

Т.Д. Хілько, І.В. Якубцова, Т.Д. Преображенська, Л.І. Остапченко

Глікопротеїни шлункового і дуоденального слизу при ульцерогенезі та при введенні екстракту фенугреку

Проведено оцінку складу глікопротеїнів шлункового та дуоденального захисного пристінкового шару слизу в нормі, при моделюванні виразок у щурів та на фоні введення тваринам з виразковими ушкодженнями екстракту фенугреку. У нормі загальний рівень глікозилювання глікопротеїнів слизу шлунка у 1,7 раза більше, ніж у дванадцятипалій кишці. За умов стресової моделі виразкоутворення у слизі шлунка спостерігається зменшення вмісту гексозамінів (у 1,4 раза), галактози (у 2,2 раза), фукози (у 1,3 раза) і зростання NANA (у 3,6 раза). При цистеаміновій моделі виразкоутворення у слизі дванадцятипалої кишки підвищувався вміст галактози (у 2,7 раза), NANA (у 2,4 раза), фукози (у 1,8 раза), але суттєво знижувався вміст гексозамінів тричі порівняно з контролем. Доведено захисний вплив екстракту фенугреку на склад глікопротеїнів пристінкового слизу слизових оболонок шлунка та дванадцятипалій кишки за умов моделювання виразкоутворення у щурів.

Ключові слова: виразка шлунка, виразка дванадцятипалої кишки, моносахариди глікопротеїнів, екстракт фенугреку.

ВСТУП

Виразкова хвороба – найбільш поширене захворювання органів травлення, яке являє собою не просто локальний дефект у слизовій оболонці шлунка чи дванадцятипалій кишці (ДПК), а є результатом системного патологічного процесу в організмі людини чи тварини [2, 7]. В останнє десятиліття в Україні значно зросла частота виявлення цієї патології, що пов'язано з несприятливою екологічною ситуацією, дією психоемоційних стресів. Під впливом різних чинників порушуються механізми, що забезпечують відтворення функцій та координацію системи саморегуляції. Використання синтетичних або напівсинтетичних препаратів призводить до побічних ускладнень, котрі виснажують захисні сили організму. Нині актуальним є застосування комплексів біологічно активних речовин природного походження для лікування захворювань різного генезу. Прикладом такого засобу є екстракт насіння фенугреку

© Т.Д. Хілько, І.В. Якубцова, Т.Д. Преображенська, Л.І. Остапченко

(ЕФ; *Trigonella foenum graecum*). Широкий спектр фармакологічної дії фенугреку пояснюється тим, що він містить різноманітні цінні біологічно активні сполуки (полісахариди, флавоноїди, стероїди, амінокислоти, вітаміни, макро- та мікроелементи) [3, 8, 12]. При вивченні патогенезу виразкової хвороби велике значення надається стійкості слизових оболонок гастродуоденальної системи до пошкоджувальних факторів, основну роль у захисті яких відіграє пристінковий шар слизу, превентивні властивості якого реалізуються за рахунок глікопротеїнів (ГП) [2, 6, 9, 10].

Мета нашої роботи – дослідження моносахаридного складу ГП шлункового і дуоденального захисного пристінкового шару слизу в нормі, за умов моделювання гострих виразок шлунка та ДПК, а також введення шурам ЕФ.

