

Вміст ліпідів і продуктів їх пероксидації в тимоцитах щурів за умов експериментального ульцерогенезу

В.А.Ковальова, Д.В.Шелест, Л.І.Остапченко

ННЦ "Інститут біології" Київського національного університету ім. Тараса Шевченка, Київ;
E-mail: vikikov@univ.kiev.ua

Досліджено вміст ліпідів і продуктів їх пероксидації в тимоцитах щурів при експериментальному ульцерогенезі. Встановлено вірогідне зростання вмісту дієнових кон'югатів (ДК), маленового діальдегіду (МДА) та шиффових основ (ШО) при експериментальних моделях виразки шлунка (етанолова і стресова). Встановлено, що при етаноловій виразці вміст ДК збільшується в 1,8 раза, МДА в 2,1 і ШО в 1,3 раза. При етаноловій і стресовій виразках зростає вміст холестерину в 1,7 і 1,5 раза, триацилгліцерину у 2 і 2,3 раза і жирних кислот у 2,2 та 1,9 раза відповідно відносно контролю. Зменшувався вміст фосфатидилетаноламіну в 1,5 та 1,3 раза відносно контролю. Також при стресовій моделі було відмічено зменшення вмісту фосфотидилінозитолу в 1,3 раза і збільшення лізофосфатидилхоліну в 1,7 раза щодо контролю. Таким чином, встановлено вірогідне зростання вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів (ДК, МД, ШО), а також зміни вмісту нейтральних ліпідів (холестерину, триацилгліцерину) і фосфоліпідів у тимоцитах щурів при експериментальних моделях виразки шлунка.

Ключові слова: виразкова хвороба шлунка; тимоцити; продукти пероксидації ліпідів; нейтральніліпідиди і фосфоліпідиди.

ВСТУП

Нині виразкова хвороба шлунка є одним з найпоширеніших захворювань органів травлення людини у всіх країнах світу. Її виявляють у 5-10% дорослого населення, переважно у чоловіків віком до 50 років, причому за останні десятиріччя відмічено зростання захворюваності [1,2]. В Україні зареєстровано близько 4 млн. таких хворих [3]. Існує багато несприятливих факторів, що спричинюють хвороби травної системи, зокрема виразкову хворобу шлунка. Утворення виразок може бути наслідком стресу, зловживання алкоголем, незбалансованого харчування, паління, вживання нестероїдних протизапальних препаратів тощо. Це хронічне захворювання супроводжується появою виразкових дефектів слизової оболонки шлунка. Розвиток виразкової хвороби впли-

© В.А.Ковальова, Д.В.Шелест, Л.І.Остапченко

ває на організм комплексно, страждають такі органи, як печінка, підшлункова залоза, а також імунна система [4].

Завдяки імунній системі, яка захищає нас від патогенних впливів, більшість захворювань перебігає короткочасно і практично без ускладнень і наслідків, що руйнують здоров'я. Організм має широкий набір різних форм імунної відповіді та факторів захисту проти патогенного впливу [5]. Розрізняють первинні – центральні (кістковий мозок і тимус) та вторинні – периферичні (селезінка, лімфовузли, апендикс) органи імунної системи. Всі вони взаємопов'язані системою кровотоку, лімфотоку і єдиною системою імунорегуляції.

Центральні органи імунної системи виконують дуже важливі функції, забезпечуючи самовідновлення імунітету. В них проходять процеси проліферації клітин-попередників,

їх диференціювання та дозрівання, та заселення периферичних органів імунної системи зрілими імунокомпетентними клітинами. Тому біохімічне дослідження стану Т-лімфоцитів і імунного статусу загалом є дуже важливим для розуміння механізмів розвитку виразкової хвороби та можливої профілактики імунодефіциту.

Метою нашої роботи було дослідити вміст ліпідів і продуктів їх пероксидації в тимоцитах щурів за умов експериментальних моделей виразок (етанолової та стресової).

