

В.А. Ковальова, А.Є. Шевченко, Л.І. Остапченко

## Дія природних антиоксидантів аммівіту та сквалену на вміст ліпідів, білків і вуглеводів у клітинах слизової оболонки шлунка щурів за умов експериментального ульцерогенезу

*Досліджували ефекти природних антиоксидантів на вміст ліпідів, білків і вуглеводів клітин слизової оболонки шлунка щурів при експериментальному етаноліндукованому ульцерогенезі. Встановлено достовірне зниження вмісту нейтральних ліпідів і фосфоліпідів за умов моделі виразки шлунка та його підвищення при введенні антиоксидантних препаратів природного походження (аммівіту та сквалену). Також достовірно знижувався вміст основних вуглеводів глікопротеїнів (фукози втричі, галактози в 1,5 рази) і білкових фракцій з молекулярними масами у діапазоні 11–138 кДа; за умов введення аммівіту окремо та у комплексі зі скваленом значення цих показників нормалізувалися. Ключові слова: етаноліндукована виразка, слизова оболонка шлунка, аммівіт, сквален, галактоза, фукоза.*

### ВСТУП

Виразкова хвороба – найпоширеніше захворювання органів травлення [1, 2]. Лише в Україні загалом нараховується понад 4 млн. пацієнтів з виразковою хворобою шлунка [3]. Зловживання алкогольними напоями сприяє розвитку виразкової хвороби шлунка. Етанол є найзагальнішим ульцерогенним агентом, і коли інтрагастрально вводиться щурам, призводить до серйозних геморагічних ерозій. В основі патогенезу алкоголізму лежать глибокі зміни метаболізму, що спричинює порушення біогенезу, структури та функції клітин різних органів і систем [4].

Хоча в останні роки досягнуто значного прогресу у розвитку сучасної фармакології та створено широкий арсенал препаратів, лікування виразкової хвороби залишається проблемою сучасності. Тому пошук речовин, які були б ефективними при резистентних формах захворювання, проявляли б антиоксидантні та цитопротекторні властивості

при помірній антисекреторній активності є дуже важливим завданням. З урахуванням цього факту, доцільно використовувати у лікуванні такі антиоксидантні препарати [4–7] природного походження, як сквален і аммівіт.

Метою нашої роботи було дослідити дію природних антиоксидантів (аммівіту і сквалену) на вміст ліпідів, білків і вуглеводів слизової оболонки шлунка (СОШ) щурів за умов експериментального етаноліндукованого ульцерогенезу.

### МЕТОДИКА

Досліди проведено на 10 білих нелінійних щурах *Rattus norvegicus* обох статей масою 200 г. Їх утримували на стандартному раціоні віварію. За добу до проведення дослідів щури мали доступ лише до води [8].

В роботі були використані реактиви: НЕРЕС, додецилсульфат натрію, бичачий сироватковий альбумін (“Sigma”, США), фільтрувальний папір FN 23 (“Filtrak”, Ні-

меччина), етанол, інші реактиви та органічні розчинники (“Хімлаборреактив”, Україна).

Виразки моделювали введенням 1 мл етанолу у концентрації 80 % [9]. Перед розтином щурів піддавали цервікальній дислокації. Ізольовані клітини СОШ отримували за модифікованим методом Levin [10]. Розділення та кількісне визначення нативних білків здійснювали електрофорезом у поліакриламідному гелі [11], екстракцію ліпідів з клітин шлунка та визначення їх окремих фракцій – використанням тонкошарової хроматографії [12]. Вміст фукози – вуглеводного компонента СОШ – вимірювали спектрофотометрично [13, 14], визначення вмісту галактози проводили за методикою Handel [15]. Усі показники перераховано на 1 мг білка [16].

Препарати вводили щурам per os протягом 5 діб: сквален, розчинений в рослинній олії 1:10, по 20 мкл 3 рази на добу, аммівіт – по 100 мкл двічі на добу.

