляции процессов свободно-радикального окисления в организме / А.Д. Сулейманова, Е.Н. Любина // [Actualscience](#). 2016. Т. 2. № 1. С. 7-8.
54. Ситникова, О. Г. Исследование общей антиокислительной активности пуповинной крови и лизата клеток сосудов пуповины новорожденных методом хемилюминесценции / О. Г. Ситникова, И. Г. Попова, С. Б. Назаров, Г. Н. Кузьменко, М. М. Клычева // [Таврический медико-биологический вестник](#). 2017. Т. 20. № 2-2. С. 151-153.
55. Тарасенко, Е.А. Определение свободно-радикальной активности твердых веществ с помощью системы химических реагентов / Е.А. Тарасенко, Е.А. Гудкова // [Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки](#). 2016. № 18 (239). С. 104-107.
56. Теселкин, Ю.О. Модифицированный хемилюминесцентный метод определения антиоксидантной способности биологических жидкостей и

- тканей / Ю.О. Теселкин, И.В. Бабенкова, А.Н. Осипов // [Биофизика](#). 2019. Т. 64. № 5. С. 883-892.
57. Фархутдинов, Р.Р. Методики исследования хемилюминесценции биологического материала на хемилюминометре ХЛ-003/Р.Р. Фархутдинов, С.И. Тевдорадзе // Методы оценки антиоксидантной активности биологически активных веществ. М., РУДН. 2005. - с.147-154.
58. Фархутдинов, Р.Р. Влияние питательных сред на процессы свободнорадикального окисления/Р.Р. Фархутдинов, И.В. Петрова, К.С. Мочалов, Д.Р. Гизатуллина, К.О. Эксакустиди, А.А. Алимгулова//Биорадикалы и антиоксиданты. 2016. Т. 3. № 4. - с. 18-21.
59. Фархутдинов, Р.Р. Хемилюминесцентные методы исследования свободно-радикального окисления в медицине / Р.Р. Фархутдинов, В.А. Лиховских // Уфа 1995, 90 с.
60. Фурман, Ю. В. Окислительный стресс и антиоксиданты / Ю. В. Фурман, Е. Б. Артюшкова, А. В. Аниканов // [Актуальные проблемы социально-гуманитарного и научно-технического знания](#). 2019. № 1 (17). С. 1-3.
61. Ходос, М.Я. Мониторинг окислительного стресса в биологических объектах / М.Я. Ходос, Я.Е. Казаков, М.Б. Видревич, Х.З. Брайнина // [Вестник Уральской медицинской академической науки](#). 2017. Т. 14. № 3. С. 262-274.
62. Ходос, М.Я. Окислительный стресс и его роль в патогенезе / М.Я. Ходос, Я.Е. Казаков, М.Б. Видревич, Х.З. Брайнина // [Вестник Уральской медицинской академической науки](#). 2017. Т. 14. № 4. С. 381-398.
63. Шаповалов, Ю.А. Радикалы в структурах клетки / Ю.А. Шаповалов, П.П. Гладышев, С.Т. Тулеуханов, Е.В. Швецова, Ж.Т. Абдрасулова // [Биофизика](#). 2020. Т. 65. № 4. С. 691-704.
64. Шичкова, Ю.С. Роль путей клеточной сигнализации в развитии последствий окислительного стресса / Ю.С. Шичкова // [Научный электронный журнал Меридиан](#). 2020. № 3 (37). С. 6-8.

65. Шлапакова, Т. И. Активные формы кислорода: участие в клеточных процессах и развитии патологии / Т. И. Шлапакова, Р. К. Костин, Е. Е. Тягунова // [Биоорганическая химия](#). 2020. Т. 46. [№ 5](#). С. 466-485.

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.ВУЗ

Автор работы: Разетдинова А. Р.
Самоцитирование
рассчитано для: Разетдинова А. Р.
Название работы: Антиоксидантная активность пробиотических комплексов для полости рта
Тип работы: Выпускная квалификационная работа
Подразделение: Башкирский Государственный Медицинский Университет

РЕЗУЛЬТАТЫ

■ ОТЧЕТ О ПРОВЕРКЕ КОРРЕКТИРОВАЛСЯ: НИЖЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ ДО КОРРЕКТИРОВКИ

СОВПАДЕНИЯ	29.64%	СОВПАДЕНИЯ	29.13%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	48.79%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	70.26%
ЦИТИРОВАНИЯ	21.57%	ЦИТИРОВАНИЯ	0.62%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

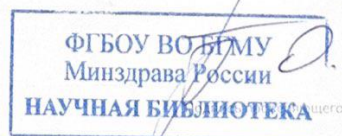
ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 25.06.2024

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 25.06.2024 14:24

Структура документа: Проверенные разделы: библиография с.40-48, титульный лист с.1, содержание с.2, основная часть с.3-39
Модули поиска: Цитирование; Перефразирования по коллекции IEEE; Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте; Перефразирования по коллекции издательства Wiley; IEEE; ИПС Адилет; Шаблонные фразы; СМИ России и СНГ; Переводные заимствования*; Библиография; СПС ГАРАНТ: аналитика; Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте; Публикации eLIBRARY; Перефразирования по Интернету (EN); Переводные заимствования по Интернету (EnRu); Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте; Диссертации НББ; Кольцо вузов; Коллекция НБУ; Сводная коллекция ЭБС; Издательство Wiley; Перефразирования по Интернету; Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования); Переводные заимствования

Работу проверил: Банникова Ольга Сергеевна
ФИО проверяющего

Дата подписи: 25.06.2024



Чтобы убедиться
в подлинности справки, используйте QR-код,
который содержит ссылку на отчет.

Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.
Предоставленная информация не подлежит использованию
в коммерческих целях.