

С.В. Пилипенко, А.А. Коваль, А.Г. Бажан

Полтавський національний педагогічний університет імені В.Г. Короленка
вул. Остроградського, 2, Полтава, 36003, Україна
pnpuzoo@gmail.com

ФУНКЦІОНУВАННЯ СИСТЕМИ NO В СИРОВАТЦІ КРОВІ І СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ШЛУНКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ГІПОАЦИДНОСТІ ШЛУНКОВОГО СОКУ ТА ЗАСТОСУВАННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКІВ

За умов дисбактеріозу у шлунку, що був спричинений 28-денним введенням омепразолу, зростає продукція NO у сироватці крові і слизовій оболонці шлунка. Для усунення дисбактеріозу ми запропонували використання мультипробіотиків «Симбітер» і «Анібакт» та спрямували дослідження на визначення вмісту нітрит-іонів (NO_2^-) у досліджуваних середовищах у щурів із тривалою гіпоацидністю шлункового соку, викликаного омепразолом, за умов сумісного введення омепразолу та зазначених мультипробіотиків.

У результаті проведених досліджень нами встановлено, що при сумісному 28-денному введенні омепразолу з мультипробіотиком «Симбітер» або з мультипробіотиком «Анібакт» вміст нітрит-іонів у сироватці крові статистично достовірно не відрізнявся від контролю.

У слизовій оболонці шлунка мультипробіотики «Симбітер» і «Анібакт» приблизно однаково зменшували вміст нітрит-іонів – на 24,9% ($p < 0,05$) та 20,2% ($p < 0,05$) відповідно, у порівнянні з групою щурів, яким упродовж 28-ми днів вводили лише омепразол. При цьому вміст нітрит-іонів у слизовій оболонці шлунку щурів залишався достатньо високим і був більшим у порівнянні з контролем на 83,9% ($p < 0,05$) та 95,4% ($p < 0,05$) відповідно.

Одержані дані корелювали зі змінами активності синтази оксиду азоту (NOS). Так, після одночасного введення омепразолу і мультипробіотика «Симбітер» та омепразолу і мультипробіотика «Анібакт» активність NOS зменшувалась на 16,3% ($p < 0,05$) і 14,4% ($p < 0,05$) відповідно. Як і у випадку із вмістом нітрит-іонів, активність NOS не відновлювалась до контрольних значень і залишалася більшою на 106,5% ($p < 0,05$) і 111,3% ($p < 0,05$) відповідно у порівнянні з контролем.

Отже, випробовувані мультипробіотики «Симбітер» та «Анібакт» справляли найбільший вплив на вміст нітрит-іонів у сироватці крові, який зменшувався до показників контролю. У слизовій оболонці шлунка мультипробіотики, усуваючи дисбактеріоз, зменшували, але не відновлювали вміст нітрит-іонів до рівня контролю.

Ключові слова: гіпохлоргідрія, пробіотики, слизова оболонка шлунка, нітрит-іони.

Дослідження проведені в рамках наукової теми Навчально-наукового центру «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка як складова частина комплексної теми «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій», № держреєстрації – 0111U004648.

Вступ. Функціональні порушення моторики є одним із найбільш частих проявів патології шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Регуляція моторики шлунково-кишкового тракту має багаторівневий характер і здійснюється на рівні центральної та периферичної нервової системи, вегетативної нервової системи, на місцевому рівні безпосередньо (в ШКТ). Значний внесок у місцеву регуляцію моторики вносять запальні процеси, викликані дисбактеріозом. Дані про те, що NO викликає розслаблення гладеньких м'язів стінки травного тракту, не викликають сумніву [4]. Отже, важливим є дослідження функціонування системи NO в сироватці крові та слизовій оболонці шлунку щурів за умов тривалої гіпоацидності шлункового соку, адже виявлене нами пригнічення моторики шлунку після 28 днів введення омепразолу може бути наслідком підвищення генерації NO у слизовій оболонці шлунка.