Експериментальні результати обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики з вираховуванням середнього значення, середнього квадратичного відхилення і середньої квадратичної похибки. Для визначення достовірності відмінностей між двома вибірками використовували критерій t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За етанолової моделі виразки встановлено зниження вмісту холестерину в 1,6 раза та ацилгліцеролів у 2,8 раза, водночас концентрація вільних жирних кислот (ЖК) зростала

у 3,8 раза відносно контролю (табл. 1). При застосуванні аммівіту не спостерігалось статистично достовірних змін порівняно зі значеннями у разі ульцерогенезу, тоді як комплексне додавання тваринам аммівіту та сквалену призводило до нормалізації вмісту холестерину та підвищувало вміст ацилгліцеролів в 1,9 раза щодо етанолової моделі виразки, концентрація ЖК знижувалась у 1,3 раза відповідно (див. табл. 1).

Можна припустити, що такі зміни вмісту ацилгліцеролів і ЖК за умов патології пов’язані з підвищенням активності клітинних фосфоліпаз ( $A_1$ ,  $A_2$  та C), котрі розщеплюють ацилгліцероли до гліцерину та ЖК. Імовірно, нормалізація вмісту холестерину за сумісного введення препаратів відбувається за рахунок участі сквалену у біосинтетичних процесах вищезазначеного ліпиду, оскільки він є довгою аліфатичною гідрофобною молекулою, що має високу здатність до вбудовування в клітинну мембрану, а також проміжним продуктом у реакціях біосинтезу холестерину.

Дослідження фосфоліпідного складу клітин СОШ щурів за умов етанолової моделі виразки показало зниження вмісту головних фракцій фосфоліпідів: фосфатидилхоліну в 2,5 раза і фосфатидилінозитулу в 1,5 раза щодо контролю (табл. 2). Також було виявлено зростання концентрації лізофосфатидилхоліну в клітинах СОШ щурів у 1,9 раза. Встановлені зміни можуть бути пов’язані з інтенсифікацією вільнорадикальних окисних реакцій насамперед перекисного окиснення поліненасичених ЖК, які входять до складу фосфоліпідів, і з активацією клітинних фосфоліпаз.

**Таблиця 1. Вміст (мкг/мг білка) нейтральних ліпідів у клітинах слизової оболонки шлунка щурів на 5-ту добу дії різних чинників ( $M \pm m$ ;  $n=10$ )**

Нейтральні ліпіди	Контроль	Етанолова модель	Етанол і аммівіт	Етанол, аммівіт і сквален
Холестерин	14,2±1,1	9,1±0,6*	10,3±0,8*	14,5±1,2**
Ацилгліцероли	463,2±36,5	165,5±12,7*	180,4±14,3*	318,8±24,5*,**
Жирні кислоти	164,6±12,5	629,4±50,3*	580,6±46,4*	491,2±38,3*,**

Примітка. Тут і в табл. 2–4 \* $P \leq 0,05$  різниці достовірні відносно контролю; \*\* $P \leq 0,05$  – етанолової моделі виразки.

**Таблиця 2. Вміст (мкг/мг білка) фосфоліпідів у клітинах слизової оболонки шлунка щурів на 5-ту добу дії різних чинників (M±m; n=10)**

Фосфоліпіди	Контроль	Етанолова модель	Етанол і аммівіт	Етанол, аммівіт і сквален
Фосфатидилетаноламін	26,3±2,1	24,3±1,9	23,2±1,8	22,8±1,8
Фосфатидилхолін	69,0±5,4	28,1±2,2*	31,4±2,3*	50,9±4,0*,**
Лізофосфатидилхолін	2,0±0,1	3,7±0,3*	3,2±0,2*	2,3±0,2*,**
Фосфатидилінозитол	27,8±2,1	18,0±1,4*	21,1±1,6*	22,5±1,7*,**

Фосфатидилхолін і фосфатидилетаноламін синтезуються за однаковим шляхом. Зниження вмісту фосфатидилхоліну на фоні незмінності фосфатидилетаноламіну може пояснюватися порушенням процесу метилювання фосфатидилетаноламіну до фосфатидилхоліну в печінці. Зниження концентрації фосфатидилхоліну також, ймовірно, зумовлено пригніченням реакціювання лізофосфатидилхоліну та лізофосфатидної кислоти.