МЕТОДИКА

У дослідах використовували вибірки з 10 білих нелінійних щурів обох статей масою 200 ± 17 г. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію, за добу до проведення дослідів вони мали доступ лише до води [6].

Етанолові виразки моделювали введенням у шлунок через зонд 1 мл етанолу в концентрації 80% [7]. Для отримання нейродистрофічних уражень шлунка за моделлю іммобілізаційного стресу в модифікації Гройсмана та Каревіної, так званого “соціального стресу” [8], щурів розміщували в металевих перфорованих патронах зі скляним вікном у донній частині, де розміщувалася голова. Патрони з тваринами розміщували в колонії вільноживучих щурів, в яких створювали умови для їх природного існування (освітлення, вода, корм).

Перед розтином тварин декапітували. Вміст дієнових кон'югатів (ДК) та маленового діальдегіду (МДА) в тимоцитах визначали спектрофотометричним методом, шиффових основ (ШО) – флюорометричним [9, 10]. Екстракцію ліпідів проводили за методом Kates [11]. Для визначення вмісту фракцій нейтральних і полярних ліпідів застосовували метод тонкошарової хроматографії (рухома фаза для нейтральних ліпідів містила гексан, діетиловий ефір і мурашину кислоту у співвідношенні 80:20:2; рухома фаза для поділу фосfolіпідів складалася з хлороформу,

метанолу і води у співвідношенні 50:25:4. Для проявлення фракцій використовували 10%-й розчин H_2SO_4) [11]. Усі показники перераховано на 1 мг білка, його кількісний вміст визначали за методом Lowry [12].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що при етаноловій і стресових виразках зростає вміст ДК у 1,8 і 2 рази, МДА в 2,1 і 1,9 рази та ШО в 1,3 і 1,3 рази відповідно щодо контрольних значень (табл. 1).

ДК відносяться до токсичних метаболітів, які чинять пошкоджувальний вплив на білки та нуклеїнові кислоти [13]. Негативна роль МДА полягає у тому, що він зшиває молекули ліпідів і погіршує плинність мембран за рахунок двох альдегідних груп, які знаходяться на кінцях молекули. Внаслідок цього мембрана стає менше рухливою і більше ламкою. Порушуються процеси, пов'язані зі зміною її поверхні: фагоцитоз, піноцитоз, клітинна міграція тощо [13]. Безперервне накопичення ШО дестабілізує мембрани і сприяє деструкції клітин [14]. Нагромадження в організмі продуктів перекисного окиснення ліпідів – ПОЛ (ДК, МДА, ШО) [15] призводить до стимуляції монооксигеназної системи, зміни реакції ліпідного, гормонального, імунного, мікроелементарного, нейромедіаторного статусів, числа місць зв'язування і спорідненості рецепторів до лігандів, виснаження антиоксидантної системи [16].

Крім описаних вище негативних наслідків, спричинених накопиченням шкідливих метаболітів, зазначимо, що ліпідні пероксиди є попередниками при формуванні ейкозаноїдів, а АФК здатні до регуляторних впливів [17, 18]. Зокрема, вони стимулюють запасання в клітині вторинних месенджерів циклонуклеотидів: цАМФ і цГМФ, при цьому останній утворюється в результаті активації гідропероксидами цитоплазматичної гуанілатциклази. АФК викликають накопичення іонів кальцію в

Таблиця 1. Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у тимоцитах щурів за умов етанолової та стресової моделей виразок (M±m, n=10)

Схема досліджу	Дієнові кон'югати, мкг/мг білка	Малоновий діальдегід, мкг/мг білка	Шиффові основи, ум. од.
Контроль	26,4±2,1	22,5±1,7	3,7±0,3
Етанол	46,9±3,7*	48,0±3,7*	4,0±0,3
Стрес	52,7±4,2*	42,9±3,4*	4,8±0,4*

Примітка. Тут і в таб. 2 і 3* $P \leq 0,05$ вірогідно відносно контролю

цитозолі та стимуляцію фосфорилування білків внаслідок активації протеїнкіназ та інгібування протеїнфосфатаз, активують білок Ras, який відіграє важливу роль при передачі сигналу до ядра. Загалом, АФК та ліпідні гідропероксида в низьких субтоксичних концентраціях здатні індукувати такі процеси, як експресія генів (в тому числі гени ранньої відповіді та інші протоонкогени), поділ клітин, активацію транскрипційних факторів (INF- κ), синтез білків (цитокінів тощо).