МЕТОДИКА

У досліджах використовували нелінійних щурів-самців масою 220–240 г. За добу до

проведення експериментів щури мали доступ лише до води. Для виразкоутворення у шлунку застосовано модель іммобілізаційного стресу [1]. Виразки ДПК моделювали пероральним введенням цистеаміну у дозі 30 мг/100 г двічі на добу з 4-годинним інтервалом [13]. ЕФ дослідним тваринам вводили інтрагастрально у концентрації 50 мг/кг двічі на добу протягом 7 діб за умов обох моделей виразкоутворення. Тварин розподілили на п'ять груп: 1-ша – контрольна, 2-га група – тварини, у яких моделювали виразку шлунка, 3-тя група – тварини, яким для корекції виразки шлунка вводили ЕФ, 4-та група – у яких моделювали виразку ДПК та 5-та група – тварини, яким для корекції виразки ДПК вводили ЕФ. Визначали вміст фукози, галактози, гексозамінів, N-ацетилнейрамінової кислоти (NANA) [4], а також концентрацію білка [12]. Статистичну обробку результатів досліджень проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики ($M \pm m$) на основі 10–12 повторів. Достовірність різниці показників оцінювали за допомогою критерію t Стьюдента. Постановка експериментів відповідала міжнародним біоетичним принципам, міжнародним угодам і національному законодавству у цій галузі [5].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ступінь прояву бар'єрних властивостей слизового шару залежить від вмісту та складу його основних структурних компонентів – ГП. Захисна плівка слизових оболонок шлунка і ДПК, яку вони утворюють, відіграє роль фільтра, який здатен пропускати лише низькомолекулярні сполуки і затримувати високомолекулярні, зокрема пепсини, а також компенсувати вплив кислоти через градієнтне зниження рівня рН [2, 7, 9, 10].

Для характеристики складу структурних ГП було розраховано сумарну концентрацію їх моносахаридних залишків та її відношення на масову частку білків слизу, що дає змогу визначити ступінь глікозилювання.

Для характеристики будови олігосахаридних ланцюжків розраховували парціальний склад окремих моносахаридів.

Досліджено склад структурних ГП слизу шлунка і ДПК за умов гострих виразок. Порівняння складу ГП слизу у нормі показало, що загальний рівень їх глікозилювання (показник насичення моносахаридами ГП) слизу шлунка у 1,7 раза більше, ніж у ДПК.

При моделюванні виразкоутворення як в шлунку, так і в ДПК загальний рівень глікозилювання ГП слизу шлунка не змінювався. У ДПК цей показник зростав у порівнянні з контрольними значеннями у 1,7 раза за умов стресу та в 1,9 раза за дії цистеаміну.

За умов виразки шлунка відбувалися зміни у співвідношенні окремих ГП шлункового слизу щурів, що проявлялося у зменшенні вмісту гексозамінів – у 1,4 раза, галактози – у 2,2 раза, фукози – у 1,3 раза та підвищенні вмісту NANA – у 3,6 раза (рис. 1.) відносно контролю.

У пристінковому слизу ДПК спостерігали достовірне підвищення вмісту моносахаридів глікопротеїнів слизу: NANA – у 1,8 раза, фукози в 1,5 раза, галактози в 1,9 раза та гексозамінів у 1,7 раза (рис. 2). При моделюванні виразки ДПК практично не змінився відносний вміст окремих моносахаридів ГП шлункового слизу. За цих умов у ГП ДПК слизу щурів збільшувався вміст галактози в 2,7 раза, фукози в 1,8 раза, NANA – в 2,4 раза, при цьому суттєво знижувався вміст гексозамінів – утричі порівняно з контролем (див. рис. 2).

Найбільш виражене зростання вмісту NANA, очевидно, зумовлено її термінальним положенням у молекулах ГП, що при зниженні вмісту інших їх компонентів може свідчити про синтез укорочених незрілих структур ГП шлункового слизу, а також, можливо, більш розгалужених молекул. Встановлений факт можна розглядати як компенсаторну реакцію на вимушену секрецію незрілих ГП. Оскільки найчастіше фукоза займає кінцеве положення на бічних ланцюгах макромолекул ГП, то зміни її вмісту створюють умови для більш активної дії пептидгідролаз на білкову частину ГП шлунка.