Зростання вмісту лізофосфатидилхоліну у разі виразкоутворення (див. табл. 2), можливо, пов'язано з активацією фосфоліпази A<sub>2</sub> внаслідок порушення транспортування Ca<sup>2+</sup> чи структурних перебудов мембран, які призводять до підвищення доступності мембранних фосфоліпідів до гідролізу цитозольною ізоформою ферменту. Зменшення концентрації фосфатидилінозитулу за ульцерогенезу може бути пояснено інтенсифікацією його деградації, яку, ймовірно, спричинено активацією Ca<sup>2+</sup>-фосфатидилінозитольного сигнального каскаду або інгібування синтезу фосфоліпиду.

При додаванні аммівіту не спостерігалось статистично достовірних змін вмісту фосфоліпідів порівняно зі значеннями за виразкоутворення, тоді як сумісне введення препаратів підвищувало вміст фосфатидилхоліну та фосфатидилінозитулу у 1,8 і 1,3 раза відповідно щодо значень при ульцерогенезі і знижувало вміст лізофосфатидилхоліну у 1,6 раза.

До основних компонентів СОШ також відносять сульфомуцинові фракції та вуглеводи глікопротеїнів, а саме: сіалові кислоти, гексозаміни, фукозу і галактозу. Дослідження

останніх років свідчать про те, що глікопротеїни беруть участь практично в усіх метаболічних процесах, оскільки входять до складу ферментів, гормонів, транспортних білків, антитіл, білків-рецепторів та інших біологічно активних речовин [17]. Особливо цікавим є вивчення ролі глікопротеїнів, які містяться на поверхні клітин і беруть участь у міжклітинних взаємодіях [18], їхнього зв'язку з процесами проліферації та розвитку тощо. Сьогодні є експериментальні роботи [19], які дають змогу стверджувати, що глікопротеїнам притаманна важлива біологічна функція у секреторних гранулах клітин шлунка.

Було встановлено [20], що N-зв'язані олігосахариди, які утримують залишки фукози і галактози, локалізовані у внутрішніх каналцях і тубуловезикулярній системі парієнтальних клітин, а також у їх гранулах. На поверхні клітин шлунка були виявлені N-зв'язані фукозильовані олігосахариди, які створюють захисний слизовий бар'єр у шлунку [19].

Нами встановлено, що внаслідок дії етанолу знижується концентрація фукози у 3 рази та галактози у 1,5 раза порівняно з контрольними значеннями (табл. 3). За умов додавання аммівіту вміст цих вуглеводів у клітинах СОШ щурів сягав меж контрольних значень. Подібні результати спостерігались і за сумісного застосування досліджуваних антиоксидантів.

Зростання концентрації фукози і галактози при введенні препаратів може свідчити про збільшення продукції глікопротеїнів і мукопротеїнів, відновлення захисного

**Таблиця 3. Вміст (мкг/мг білка) фукози і галактози в клітинах слизової оболонки шлунка щурів на 5-ту добу дії різних чинників (M±m; n=10)**

Вуглеводи	Контроль	Етанолова модель	Етанол і аммівіт	Етанол, аммівіт і сквален
Фукоза	48,0±3,5	16,4±1,2*	47,9±3,6**	59,7±4,7**
Галактоза	54,5±4,3	36,2±2,7*	55,8±4,4**	67,8±10,9**

бар'єра СОШ, оскільки за даними літератури між концентрацією фукози у СОШ і рівнем секреції слизу існує пряма залежність [17].