Ліпіди відіграють важливу роль в організмі, вони є структурними компонентами мембран, забезпечують реалізацію енергетичної та захисної функції. При змінах у відносному вмісті цих компонентів модифікуються мембранні структури, що призводить до порушення її проникності, функціонування трансмембранних насосів та мембранозв'язаних ферментів, передачі міжклітинних сигналів. Вважають, що формування деяких патологій пов'язане з зміною процесів внутрішньоклітинної трансдукції сигналу, основою якої є порушена взаємодія ендogenousного ліганду зі специфічним трансмембранним рецептором. Це безпосередньо впливає на метаболізм деяких фосфоліпідів –

попередників вторинних клітинних месенджерів (фосфатидилінозитол - ФІ, фосфатидилхолін - ФХ, ейкозаноїдів). Тому зміни вмісту окремих ліпідних фракцій можуть слугувати маркером численних патологій, зокрема виразки шлунка, раку, кардіоваскулярних, запальних хвороб.

У нашому дослідженні спостерігалось збільшення вмісту холестерину в 1,7 та 1,5 раза, триацилгліцерину в 2 та 2,3 раза та жирних кислот в 2,2 та 1,9 раза відповідно відносно контролю (табл. 2).

Фосфоліпіди – структурні та регуляторні компоненти мембран – беруть участь у підтриманні життєдіяльності всіх клітин, модулюючи процеси транспортування, механізми сигнальної трансдукції і міжклітинної взаємодії [19]. Встановлено, що при етаноловій та стресовій виразці зменшується в тимоцитах вміст фосфатидилетаноламіну (ФЕА) в 1,5 та 1,3 раза відповідно відносно контролю (табл. 3). При стресовій моделі також було відмічено зменшення вмісту ФІ в 1,3 раза та зростання кількості лізофосфатидилхоліну в 1,7 раза відносно контролю. Слід зазначити, що за умов дії таких ульцерогених чинників, як етанол та стрес, змінюються

Таблиця 2. Вміст нейтральних ліпідів у тимоцитах щурів за умов етанолової та стресової моделей виразок (M±m, n=10)

Схема досліджу	Холестерин, мкг/мг білка	Триацилгліцериди, мкг/мг білка	Жирні кислоти, %
Контроль	15,4±1,1	25,8±2,0	99,9±7,8
Етанол	26,8±2,0*	52,9±4,1*	221,7±17,6*
Стрес	23,8±1,8*	58,4±4,5*	192,3±15,2*

Таблиця 3. Вміст (мкг/мг білка) фосфоліпідів у тимоцитах щурів за умов етанолової та стресової моделей виразок ($M \pm m$, $n=10$)

Схема досліджу	Лізофосфатидилхолін	Фосфатидил-інозитол	Фосфатидилсерин	Фосфатидил-етаноламін
Контроль	1,0 \pm 0,1	16,5 \pm 1,1	42,2 \pm 2,3	14,9 \pm 1,0
Етанол	1,1 \pm 0,1	14,7 \pm 1,0	36,8 \pm 2,9	10,1 \pm 0,8*
Стрес	1,7 \pm 0,1*	13 \pm 0,9*	39,7 \pm 3,1	11,5 \pm 0,9*

переважно функціонально активні, заряджені фосфоліпіді: ФІ та ФЕА. Зростання вмісту ЛФХ за умов стресової моделі може бути пов'язане з активацією фосфоліпази A_2 або процесів ПОЛ (підвищення інтенсивності змінює мікрів'язкість біомембран, сприяє відкриванню кальцієвих каналів, що посилює потік у клітину іонів кальцію, які активують мембранні фосфоліпази [20]).