Метою даної роботи є дослідити функціонування системи NO в сироватці крові та слизовій оболонці шлунку щурів за умов тривалої гіпоацидності шлункового соку та застосування мультипробіотичних препаратів Симбітер® та Апібакт®.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проведені на 40 білих нелінійних щурах-самцях із початковою вагою 160–180 г, яких утримували в акредитованому виварії Навчально-наукового центру «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка згідно зі «Стандартними правилами по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (виваріїв)». Всі експерименти проведені відповідно до Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Усі тварини були розподілені на чотири експериментальні групи. Перша група тварин слугувала контролем. Їм упродовж 28 днів вводили один раз на добу внутрішньоочеревинно (в/о) 0,2 мл та перорально (п/о) 0,5 мл води для ін'єкцій. Тваринам другої групи один раз на добу упродовж 28 днів вводили омепразол та п/о 0,5 мл води для ін'єкцій. Тваринам третьої групи один раз на добу упродовж 28 днів сумісно вводили омепразол та мультипробіотик «Симбітер® ацидофільний» концентрований (Симбітер). Тваринам четвертої групи один раз на добу упродовж 28 днів сумісно вводили омепразол та мультипробіотик «Апібакт®» (Апібакт).

Омепразол (виробництва «Sigma-Aldrich», США) вводили в/о в дозі 14 мг/кг, розчинений в 0,2 мл води для ін'єкцій. Мультипробіотики Симбітер і Апібакт (виробництва НВК «О.Д. Пролісок», Україна) вводили сумісно з омепразолом п/о в дозі 140 мг/кг ($1,4 \times 10^{10}$ КУО/кг). Мультипробіотики розчиняли в 0,5 мл води для ін'єкцій.

Вміст нітрит-іонів визначали методом Гріса з модифікаціями за [5]. До 200 мкл сироватки вносили 200 мкл 4%-го розчину NaOH, інкубували, перемішували на льодяній бані протягом 10 хв, а потім додавали 400 мкл дистильованої води та 1,2 мл 4%-го ZnSO₄. Витримували на льодяній бані 10 хв та центрифугували протягом 20 хв при 0...+4°C зі швидкістю 15000 об/хв. Відбирали 1,4 мл супернатанту, додавали 1,4 мл реактиву Гріса, що складався із суміші 1:1 0,1%-го розчину α -нафтилетилендіаміну на 5%-ій ортофосфорній кислоті та 1%-го розчину сульфанілової кислоти на 5%-ій ортофосфорній кислоті. Пробу інкубували 10–15 хв у темному місці. Вимірювали екстинцію при 550 нм. Вміст NO₂⁻ визначали за калібрувальним графіком, який був побудований при використанні різних концентрацій NaNO₂.

Активність синтази оксиду азоту (NOS) (КФ 1.14.13.39) вимірювали за методом [9], який полягає у визначенні приросту продуктів аеробного окислення оксиду азоту. В інкубаційне середовище на основі 2,5 мл 0,1 М тріс-НСІ буферу, рН 7,4, що містило 10 мМ хлористого кальцію, додавали 0,3 мл 320 мкМ водного розчину аргініну і 0,1 мл 1 мМ водного розчину НАДФН+. Реакцію запускали внесенням 0,5 мл гомогенату клітин і слизових оболонок. Пробу перемішували й одразу відбирали аліквоту 0,2 мл для визначення вмісту продуктів аеробного окислення оксиду азоту. Решту проби інкубували 30 хв при 37°C. Реакцію зупиняли внесенням 0,02 мл 0,02%-го водного розчину азиду натрію.

Для визначення вмісту продуктів аеробного окислення оксиду азоту відібрану аліквоту вносили в 1,8 мл дистильованої води, додавали 0,2 мл 1%-го розчину сульфанілової кислоти у 5%-му розчині фосфорної кислоти. Залишали на 7 хв у темному місці при кімнатній температурі. Додавали 0,2 мл 1%-го водного розчину альфа-нафтилетилендіаміну, перемішували, залишали в темному місці при кімнатній температурі на 10 хв. Після цього вимірювали екстинкцію на спектрофотометрі при довжині хвилі 539 нм.