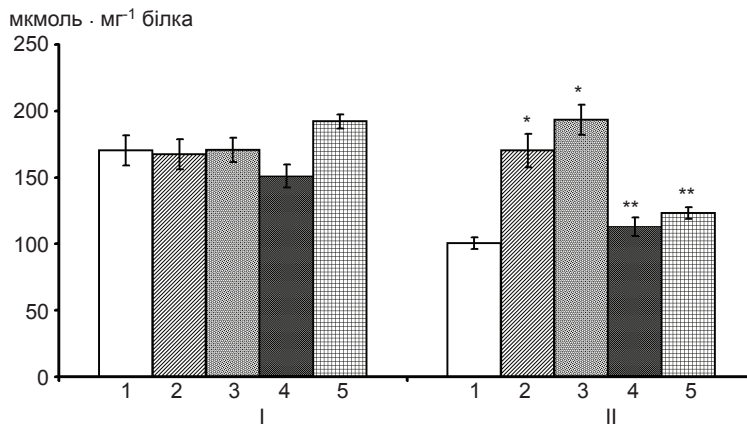


Рис. 1. Загальний вміст моносахаридів глікопротеїнів шлункового та дуоденального слизу за умов стресової та цистеамінової моделі виразкоутворення у щурів та введення екстракту фенугреку: I – шлунок, II – дванадцятипала кишка; 1 – контроль, 2 – стрес, 3 – цистеамін, 4 – стрес і екстракт фенугреку, 5 – цистеамін і екстракт фенугреку. * $P \leq 0,05$ – достовірно відносно контролю, ** $P \leq 0,05$ – достовірно відносно відповідної моделі уражень

Очевидно, в патологічних умовах, клітина не встигає або втрачає здатність синтезувати

повноцінні ГП, у структурі яких містяться довгі бічні ланцюги моносахаридних залиш-

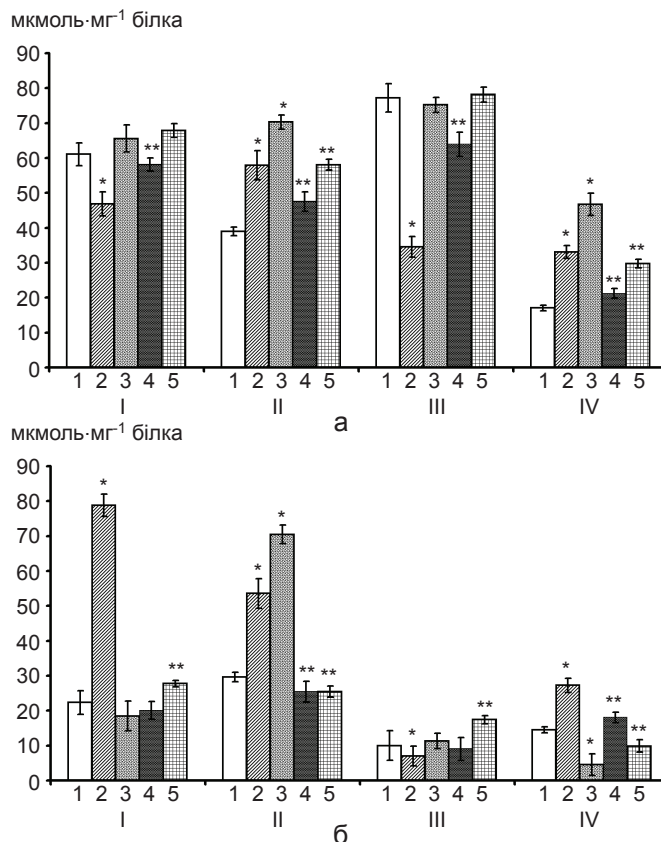


Рис. 2. Вміст моносахаридів глікопротеїнів шлункового та дуоденального слизу в нормі та за умов моделювання стресової та цистеамінової моделі виразкоутворення у щурів та введення екстракту фенугреку: 1 – контроль, 2 – стрес, 3 – цистеамін, 4 – стрес і екстракт фенугреку, 5 – цистеамін і екстракт фенугреку; а – фукоза, б – галактоза, г – нейроацетилнейрамінова кислота, д – гексозаміни. I, III – шлунок, II, IV – дванадцятипала кишка, * $P \leq 0,05$ – достовірно відносно контролю, ** $P \leq 0,05$ – достовірно відносно відповідної моделі уражень

ків. Для відповідних енерго-, ресурсо- та часозатратних процесів потрібний потужний потенціал, за відсутності якого клітина використовує інші механізми. Як відомо, сіалові кислоти забезпечують формування молекулярної сітки слизу, стаючи елементом міжмолекулярних з'єднань ГП. В результаті утворюється структура останніх з вищим ступенем полімеризації, що врешті-решт компенсує незрілість структурних ГП слизу.

Якісно схожий характер розподілу моносахаридів ГП слизу спостерігається і при парціальному аналізі складу ГП надепітеліального слизового шару ДПК при виникненні виразки за дії цистеаміну. Але треба відмітити, що за цих умов кількісні зміни мають менш виражений характер. Зростання відносної частки NANA ГП надепітеліального слизового шару ДПК при виникненні виразки відбувалось в основному за рахунок зниження вмісту гексозамінів, а зменшення відносного вмісту таких моносахаридів, як фукоза та галактоза було незначним у порівнянні зі слизовою шлунка за умов експериментальної виразки.

