



УДК 616.33-002.44:539.1.047

© 2007

Академік НАН України **М. Є. Кучеренко**, **К. О. Дворщенко**,
В. А. Ковальова, **О. С. Дворщенко**, **О. О. Моргаєнко**,
Л. І. Остапченко

Ліпідний та білковий склад плазми крові щурів за умов експериментальної виразки шлунка

As a result of experimental ulcerogenesis, there are changes of the lipid and protein compositions in a blood plasma of rats. It is enriched by neutral lipids, and its content of phospholipids varied in different ways. Under stress ulcer, the fraction of proteins with a molecular weight of 23 kDa is revealed.

Одним з актуальних питань сучасної медичної біохімії є вивчення біохімічних особливостей патогенезу виразкової хвороби шлунка. Сьогодні необхідно розглядати виразкову хворобу з позиції системних захворювань, оскільки в цей процес залучаються інші органи травного тракту, а також нервова, імунна та інші системи організму [1].

Розвиток та прогресування даної патології обумовлені змінами у різних біохімічних процесах, у тому числі активності перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та антиоксидантного захисту (АОЗ), що призводить до порушення структури як клітинної мембрани, так і інших внутрішньоклітинних органел [2]. Провідна роль ліпідів та білків у структурі та фізико-хімічних властивостях біомембран є важливим фактором, що впливає на цілісність та функціональну активність окремих тканин і систем. Показники білково-ліпідного обміну плазми крові є важливими маркерами функціонального стану метаболічних систем організму, а визначення їх складу та вмісту може бути важливим діагностичним та прогностичним показником при різних патологічних станах, зокрема при виразковій хворобі шлунка.

Численні дослідження по вивченню механізмів виникнення виразки шлунка до цього часу носили розрізнений характер і були направлені майже виключно на уточнення уявлень про відмінності між видами виразки, а не на пошук патогенетичних механізмів, спільних для всіх видів та ступенів виразки.

Метою даної роботи було дослідити ліпідний та білковий склад плазми крові щурів за умов різних експериментальних виразок (етанолової та стресової).

Матеріали та методи досліджень. У досліджах використовували щурів лінії Вістар вагою 180–230 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Етанолова модель виразки шлунка викликала пероральним введенням 80% етилового спирту загальноприйнятим методом [3]. Для моделювання виразки шлунка у тварин, що є наближеною за етіологією та патогенезом до виразки шлунка людини, використовували модифіковану методику “іммобілізаційного стресу” [4]. Для цього щурів розміщували у металевих перфорованих патронах з прозорим дном. Патрони розташовували у клітці з щурами, необмеженими у своїх рухах. Через 24 год щурів виймали з патронів та декапітували. Середній показник уражень шлунка в кожному експерименті розраховували за методикою роботи [5]. Забір крові проводили при декапітації тварин у пробірки, що містили гепарин. Плазму одержували центрифугуванням крові при 3000 об/хв протягом 15 хв. Ліпіди екстрагували хлороформ-метанольною сумішшю (2 : 1 за об’ємом) за допомогою модифікованого методу [6]. Для запобігання окиснення ліпідів у розчинники додавали антиоксидант іюнол. Промиті й очищені від водорозчинних компонентів ліпідні екстракти зразків випарювали в атмосфері азоту, а потім розчиняли в 1 мл суміші хлороформ : метанол (1 : 1). Для вивчення якісного і кількісного складу нейтральних та полярних ліпідів застосовували метод тонкошарової хроматографії. Розділення ліпідів проводили на пластинках “Silica gel 60” (Merk, Germany). Пластини попередньо активували протягом 30 хв при 110 °С. Рухома фаза для поділу нейтральних ліпідів містила гексан, діетиловий ефір, мурашину кислоту у співвідношенні 80 : 20 : 2, для фосфоліпідів містила хлороформ, метанол, воду в співвідношенні 50 : 25 : 4. Перед хроматографуванням пластини насичували парами розчинника протягом 5 хв. Хроматографію проводили в скляній камері. Потім пластину висушували, обробляли сірчаною кислотою, після цього пластину витримували 30 хв на повітрі, потім поміщали в термостат на 4 хв при 140 °С до потемніння ліпідних фракцій. Для кількісного визначення ліпідних фракцій проводили сканування пластин на денситометрі “Camag” (Швейцарія). Ідентифікацію індивідуальних ліпідів здійснювали за допомогою відповідних стандартів.