Активність синтази оксиду азоту розраховували за формулою

$$E = \frac{C \times 82}{N \times 30xv},$$

де С – приріст вмісту NO_2^- , нмоль/мл;

N – вміст білку, мг/мл.

До 0,2 мл гомогенату клітин і слизових оболонок додавали 1,8 мл дистильованої води, 0,2 мл 1%-го розчину сульфанілової кислоти в 5%-му розчині фосфорної кислоти. Залишали на 7 хв в темному місці при кімнатній температурі. Додавали 0,2 мл 1%-го водного розчину альфа-нафтилетилендіаміну, перемішували, залишали в темному місці при кімнатній температурі на 10 хв. Після цього вимірювали екстинкцію на спектрофотометрі при довжині хвилі 539 нм. Вміст NO_2^- визначали за калібрувальним графіком, який був побудований при використанні різних концентрацій NaNO_2 .

Статистичну обробку даних здійснювали у пакеті програм «Statistica 8.0». Для перевірки вибірок на вид розподілу досліджуваного показника використовували W критерій Шапіро-Уїлка. Якщо розподіл даних вибірок не відповідав розподілу Гауса, то для порівняння вибірок використовували непараметричний метод – ранговий критерій груп U-тест Мана-Вітні для порівняння двох незалежних вибірок. У цьому випадку отримані дані представляли у вигляді медіани Me, 25% і 75%. За нормального розподілу досліджуваного показника достовірність різниці даних у вибірках оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента для незалежних вибірок. При цьому розраховували середнє значення (M) і стандартну похибку середнього (m) [2].

Результати досліджень та їх обговорення. Встановлено, що у щурів контрольної групи концентрація нітрит-іонів у сироватці крові складала $4,64 \pm 0,42$ нмоль/мг білка (рис. 1). Через день після останнього введення омепразолу концентрація NO_2^- у сироватці крові збільшувалась на 20% ($p < 0,05$). Зростання концентрації нітрит-іонів у слизовій оболонці шлунку після 28-денного пригнічення секреції НСІ у цьому органі складало 144% ($p < 0,05$) (рис. 2). Таке збільшення концентрації NO_2^- у слизовій шлунку свідчить про розвиток запального процесу, що є результатом, насамперед, дисбактеріозу, який виникає на тлі тривалого пригнічення секреції НСІ у шлунку.

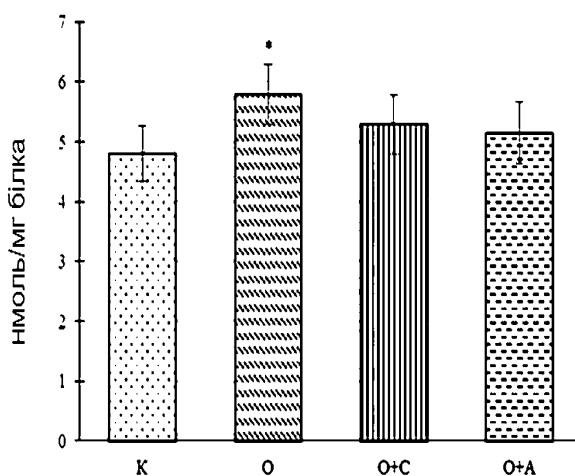


Рис. 1. Вміст нітрит-іонів у сироватці крові щурів, (M±m):

К – контрольна група (n=10); О – група щурів після 28-денного введення омепразолу (n=10); О+С – група щурів після 28-денного сумісного введення омепразолу та мультипробіотика «Симбітер» (n=10); О+А – група щурів після 28-денного сумісного введення омепразолу та мультипробіотика «Апібакт» (n=10); * – $p < 0,05$ у порівнянні з контролем.