Як свідчать наші результати, характеристики ГП слизу шлунка та ДПК за умов виразкоутворення, мають низку спільних і специфічних рис, які пов'язані з структурно-функціональними відмінностями цих органів. В основі реакції останніх на патологічні процеси виразкоутворення можна чітко виділити два різні механізми: перший – зміни моносахаридного складу ГП, що є характерним як для шлунка, так і ДПК, другий – підвищення загальної кількості моносахаридів ГП слизу, що характерно тільки для ДПК. Здатність останньої значно посилювати нарощування бічних моносахаридних ланцюжків на відміну від шлунка, де загальний рівень глікозилювання ГП практично не змінювався, може бути пов'язаним з різними шляхами слизоутворення. У шлунку слиз продукується в основному спеціалізованими клітинами – мукоцитами, а також деякими іншими, які при його виділенні зберігають свою цілісність, а у

ДПК залозисті клітини злуцуються у просвіт кишки і розпадаються [2, 9, 14]. Таким чином, у ДПК паралельно відбуваються два процеси: з одного боку, інтенсивна фізіологічна регенерація епітелію крипт і ворсинок за рахунок проліферації і спеціалізації епітеліоцитів, а з іншого, – безперервне відторгнення відпрацьованих клітин з утворенням слизу. Отже, можна передбачати, що за умов дії стресу у шлунку та ДПК відбуваються відновлювальні процеси, які забезпечують підвищення резистентності їх слизових оболонок через зростання рівня глікозилювання ГП, без змін відносної частки окремих моносахаридів. За дії цистеаміну зміни відносної частки моносахаридів ГП слизу ДПК є наслідком розвитку виразки ДПК.

Парціальний аналіз складу ГП надепітеліального слизового шару шлунка при виникненні виразки (рис. 3) свідчить про зростання відносної частки NANA з 13 до 47 % та зниження відносної частки решти моносахаридних компонентів при утворенні виразкових дефектів.

Якісно подібний характер розподілу моносахаридів ГП слизу спостерігався і при парціальному аналізі складу ГП надепітеліального слизового шару ДПК при виникненні виразки (див. рис. 3). При цьому кількісні зміни парціального складу моносахаридів були менш вираженими.

У результаті введення ЕФ шурам з експериментальною виразкою різного походження нормалізувався склад ГП пристінкового шару слизу шлунка та ДПК (див. рис. 1, 2), відновлювався його загальний рівень глікозилювання, вміст окремих моносахаридів. Це може призводити до відновлення його протекторних і бар'єрних властивостей. Встановлений ефект можна пояснити тим, що до складу ЕФ входять полісахариди, які покращують стабільність функціонування клітинних мембран, посилюючи резистентність полісахаридного шару клітин досліджуваних слизових і забезпечуючи противиразковий ефект при будь-якому генезі виразкового уш-