При вивченні дослідження білкового складу клітин СОШ було встановлено як якісні, так і кількісні зміни білкового складу (табл. 4). Так, за умов виразкоутворення не виявлено фракцій білків з відносними молекулярними масами 138, 70, 38, 32, 30, та 28 кДа (див.табл. 4). Також зменшується вміст білкових фракцій з молекулярними масами 55, 16 та 11 кДа – у 2,5 раза щодо контролю. Загалом спостерігається зниження концентрацій білкових фракцій з молекулярними масами у діапазоні 11–138 кДа. У клітинах СОШ з'являється білкова фракція з відносною молекулярною масою 19 кДа, якої у контролі не виявлено. Після введення аммівіту встановлено часткове відновлення білкових фракцій (див. табл. 4) з відносними молекулярними масами 138 і 28 кДа і зникнення фракцій з масами 11 і 19 кДа. Відмічено зростання вмісту білкових фракцій з моле-

кулярними масами 55 та 16 кДа – у 1,5 та 1,4 раза щодо моделі виразки відповідно. При комбінованому додаванні препаратів (див. табл. 4) знову з'являються білкові фракції з відносними молекулярними масами 138, 70, 38 та 32 кДа.

Таким чином, можна зробити висновок, що комплексне застосування досліджуваних антиоксидантів природного походження сприяє відновленню вмісту ліпідів, білків та основних глікопротеїнів зв'язаних вуглеводів клітин СОШ.

**В.А. Ковалёва, А.Е. Шевченко, Л.И. Остапченко**

#### **ДЕЙСТВИЕ ПРИРОДНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ АММИВИТА И СКВАЛЕНА НА СОДЕРЖАНИЕ ЛИПИДОВ, БЕЛКОВ И УГЛЕВОДОВ В КЛЕТКАХ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ УЛЬЦЕРОГЕНЕЗЕ**

Исследовали эффекты природных антиоксидантов на содержание липидов, белков и углеводов клеток слизистой оболочки желудка крыс при экспериментальном этаноли-

**Таблиця 4. Вміст (мкг/мг білка) білків у клітинах слизової оболонки шлунка щурів на 5-ту добу дії різних чинників (M± m; n = 10)**

Відносна молекулярна маса, кДа	Контроль	Етанолова модель	Етанол і аммівіт	Етанол, аммівіт і сквален
138	135,1±9,7	0	70,1±5,5*	72,9±5,7*
70	7,5±0,5	0	0	0,6±0,1*
55	34,8±2,7	14,8±1,1*	21,7±1,6*,**	23,1±1,7*,**
38	6,1±0,4	0	0	5,2± 0,4*
32	10,8±0,8	0	0	2,0±0,1*
30	14,5±1,1	0	0	0
28	55,6±4,4	0	3,5±0,2*	0
19	0	2,4±0,1	0	0,8± 0,1**
16	159,9±12,7	64,0±5,1*	88,9±6,5*,**	87,2±6,7*,**
11	60,2±4,7	23,9±1,8*	0	0

дущированном ульцерогенезе. Определено достоверное уменьшение содержания нейтральных и фосфолипидов при моделировании язвы желудка и его повышение при введении антиоксидантных препаратов природного происхождения (аммивита и сквалена). Также достоверно снижалось содержание основных гликопротеинсвязанных углеводов (фукозы и галактозы) и белковых фракций с молекулярными массами в диапазоне 11–138 кДа; при введении аммивита отдельно и в комплексе со скваленом наблюдалась нормализация этих показателей.

Ключевые слова: этанолиндуцированная язва, слизистая оболочка желудка, аммивит, сквален, галактоза, фукоза.

**V.A. Kovalova, A. Y. Shevchenko, L.I. Ostapchenko**

### **EFFECTS OF NATURAL ANTIOXIDANTS ON THE CONTENT OF LIPIDS, PROTEINS AND CARBOHYDRATES IN RAT'S GASTRIC MUCOSAL CELLS UNDER EXPERIMENTAL ULCERATION**

Effects of natural antioxidants on the contents of lipids, proteins and carbohydrates in rat's gastric mucosal cells under experimental ethanolinduced ulceration have been studied. A significant decrease in the contents of neutral and phospholipids was found under experimental ulceration and their increase was detected under addition of squalene and ammvit. Under ulceration we found a significant decrease of protein fractions with molecular weight within the range of 11-138 kDa, galactose and fucose contents. Following addition of squalene and ammvit, a normalization of these parameters was observed.