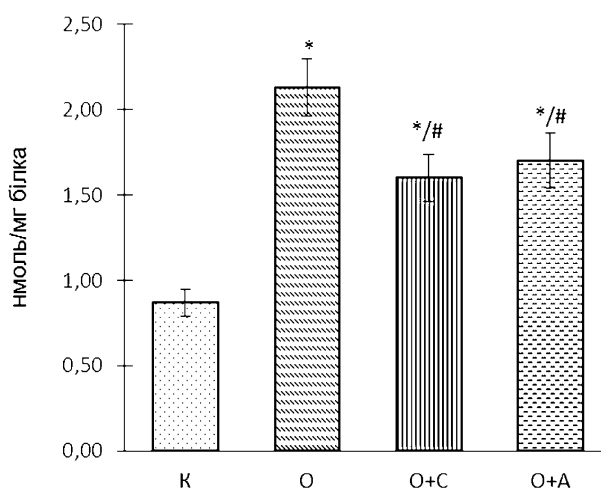


Рис. 2. Вміст нітрит-іонів у слизовій оболонці шлунка щурів, (M±m):

К – контрольна група (n=10); О – група щурів після 28-денного введення омепразолу (n=10); О+С – група щурів після 28-денного сумісного введення омепразолу та мультипробіотика «Симбітер» (n=10); О+А – група щурів після 28-денного сумісного введення омепразолу та мультипробіотика «Апібакт» (n=10); * – $p < 0,05$ у порівнянні з контролем; # – $p < 0,05$ у порівнянні з групою щурів, яким вводили лише омепразол.

Бактеріальні продукти у шлунку стимулюють активність індукцибельної синтази оксиду азоту (iNOS) імунокомпетентних, епітеліальних та інших клітин [10]. Оскільки зростання синтезу NO_2^- є результатом збільшення активності синтази оксиду азоту (NOS), наші подальші дослідження були спрямовані на визначення активності NOS у слизовій оболонці шлунку після тривалого введення щурам омепразолу та після тривалого сумісного введення омепразолу і мультипробіотиків.

Визначення активності NOS у слизовій оболонці шлунка показало її зростання на 146,8% ($p < 0,05$) (рис. 3). Одержані дані (зростання активності NOS та вмісту NO_2^-) на тлі запального процесу, доведеного морфологічними дослідженнями [1, 3], та дисбактеріозу у слизовій оболонці шлунку, спричиненого 28-денним введенням омепразолу, дозволяють зробити висновок про активацію саме iNOS.

Дані відносно вмісту нітрит-іонів у слизовій оболонці шлунка щурів після 28-денного сумісного введення омепразолу з мультипробіотиками корелювали зі змінами активності NOS. Після одночасного введення омепразолу і мультипробіотика «Симбітер» та омепразолу і мультипробіотика «Апібакт» активність NOS зменшувалась на 16,3% ($p < 0,05$) і 14,4% ($p < 0,05$) відповідно. Як і у випадку із вмістом нітрит-іонів, активність NOS не відновлювалась до контрольних значень і залишалася більшою на 106,5% ($p < 0,05$) і 111,3% ($p < 0,05$) відповідно у порівнянні з контролем.

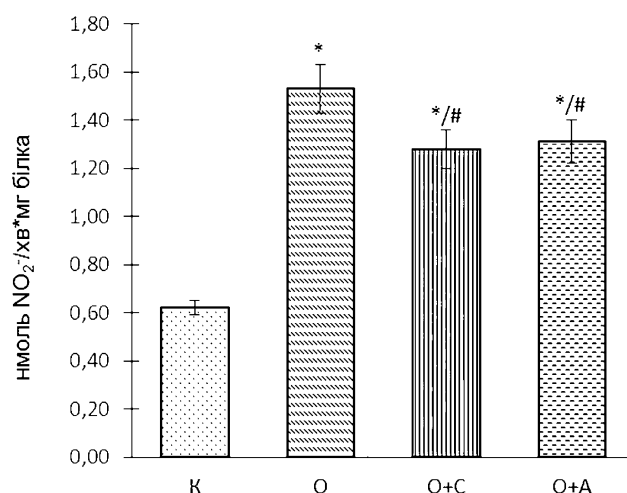


Рис. 3. Активність синтази оксиду азоту в слизовій оболонці шлунка, ($M \pm m$):