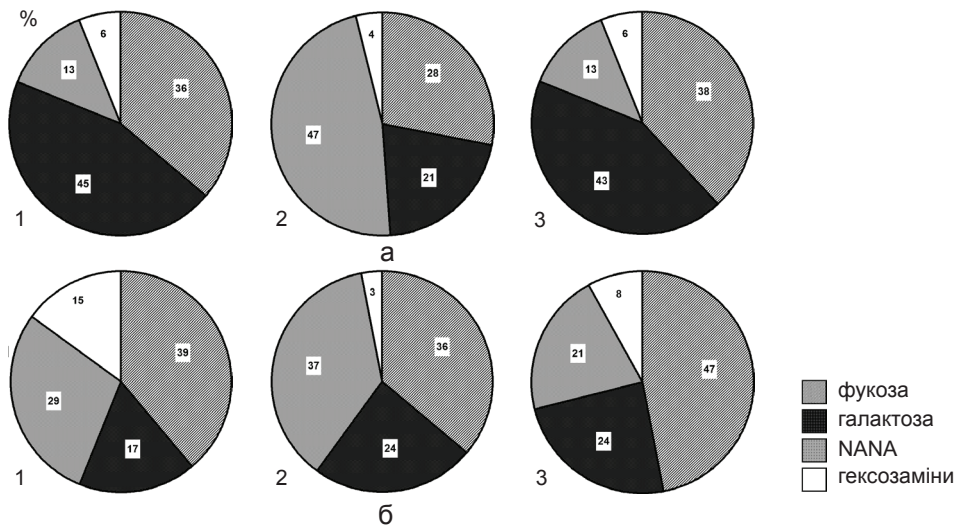


Рис. 3. Співвідношення відносної частки моносахаридних компонентів глікопротеїнів слизу шлунка (а) і дванадцятипалої кишки (б) при експериментальному виразкоутворенні та введенні екстракту фенугреку. На а: 1 – контроль, 2 – стрес, 3 – стрес і екстракт фенугреку, на б: 1 – контроль, 2 – цистеамін, 3 – цистеамін і екстракт фенугреку

кодження [12]. Крім того, продукти розпаду полісахаридного комплексу (олігосахариди) підвищують секрецію власних полісахаридів (гастромукополісахаридів). ЕФ також може проявляти протизапальний ефект. Це пов'язано з наявністю ефірних олій, які крім протимікробної та антивірусної дії мають гальмівний вплив на вільнорадикальні реакції [3, 12]. Комплекс різних за структурою та активністю сполук, які є у ЕФ, завдяки наявності слизистих субстанцій всмоктуються повільно і діють поступово, тривало.

Таким чином, ЕФ завдяки своїм антиоксидантним та цитопротективним властивостям, прискорює регенераційні процеси в слизових і нормалізацію складу ГП шлункового і дуоденального захисного слизу.

ВИСНОВКИ

1. Доведено захисний вплив ЕФ на склад ГП шлункового і дуоденального пристінкового шару слизу, що призводило до нормалізації досліджуваних біохімічних показників захисту клітин слизової оболонки шлунка та ДПК за умов моделювання гострого виразкоутворення у щурів.

2. Отримані результати можуть бути використані у ветеринарії для лікування і профілактики виразкових захворювань.

3. Перспективи подальших досліджень полягають у комплексному вивченні ключових біохімічних показників в модельних експериментах, що допоможе з'ясувати механізми формування виразки та механізмів дії біологічно активних речовин природного походження.

Т.Д. Хилько, И.В. Якубцова,
Т.Д. Преображенская, Л.И. Остапченко

ГЛИКОПРОТЕИНЫ ЖЕЛУДОЧНОЙ И ДУОДЕНАЛЬНОЙ СЛИЗИ ПРИ УЛЬЦЕРОГЕНЕЗЕ И ПРИ ВВЕДЕНИИ ЭКСТРАКТА ФЕНУГРЕКА

Проведено сравнительную оценку состава гликопротеинов желудочной и дуоденальной защитной пристеночной слизи в норме, в условиях моделирования язв у крыс и на фоне введения животным с язвенными повреждениями экстракта фенугрека. В норме общий уровень гликозилирования гликопротеинов слизи желудка в 1,7 раза больше, чем в двенадцатиперстной кишке. В условиях стрессовой модели язвообразования в слизи желудка наблюдается уменьшение содержания гексозаминов (в 1,4 раза), галактозы (в 2,2 раза), фукозы (в 1,3 раза) и повышение содержания NANA (в 3,6 раза). При цистеаминовой модели язвообра-

звання в слизи двенадцатиперстной кишки происходило увеличение содержания галактозы (в 2,7 раза), NANA (в 2,4 раза), фукозы (в 1,8 раза), но существенно снижалось содержание гексозаминов в 3 раза по сравнению с контролем. Доказано защитное влияние экстракта фенугрека на состав гликопротеинов пристеночного слоя слизи слизистых оболочек желудка и двенадцатиперстной кишки в условиях моделирования язвообразования у крыс.

Ключевые слова: язва желудка, язва двенадцатиперстной кишки, моносахариды гликопротеинов, экстракт фенугрека.