Якісний аналіз білкового складу клітин слизової оболонки шлунка проводили за допомогою ДСН-електрофорезу у 10%-му поліакриламідному гелі за методом Леммлі [7]. Для оцінки результатів електрофорезу використовували програму TotalLab 1.0.

Усі показники розраховували на 1 мг білка клітин слизової оболонки шлунка. Концентрацію білка визначали за методом Лоурі.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням *t*-критерію Ст’юдента. Вірогідною вважали різницю між порівнювальними показниками при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Активація фізико-хімічних процесів ПОЛ, яка спостерігається при виразковій хворобі у ліпідних структурах мембран клітин слизової оболонки шлунка, безпосередньо впливає і на стан вбудованих у мембрани білків, що також порушує фундаментальні функції мембранного комплексу (проникність, активний транспорт, поляризацію, дію ферментів). У безпосередньому зв’язку з активацією вільнорадикальної пероксидації (ВРП) розвивається і процес ендогенного фосфоліпазного гідролізу з відокремленням та видаленням з ліпідного бішару мембран окиснених (внаслідок ПОЛ) фрагментів молекул фосфоліпідів вільних жирних кислот та переведенням їх з гідрофобного у гідрофільний стан [8]. У подальшому вони вимиваються у кров та екскретуються.

Згідно з отриманими результатами по дослідженню ліпідного складу плазми крові щурів за умов виразки, значним змінам піддається як вміст нейтральних ліпідів, так і фосфоліпідів.