К – контрольна група ($n=10$); О – група щурів після 28-ми денного введення омепразолу ($n=10$); О+С – група щурів після 28-денного сумісного введення омепразолу та мультипробіотика «Симбітер» ($n=10$); О+А – група щурів після 28-денного сумісного введення омепразолу та мультипробіотика «Апібакт» ($n=10$); * – $p < 0,05$ у порівнянні з контролем; # – $p < 0,05$ у порівнянні з групою щурів, яким вводили один омепразол.

Відомо що, деякі бактерії здатні утворювати оксид азоту NO із нітроген-умісних продуктів [8]. NO не тільки бере участь у регуляції імунних реакцій та розвитку запалення [12], він залучений до регуляції ряду фізіологічних функцій і патогенезу багатьох захворювань [6], в тому числі і травного тракту [11]. Доведено, що NO

гальмує скорочення гладеньких м'язів шлунку [7]. Гальмування оксидом азоту моторики шлунка супроводжується розслабленням нижнього стравохідного сфінктера [13], що, на нашу думку, сприятиме заселенню цього органу бактеріями із рота та глотки.

У слизових оболонках травного тракту за умов розвитку дисбактеріозу збільшується синтез NO, який ще більше ускладнює запалення. Зважаючи на те, що NO розслаблює гладенькі м'язи, а його рівень не відновлюється до рівня контролю у слизовій оболонці шлунку після сумісного введення мультипробіотиків і омепразолу, стає зрозумілим, чому моторна активність шлунку та товстої кишки у даній групі щурів відновлюється не повністю.

Висновки. Отже, у результаті проведених досліджень нами встановлено, що при сумісному 28-денному введенні омепразолу з мультипробіотиком «Симбітер» або з мультипробіотиком «Апібакт» вміст нітрит-іонів у сироватці крові статистично достовірно не відрізнявся від контролю.

У слизовій оболонці шлунка мультипробіотики «Симбітер» і «Апібакт» приблизно однаково зменшували вміст нітрит-іонів – на 24,9% ($p < 0,05$) та 20,2% ($p < 0,05$) відповідно, у порівнянні з групою щурів, яким упродовж 28 днів вводили лише омепразол. При цьому вміст нітрит-іонів у слизовій оболонці шлунку щурів залишався достатньо високим і був більшим у порівнянні з контролем на 83,9% ($p < 0,05$) та 95,4% ($p < 0,05$) відповідно.

Визначення активності NOS у слизовій оболонці шлунка показало її зростання після 28-денного введення омепразолу на 146,8% ($p < 0,05$). Після тривалого сумісного введення омепразолу і мультипробіотика «Симбітер» та омепразолу і мультипробіотика «Апібакт» активність NOS зменшувалась, але не відновлювалась до контрольних значень.

Таким чином, випробовувані мультипробіотики «Симбітер» та «Апібакт» справляли найбільший вплив на вміст нітрит-іонів у сироватці крові, який зменшувався до показників контролю. У слизовій оболонці шлунка мультипробіотики, усуваючи дисбактеріоз, зменшували, але не відновлювали вміст нітрит-іонів до рівня контролю.

Перспективою подальших досліджень у цьому напрямку є вивчення впливу мультипробіотиків на вміст нітрит-іонів та активність синтази оксиду азоту у товстій кишці щурів за умов тривалої гіпоацидності шлункового соку.