**T.D. Khilko, I.V. Yakubtsova,
T.D. Preobrazhenska, L.I. Ostapchenko**

GLYCOPROTEINS OF MUCUS OF GASTRIC AND DUODENAL WALL SURFACE DURING ULCEROGENESIS AND THE IMPACT OF FENUGREEK

The comparative evaluation of qualitative and quantitative composition of glycoproteins of gastric and duodenal wall surface layer of protective mucus in the normal, at the modeling of ulcers in rats and at the introduction to animals with ulcerative lesions of fenugreek extract carried out. It was shown in control (normally) the general level of glycosylation of glycoproteins gastric mucus is 1.7 times more than the duodenum. Under acute stress model ulceration in the stomach mucus decrease in hexosamine (1.4 times), galactose (2.2 times), fucose (1.3-fold) and an increase in NANA (3.6 times) observed. Under cysteamine model ulceration in duodenal mucus increase galactose (2.7 times), NANA (2.4 times), fucose (1.8-fold) but significant decrease in the amount of hexosamines 3 times compared to the control occurred. It was proved the protective effect of fenugreek extract to the wall surface mucus of the stomach and duodenum mucosa under conditions modeling ulceration in rats.

Key words: acute model stress of gastric ulcer, cysteamine model of duodenal ulcer, glycoproteins' monosaccharides, fenugreek extract.

Taras Shevchenko National University, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гройсман С.Д., Каревина Т.Г. О влиянии атропина на стрессорные поражения слизистой оболочки желудка

у крыс // Деп. в ВИНТИ. – 1979. – №3. – С. 19–24.

- Allen A., Flemstrom G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin // *Amer. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2005. – **288**, № 1. – P. 1–19.
- Belguith-Hadriche O., Bouaziz M., Jamoussi K., El Feki A., Sayadi S., Makni-Ayedi F. Lipid-lowering and antioxidant effects of an ethyl acetate extract of fenugreek seeds in high-cholesterol-fed rats // *J. Agric. Food Chem.* – 2010. – **58**, № 4. – P. 2116–2122.
- Clamp J.R. Analysis of glycoproteins // *Biochem. Soc. Symposia.* – 1974. – **40**. – P. 3–16.
- Commission Recommendation of 18 June 2007 on guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes // *Off. J. Europ. Union.* – 2007. – **50**, № L197. – P. 1–89.
- Ham M., Kaunitz J. D. Gastroduodenal mucosal defense // *Curr. Opin. Gastroenterol.* – 2008. – **24**, № 6. – P. 665–673.
- Drozdowski L., Thomson A. B. Intestinal mucosal adaptation // *World. J. Gastroenterol.* – 2006. – **12**, № 29. – P. 4614–4627.
- Hamden K., Masmoudi H., Carreau S., Elfeki A. Immunomodulatory, beta-cell, and neuroprotective actions of fenugreek oil from alloxan-induced diabetes // *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* – 2010. – № 9. – P. 26–27.
- Konturek S.J., Konturek P.C., Pawlik T., Sliwowski Z., Ochmanski W., Hahn E.G. Duodenal mucosal protection by bicarbonate secretion and its mechanisms // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2004. – **55**, Suppl 2. – P. 5–17.
- Nayeb-Hashemi H., Kaunitz J.D. Gastroduodenal mucosal defense // *Curr. Opin. Gastroenterol.* – 2009. – **25**, № 6. – P. 537–543.
- Noble J.E., Bailey M.J. Quantitation of protein // *Meth. Enzymol.* – 2009. – **463**. – P. 73–95.
- Rayyan S., Fossen T., Andersen O.M. Flavone C-glycosides from seeds of fenugreek, *Trigonella foenum-graecum* L // *J. Agric. Food Chem.* – 2010. – **58**, № 12. – P. 7211–7217.
- Robert A., Nezamis J.E., Lancaster C., Badalamenti J.N. Cysteamine-induced duodenal ulcers: a new model to test antiulcer agents // *Digestion.* – 1974. – **11**, № 3–4. – P. 199–214.
- Smits H.L., Kramer M.F. Glycoprotein synthesis in the mucous cells of the vascularly perfused rat stomach. III. Mucous cells of the antrum and the duodenal glands // *Amer. J. Anat.* – 1981. – **161**, № 4. – P. 365–374.

*Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка
E-mail: tkhilko@mail.com*

*Матеріал надійшов
до редакції 15.04.2013*