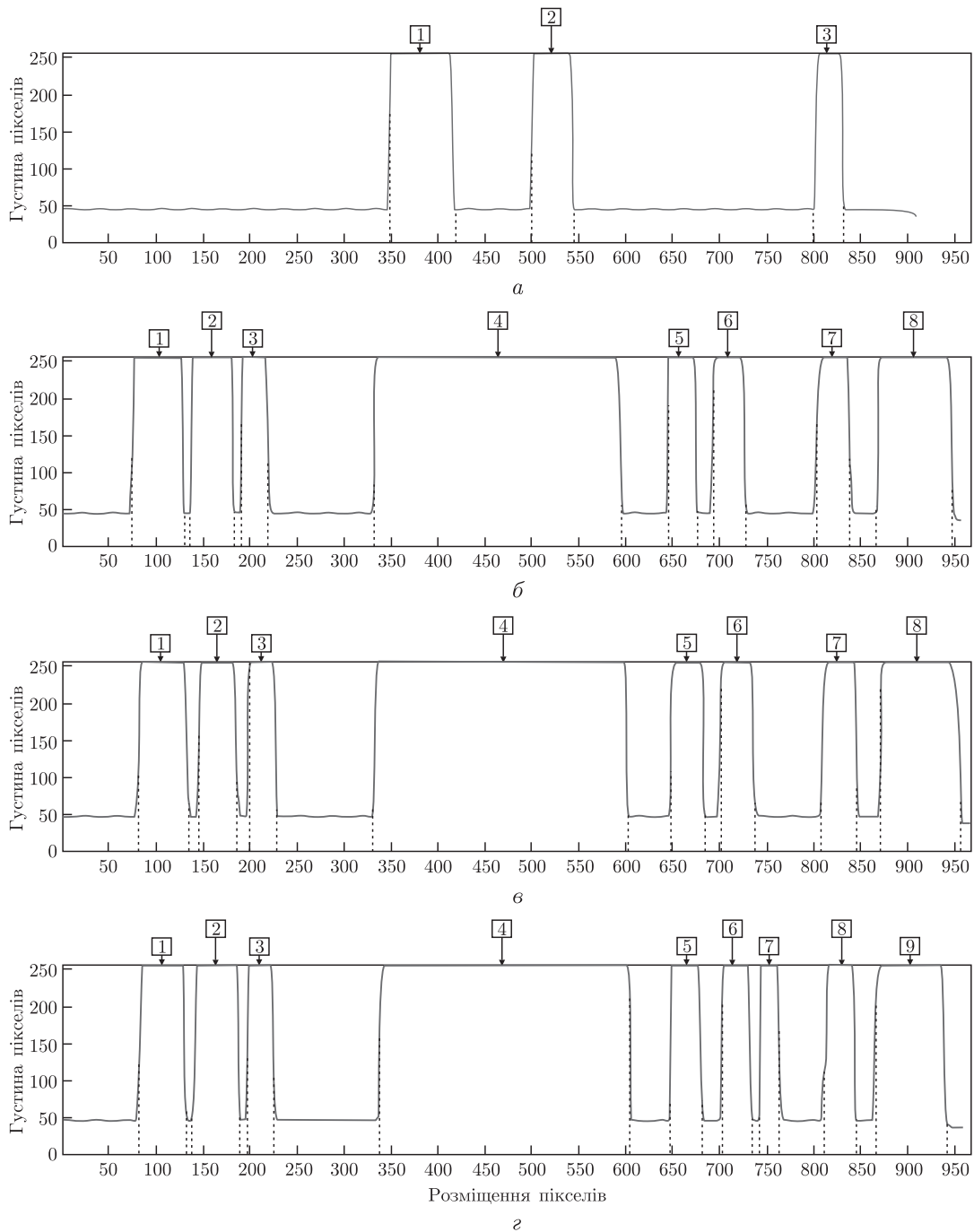


Рис. 1. Денситограма білків: *а* — стандарти (бичачий сироватковий альбумін, яєчний альбумін, лізоцим); *б, в, г* — плазма крові (*б* — контроль, *в* — етанолова виразка, *г* — стресова виразка)

Істотні зміни вмісту нейтральних ліпідів в плазмі крові щурів відзначені за умов етанолової виразки: вміст холестеролу зростає на 25%, триацилгліцеролів — на 82% відносно контролю (табл. 1). Також підвищується вміст жирних кислот — на 63% відносно контрольних тварин. При стресовій моделі виразки в плазмі крові щурів збільшується рівень триацилгліцеролів та жирних кислот на 171 й 50% відповідно.

Таблиця 1. Вміст нейтральних ліпідів в плазмі крові щурів за умов експериментальної виразки шлунка ($M \pm m$; $n = 10$)

Групи тварин	Холестерол, мкг/мг білка	Триацилгліцерол, мкг/мг білка	Жирні кислоти, % відносно контролю
Контроль	14,8 ± 1,2	1,7 ± 0,2	100
Етанолова модель	(18,5 ± 0,7)*	(3,1 ± 0,5)*	163,2*
Стрессова модель	13,8 ± 0,4	(4,6 ± 0,3)*	149,9*

* $p < 0,05$ різниці достовірні відносно контролю.

Таблиця 2. Вміст фосфоліпідів в плазмі крові щурів за умов експериментальної виразки шлунка ($M \pm m$; $n = 10$)

Групи тварин	ЛФХ, мкг/мг білка	ФІ, мкг/мг білка	ФХ, мкг/мг білка	ФЕА, мкг/мг білка
Контроль	1,0 ± 0,2	29,4 ± 2,3	61,2 ± 4,9	7,9 ± 1,6
Етанолова модель	(2,7 ± 0,2)*	(50,0 ± 4,6)*	(106,8 ± 10,2)*	(12,5 ± 1,2)*
Стрессова модель	1,1 ± 0,1	(24,2 ± 2,1)*	(76,1 ± 6,8)*	(5,7 ± 0,9)*

* $p < 0,05$ різниці достовірні відносно контролю.