Список використаної літератури:

1. Вороніна О. Ультраструктурний аналіз клітин слизової оболонки фундального відділу шлунка щурів при гіпергастринемії / О. Вороніна, В. Гришук, М. Держинський // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. – 2007. – № 49. – С. 13–15.
2. Гланц Г. Медико-биологическая статистика / Г. Гланц. – М. : Практика, 1999. – 459 с.
3. Порівняльна характеристика впливу мультипробіотиків «Симбітер® ацидофільний» концентрований та «Апібакт®» на морфометричні показники слизової оболонки товстої кишки щурів за умов тривалої гіпергастринемії / О.М. Радчук [та ін.] // Вісник морфології. – 2009. – № 5(1). – С. 7–12.
4. Ремизова М.И. Роль оксида азота в норме и при патологии / М.И. Ремизова // Вестн. службы крови России. – 2000. – № 2. – С. 634–651.

5. Analysis of nitrate, nitrit and [15N] nitrate in biological fluids / L.C. Green [et al.] // *Anal. Biochem.* – 1982. – Vol. 126, № 1. – P. 131–138.
6. Bredt D.S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology / D.S. Bredt // *Free Radical Res.* – 1999. – Vol. 31. – P. 577–596.
7. Dietary polyphenols generate nitric oxide from nitrite in the stomach and induce smooth muscle relaxation / B.S. Rocha [et al.] // *Toxicology.* – 2009. – Vol. 265, № 1–2. – P. 41–48.
8. Heme-dependent and heme-independent nitrite reduction by lactic acid bacteria results in different N-containing products / G. Wolf [et al.] // *Int. J. Food Microbiol.* – 1990. – Vol. 10. – P. 323–329.
9. Hevel J.M. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase / J.M. Hevel, K.A. White, M.A. Marletta // *J. Biol. Chem.* – 1991. – Vol. 266, № 34. – P. 22789–22791.
10. Kroncke K.D. Inducible nitric oxide synthase in human diseases / K.D. Kroncke, K. Fehsel, V. Kolb-Bachofen // *Clin. Exp. Immunol.* – 1998. – Vol. 113. – P. 147–156.
11. Niedbala W. Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions / W. Niedbala, B. Cai, F.Y. Liew // *Ann. Rheum Dis.* – 2006. – Vol. 65 – P. 37–40.
12. Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology / E. Peranzoni [et al.] // *Immunobiology.* – 2007. – Vol. 212, № 9–10. – P. 795–812.
13. Tottrup A. The role of the L-arginine/nitric oxide pathway for relaxation of the human lower oesophageal sphincter / A. Tottrup, L. Ny, P. Alm // *Acta Physiol Scand.* – 1993. – Vol. 149. – P. 451–459.

Рекомендує до друку О.В. Катрушов

Отримано 01.04.2018 р.

С.В. Пилипенко, А.А. Коваль, А.Г. Бажан

Полтавский национальный педагогический университет имени В.Г. Короленко

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ NO В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОЙ ГИПОАЦИДНОСТИ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА И ПРИМЕНЕНИЯ МУЛЬТИПРОБИОТИКОВ

В условиях дисбактериоза желудка, вызванного 28-дневным введением омепразола, возрастает продукция NO в сыворотке крови и слизистой оболочке желудка. Для устранения дисбактериоза мы предложили использование мультипробиотиков «Симбитер» и «Апибакт» и направили исследования на определение содержания нитрит-ионов (NO_2^-) в изучаемых средах крыс с длительной гипоацидностью желудочного сока, вызванного омепразолом, в условиях введения омепразола и упомянутых мультипробиотиков.

В результате проведенных исследований нами установлено, что при совместном 28-дневном введении омепразола с мультипробиотиком «Симбитер» или с мультипробиотиком «Апибакт» содержание нитрит-ионов в сыворотке крови статистически достоверно не отличалось от контроля.