Ліпідний склад тимоцитів щурів зазнає істотних змін за умов експериментального ульцерогенезу. Це у свою чергу може призвести до порушення плинності ліпідних шарів, цілісності клітинної мембрани і мембран органел таких, як мітохондрії та ендоплазматичний ретикулум, процесів передачі рецепторних сигналів, що може спричинити загибель клітин через некроз або апоптоз.

Таким чином, встановлено, що ліпідний склад тимоцитів щурів істотно змінюється за умов експериментального ульцерогенезу. Отримані результати свідчать про зниження вмісту фосфоліпідів та зростання вмісту нейтральних ліпідів і лізофосфатидилхоліну в тимоцитах щурів. Однією з причин таких змін може бути активація процесів ПОЛ, про що говорить підвищення вмісту ДК, ШО, МДА.

В.А.Ковалева, Д.В.Шелест, Л.І.Остапченко

СОДЕРЖАНИЕ ЛИПИДОВ И ПРОДУКТОВ ИХ ПЕРОКСИДАЦИИ В ТИМОЦИТАХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО УЛЬЦЕРОГЕНЕЗА

Исследовано содержание липидов и продуктов их пероксидации в тимоцитах крыс при экспериментальном ульцерогенезе. Установлено достоверное увеличение

содержания диеновых конъюгатов (ДК), малонового диальдегида (МДА), шиффовые основания (ШО) при экспериментальных моделях язвы желудка (этаноловая и стрессовая). Установлено, что при этаноловой язве содержание ДК увеличивается в 1,8 раза, МДА в 2,1 и ШО в 1,3 раза относительно контрольных значений. При стрессовой модели было отмечено увеличение содержания ДК в 2 раза, МДА в 1,9 и ШО в 1,3 раза. При этих язвах возрастает содержание холестерина в 1,7 и 1,5 раза, триацилглицерина в 2 и 2,3 раза и жирных кислот в 2,2 и 1,9 раза соответственно. Уменьшается содержание фосфатидилэаноламина в 1,5 раза и 1,3 раза соответственно относительно контроля. Также было отмечено уменьшение содержания фосфатидилинозитола в 1,3 раза и увеличение количества ЛФХ в 1,7 раза относительно контроля. Таким образом, установлено достоверное возрастание содержания продуктов перекисного окисления липидов, а также изменения содержания нейтральных липидов и фосфолипидов в тимоцитах крыс при экспериментальных моделях язвы желудка.

Ключевые слова: язвенная болезнь желудка; тимоциты; продукты пероксидации липидов; нейтральные липиды и фосфолипиды

УНЦ «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко.

V. A. Kovaleva, D. V. Shelest, L. I. Ostapchenko

THE CONTENT OF LIPIDS AND PRODUCTS OF THEIR PEROXIDATION OF RAT THYMOCYTES IN EXPERIMENTAL ULCEROGENESIS

The work is dedicated to the research of the content of lipids and products of their peroxidation in rats thymocytes in experimental ulceration. It was found significant increase of the content of lipid peroxidation products diene conjugates (DC), malondialdehyde (MDA), schiff base (SB) in experimental models of gastric ulcers (ethanol and stress). It was established that under ethanol gastric the contents of DC increases by 1.8 times, MDA by 2.1 and SB by 1.3 times relative to control values. Under stress model it was observed an increase in the number of DC by 2 times, MDA by 1.9 and SB by 1.3 times relative to control. When ethanol and stress ulcers cholesterol

increased by 1.7 and 1.5 times, triacylglycerol by 2 and 2.3 times and fatty acids by 2.2 and 1.9 times, respectively, relative to controls. Phosphatidylethanolamine content decreases by 1.5 and 1.3 times compared to control. Also, the stress model, it was observed reduction of phosphatidylinositol by 1.3 times and increased lizofosfatydyhholinu by 1.7 times compared to control. Therefore, our studies indicate quantitative changes of lipid content (neutral- and phospholipids) in rats' thymocytes under experimental (ethanol and stress) ulceration. The reason of this changes may be activation of lipid peroxidation, as shown by the increase of lipid peroxidation products' (DK, MDA, SB) content.