За умов етанолової виразки при дослідженні фосфоліпідного складу плазми крові щурів встановлені значні зміни вмісту головних фосфоліпідів (табл. 2): підвищення вмісту лізофосфатидилхоліну (ЛФХ) на 170%; фосфатидилінозитулу (ФІ), фосфатидилхоліну (ФХ) — на 70% та фосфатидилетаноламіну (ФЕА) — на 58% відносно контролю. При стресовій виразці шлунка зростає рівень ФХ — на 24%, при цьому вміст ФІ та ФЕА знижується на 18 й 28% відповідно.

Виявлене підвищення вмісту нейтральних та полярних ліпідів у плазмі крові щурів за умов етанолової моделі виразки, можливо, обумовлено прискоренням метаболічних процесів, необхідністю репарації мембран та активацією ПОЛ [9].

При дослідженні загального білкового складу плазми крові щурів, які піддавались дії імобілізаційного стресу, було виявлено групу білків з відносною молекулярною масою 23 кДа (рис. 1).

Згідно з літературними даними відомо, що білки з молекулярною масою від 8 до 27 кДа належать до родини малих стресових білків [10]. Відомо, що MSP23 є макрофагальним стресовим білком, який володіє антиоксидантною активністю. Цей білок залучається у клітинну відповідь на окисний стрес та контролює клітинну проліферацію та диференціацію [11]. Ймовірно, наявність цих білків у крові вказує на включення не специфічного, а загального механізму трансдукції сигналу / відповіді за умов розвитку стресової виразки (при цьому при етаноловій моделі виразки такі білки не виявлялися). Таким чином, можливо, розвиток стресової виразки супроводжується активацією загальних стрес-реакцій, що відображається на зміні білкового складу плазми крові. Відсутність подібних білків при розвитку етанолової виразки вказує на наявність іншого механізму відповіді організму на дію такого ультрогенного фактора як етиловий спирт.

Таким чином, ультрогенез охоплює не лише зміни у травній системі, а й у регуляторних механізмах організму, а зміни у складі крові можуть бути використані як маркери захворювань та застосовуватися у діагностичних цілях.

1. Филипов Ю. А., Шмигель З. Н., Петречук Л. Н., Скирда И. Ю. Уровень распространенности и заболеваемости болезнями органов пищеварения у городских жителей // Гастроэнтерол. – 1999. – Вып. 28. – С. 7–9.
2. Дегтярева И. И., Харченко Н. В. Язвенная болезнь. – Київ: Здоров'я, 1995. – 334 с.

3. *Mosnier P., Rayssiguier Y., Motta C. et al.* Effect of ethanol on rat gastric surfactant: a fluorescence polarization study // *Gastroenterology*. – 1993. – **104**. – P. 179–184.
4. *Гройсман С. Д., Каревина Т. Г.* О влиянии атропина на стрессорные поражения слизистой оболочки желудка у крыс // *Библ. указ. ВИНТИ. Деп. рук. № 452/79–1979*. – № 12. – С. 131.
5. *Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації* // Під ред. О. В. Стефанова. – Київ: Авіцена, 2001. – 528 с.
6. *Kates M.* Techniques of lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids. – Amsterdam: Elsevier, 1986. – 464 p.
7. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – **227**. – P. 680–685.
8. *Коротько Г. Г., Фаустов Л. А.* Функциональные и морфологические аспекты язвенной болезни. – Краснодар: Кубаньпечать, 2002. – 156 с.
9. *Kwiecien S., Brzozowski T., Konturek S. J.* Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2002. – 53(1). – P. 39–50.
10. *Alliva R., Tomasetti M., Andera L. et al.* Coenzyme Q blocks biochemical, but not receptor-mediated apoptosis by increasing mitochondrial antioxidant protection // *FEBS Lett.* – 2001. – **503**. – P. 46–50.
11. *Wen Sh. – T., Etten R. A.* The PFG gene product? the stress-induced protein with antioxidant properties is the Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity // *Genes Devel.* – 1997. – **11**. – P. 2456–2467.

*Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка*

Надійшло до редакції 31.10.2006