В слизистой оболочке желудка мультипробиотики «Симбитер» и «Апибакт» приблизительно одинаково снижали содержание нитрит-ионов – на 24,9% ($p < 0,05$) и 20,2% ($p < 0,05$) соответственно, по сравнению с группой крыс, которым в течение 28 дней вводили только омепразол. При этом содержание нитрит-ионов в слизистой оболочке желудка крыс оставалось достаточно высоким по сравнению с контролем на 83,9% ($p < 0,05$) и 95,4% ($p < 0,05$) соответственно.

Полученные данные коррелировали с изменениями активности синтазы оксида азота (NOS). После одновременного введения омепразола и мультипробиотика «Симбитер», а также омепразола и мультипробиотика «Апибакт» активность NOS уменьшалась на 16,3% ($p < 0,05$) и

14,4% ($p < 0,05$) соответственно. Как и в случае с содержанием нитрит-ионов, активность NOS не восстанавливалась до контрольных значений и оставалась большей на 106,5% ($p < 0,05$) и 111,3% ($p < 0,05$) соответственно в сравнении с контролем.

Таким образом, испытываемые мультипробиотики «Симбитер» и «Апибакт» оказывали наибольшее влияние на содержание нитрит-ионов в сыворотке крови, которое уменьшалось до показателей контроля. В слизистой оболочке желудка мультипробиотики, устраняя дисбактериоз, уменьшали, но не восстанавливали содержание нитрат-ионов до уровня контроля.

Ключевые слова: гипохлоргидрия, пробиотики, слизистая оболочка желудка, нитрит-ионы.

S.V. Pylypenko, A.A. Koval, A.G. Bagan

Poltava V.G. Korolenko National Pedagogical University

FUNCTIONING OF THE NO SYSTEM IN THE BLOOD SERUM AND MUCOUS MEMBRANE OF THE STOMACH OF RATS IN CONDITIONS OF PROLONGED HYPOACIDITY OF GASTRIC JUICE AND USING OF MULTIPROBIOTICS

In conditions of dysbacteriosis of the stomach caused by the 28-day administration of omeprazole, the production of NO in the blood serum and gastric mucosa increases. To eliminate dysbacteriosis, we proposed the use of the multiprobiotics «Symbiter» and «Apibakt» and directed the studies to determine the content of nitrite ions (NO_2^-) in the studied media of rats with prolonged gastric juice hypoacidity caused by omeprazole under the conditions of administration of omeprazole and the mentioned multiprobiotics.

As a result of our studies, we found that during the 28-day introduction of omeprazole with the multiprobiotic «Symbiter» or with the multiprobiotic «Apibakt» the content of nitrite ions in the serum was not statistically significantly different from the control.

In gastric mucosa, the multiprobiotics «Symbier» and «Apibakt» that are approximately the same decreased the content of nitrite ions by 24,9% ($p < 0,05$) and 20,2% ($p < 0,05$) respectively, compared to the group of rats, which for 28 days were administered only omeprazole. At the same time, the content of nitrite ions in the mucous membrane of the stomach of rats remained quite high in comparison with the control by 83,9% ($p < 0,05$) and 95,4% ($p < 0,05$) respectively.

The data obtained correlated with changes in the activity of nitric oxide synthase (NOS). After simultaneous administration of omeprazole and multiprobiotic «Symbiter», as well as omeprazole and multiprobiotic «Apibakt», NOS activity decreased by 16,3% ($p < 0,05$) and 14,4% ($p < 0,05$) respectively. As with the content of nitrite ions, NOS activity did not return to control values and remained higher by 106,5% ($p < 0,05$) and 111,3% ($p < 0,05$) respectively, compared with the control.

Thus, the probable multiprobiotics «Symbier» and «Apibakt» had the greatest influence on the content of nitrite ions in the blood serum, which decreased to the control parameters. In the gastric mucosa, multiprobiotics, which eliminated dysbacteriosis, reduced, but did not restore the content of nitrate ions to the level of control.

Key words: hypochlorhydria, probiotics, mucous membrane of the stomach, nitrite ions.