Key words: peptic ulcer; thymocytes; lipid peroxidation products; neutrallipids and phospholipids

Educational and Scientific Centre Institute of Biology Taras Shevchenko Kyiv National University.

REFERENCES

1. Vasylenko VKh, Hrebenev AL, Sheptulyyn AA. Ulcer disease. M.: Medicine:1987. [Russian].
2. Smyrnov IuV, Oslopov VN, Bylych YL. Epidemiological aspects of the combination of hypertension and ulcer disease. Ter arkh. 1990;2:48-50. [Russian].
3. Saenko VF, Homoliako YV, Buryi AN. Features of associated with Helicobacter pylori infection stomach and duodenum diseases' diagnosis and treatment in the surgical clinic. Klinichna khirurhiia. 2001;6:14-18. [Ukrainian].
4. Shetty R, Kumar KV, Naidu MUR, Ratnakar KS. Effect of Ginkgo biloba extract on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. Indian J. of Pharmacology. 2000;32(6):313-317.
5. Royt A, Brostoff D, Meyl D. Immunology. M.: Mir; 2000. [Russian].
6. Zapadniuk YP, Zapadniuk VY, Zakharyia EA, Zapadniuk BV. Laboratory animals. Breeding, keeping, using in experiment. K.: Vyshcha shkola:1983. [Russian].
7. Academician, prof. RAMN Yvashkyn VT, prof. Rapoport SY, editors. Gastroenterology directory of practical doctor. M.: Sov. sport; 1999. [Russian].
8. Groysman SD, Karevina TG. About the effect of atropine on the stressor gastric mucosal lesions in rats Bibl. Ukaz. VINITI. Dep. Rukopisi. 1979;12:131. [Russian].
9. Orehovich VI. Modern methods in biochemistry. M.: Medicine; 1977. [Russian].
10. Gavrilov VP, Gavrilova AR, Mayorova IG. Methodology for determination of malondialdehyde in blood serum. Vopr.med.himii. 1987; 1: 118-22. [Russian].
11. 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;269-610.
12. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RI. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951;193(1):265-75.
13. Tarasov NI, Teplyakov AT, Malahovich EV and other. State of lipid peroxidation and antioxidant defense in blood of patients with myocardial infarction, burdened by circulatory failure. Ter arkh. 2002;12:12-5. [Russian].
14. Kurashvili LV, Kosoy GA, Zaharova IR. Modern notion of lipid peroxidation and antioxidant system in pathological states. Metodicheskoe posobie. Penza: Ins-t usoversh. vrachey MZ RF; 2003. [Russian].
15. Boldyirev AA. Problems of endogenous lipid peroxidation products' analysis. Itogi nauki i tehniki.1986; 5:134. [Russian].
16. Mori T, Asano T, Matsui T, Muramatsu H. Intraluminal increase of superoxide anion follow transient focal cerebral ischemia in rats. Brain Res. 1999; 2:350-7.
17. Zozulya YuA, Baraboy VA, Sutkovoy DA, editors. Oxidation-antioxidant homeostasis in norm and pathology. Kiev: Nauk. Dumka; 1997. [Russian].
18. Zhuravlev AI. Development of BN Tarusov's ideas about the role of chain processes in biology. Bioantioxidants and regulation of metabolism in norm and pathology. M.: Nauka: 1982. [Russian].
19. Elliot V, Elliot D. Biochemistry and Molecular Biology. M.: Nauka; 2002. 446 p. [Russian].
20. Tsimmerman YaS. Essays of Clinical Gastroenterology. Perm.; 1992. 56-60. [Russian].

Матеріал надійшов до редакції 26.11.2013