Key words: ethanol ulcer, gastric mucosa, ammvit, squalene, galactose, fucose.

*Taras Shevchenko National University, ESC "Institute of Biology", Kyiv, Ukraine*

#### **REFERENCES**

1. Vasylenko V.Kh., Hrebenev A.L., Sheptulyn A.A. [Ulcer disease]. M.: Medicine;1987. 285 p. Russian.
2. Smyrnov Iu.V., Osolpov V.N., Bylych Y.L. [Epidemiological aspects of the combination of hypertension and ulcer disease]. Ter. arkh. 1990;2:48-50. Russian.
3. Saenko V.F., Homoliako Y.V., Buryi A.N. [Features of associated with Helicobacter pylori infection stomach and duodenum diseases' diagnosis and treatment in the surgical clinic]. Klinichna khirurgiia. 2001;6:14-18. Ukrainian.
4. Shetty R., Kumar K.V., Naidu M.U.R., Ratnakar K.S.

- Effect of Gingko biloba extract on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. Indian J. of Pharmacology. 2000;32 (6):313-317.
5. Marhuenda U.E., Martin M.J. and Alarcon-de-Lastra C. Anti-ulcerogenic activity of aescine in different experimental models. Phytother. 1993;22 (7) :13-16.
6. Hemandez R., Munoz C., Montel Ruiz and Vazquez O. Martinez. Gastric mucosal cell proliferation in ethanol-induced chronic mucosal injury is related to oxidative stress and lipid peroxidation in rats. Lab. Invest. 2000;80 (1) :1161-1169.
7. Jainu M. and Devi C.S. Antiulcerogenic and ulcer healing effects of Solanum nigrum (L.) on experimental ulcer models. Possible mechanism for the inhibition of acid formation. J. Ethnopharmacol. 2006;104 (10) :156-163.
8. Zapadniuk Y.P., Zapadniuk V.Y., Zakharyia E.A., Zapadniuk B.V. [Laboratory animals. Breeding, keeping, using in experiment]. K.: Vyshcha shkola;1983. 383 p. Russian.
9. Academician, prof. RAMN Yvashkyn V.T., prof. Rapoport S.Y., editors. [Gastroenterology directory of practical doctor]. M.: Sov. sport; 1999. 432 p. Russian.
10. Levin, G.G., Bulygin Th.V., Vishnyakov G.N. Coherent Oscillations Of The Molecular State Of Protein In Live Cells. Tsitologiya. 2005;47: 348-356.
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227: 680-685.
12. Kates M. Techniques of lipidology, isolation, analysis and identification of lipids. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Amsterdam, NY: North-Holland Pub. Co.American Elsevier;1972. p. 269-610.
13. Dische Z., Shettles L.B. A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for the determination. J. of Biol. Chemistry. 1948; 175 (2):595-603.
14. Uholev A. M., Yezuytova N. N. [Determination of invertase's and other disaccharidases' activity. Investigation of the digestive tract in humans]. L.: Nauka;1969. p.192-196.
15. Handel D.U., Kittlak W. Vergleichende Untersuchung zur Metodik der Bestimmung des eiwei gedundenen suckers. Z. Med. Labor. Techn. 1963; 4:163-169.
16. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.I. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951;193(1). : 265-275.
17. Wallace J., Grander D. FASEB J.1996; 10: 731-740.
18. Elkins R. Miracle Sugars. Woodland Publishing; 2003.
19. Kolset S., Prydz K., Pejler G. Biochem. J. 2004; 379: 217-227.
20. Ogata M., Araki K., Ogata T. Histol. Histopathol. 1998; 13: 347-348.

*ННЦ "Ін-т біології" Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка*

*E-mail: decanat\_bf@univ.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до редакції 08.07.2013*