

УДК 577.125.8

С. Сенін, асп., К. Дворченко, канд. біол. наук,
Т. Бородіна, студ., Л. Остапченко, д-р біол. наук

ФОСФОЛІПІДНИЙ ТА ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД КЛІТИН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЩУРІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ГІПОАЦИДНОСТІ

Показано, що в умовах тривалого гіпоацидного стану змінюється фосфоліпідний та жирнокислотний склад клітин слизової оболонки шлунка щурів. Мультипробіотик "Симбітер" ацидофільний нормалізував вміст досліджуваних показників практично до контрольних значень.

It is shown that under conditions of long-term hypoacidity state was changes the phospholipid and fatty acid composition of the gastric mucosa cells of rats. Multiprobiotic "Symbiter" acidophilis normalized the content of the study parameters to near control values.

Вступ. В Україні однією з основних нозологій, що формує розповсюдженість і захворюваність хвороб органів травлення є виразкова хвороба шлунка та дванадцятипалої кишки [2]. В клінічній практиці для лікування таких кислотозалежних захворювань широко застосовують інгібітори протонної помпи (ІПП): омепразол, ланзопразол та інші. Останні знижують шлункову секрецію шляхом пригнічення активності мембранозв'язаного ферменту H^+ , K^+ – АТФази парієтальних клітин шлунка, що призводить до розвитку гіпоацидності. Тривале застосування ІПП викликає гіпергастринемію, яка як відомо призводить до розвитку колоректального раку, морфо-функціональних змін в шлунку та кишечнику. Враховуючи широке використання ІПП в медичній практиці, надзвичайно важливим є пошук шляхів корекції її небажаних наслідків. Одним із таких шляхів є застосування пробіотиків, оскільки відомо, що гіпоацидність шлункового соку сприяє розвитку дисбіозу у шлунково-кишковому тракті. Нині мультипробіотики групи "Симбітер" вже визнані як універсальні препарати для профілактики та усунення дисбіозів різного ступеню тяжкості у дітей та дорослих всіх вікових груп [4].

Відомо, що важливу роль в протіканні та прогресуванні патологічного процесу відіграють структурно-функціональні зміни клітинних мембран. Фосфоліпіди виконують не тільки структурну роль у мембранних структурах, а і забезпечують оптимальні умови для функціонування поліферментних систем, які активно впливають на внутрішньоклітинний обмін речовин. Крім того, ці ліпіди в мембранах є найбільш лабільною складовою, особливо інтенсивно поновлюється їхній жирнокислотний спектр, який є основою для біосинтезу низки біологічно-активних молекул, зокрема простагландинів, простагланцинів, тромбоксанів, лейкотрієнів та ізопростанів [9].

Метою даної роботи було оцінити фосфоліпідний та жирнокислотний склад клітин слизової оболонки шлунка щурів за умов тривалої гіпоацидності та за умов введення тваринам мультипробіотику "Симбітер" ацидофільний.

Об'єкт та методи досліджень. Досліди проводили на білих нелінійних щурах-самцях вагою 180-200 г, які були розділені на три групи та утримувались в стандартних умовах виварію. Перша група тварин (контрольна) отримувала 0,2 мл внутрішньочеревино (в/ч) та 0,5 мл перорально воду для ін'єкції протягом 28 діб. До другої групи тварин відносились щури, в яких викликали тривалий гіпоацидний стан шляхом в/ч введення 0,2 мл омепразолу (Sigma, виробництва США), розчиненого у воді для ін'єкції, у дозі 14 мг/кг ваги один раз на добу упродовж 28 діб. Третю групу складали щури, яким одночасно з омепразолом вводили мультипробіотик "Симбітер" ацидофільний (виробництва ТОВ "О.Д. Пролісок") перорально у дозі 0,14 мл/кг, розчиненого у 0,5 мл води для ін'єкції.

Ліпіди екстрагували за методом Фолча хлороформ – метанольною сумішшю (2:1, за об'ємом) [6]. Аналіз фосфоліпідного складу проводили методом двомірної тонкошарової хроматографії у системах розчинників: перший напрямок – хлороформ : метанол : бензол : аміак (65 : 30 : 10 : 6), другий напрямок – хлороформ : метанол : бензол : ацетон : крижана оцтова кислота : вода (70 : 30 : 10 : 5 : 4 : 1). Ідентифікацію індивідуальних фосфоліпідів здійснювали за допомогою відповідних стандартів. Результати виражали у відсотках від сумарної кількості фосфоліпідів [7].

Жирні кислоти метилювали, використовуючи 2М КОН в метанолі. Газохроматографічний аналіз метилових ефірів жирних кислот проводили на хроматографі Thermo Finnigan Trace GC ultra (США) з полум'яно-іонізаційним детектором. Розділення метилових похідних жирних кислот здійснювали на кварцовій капілярній колонці RTX-Wax з довжиною 60 м, внутрішнім діаметром – 0,25 мм та товщиною плівки нерухомої фази – 0,25 мкм. Хроматографічні умови: газ носій – гелій; швидкість потоку газу на колонку – 1,2 мл /хв.; температура термостату програмувалась від 50 до 230 °С; температура інжектора – 240 °С; температура детектора – 250 °С; об'єм введеної проби – 1 мкл. Для визначення кількісного складу жирних кислот використовували метод внутрішньої нормалізації [8].

Статистичну обробку результатів досліджень проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики [3]. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали за t-критерієм Ст'юдента. Вірогідною вважали різницю між порівнювальними показниками при $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Фосфоліпідний склад клітинних мембран – один з головних факторів, який визначає її структурну організацію та функціональний стан. Аналіз отриманих результатів свідчить, що в клітинах слизової шлунка контрольних тварин найбільше міститься фосфатидилхоліну (ФХ) і фосфатидилетаноламіну (ФЕА) відповідно в середньому 38 і 32 % від загальної суми фосфоліпідів (ФЛ). Найменший вміст складали лізофосфатидилхолін (ЛФХ) та фосфатидилсерин (ФС) відповідно 1,6 і 3,7% від суми усіх ФЛ.

За умов розвитку тривалого гіпоацидного стану спостерігались суттєві зміни у фосфоліпідному складі клітин СОШ щурів. Зокрема, відбувалось достовірне зменшення вмісту окремих фракцій ФЛ: ФХ (у 1,6 рази), ФЕ (у 1,7 рази), ФС (у 2 рази) та фосфатидилінозиту (ФІ) – у 1,5 рази порівняно з контрольною групою тварин. За цих же умов відбувалось підвищення вмісту ЛФХ та сфінгомієліну (СМ) у 3 та 1,3 рази відповідно (рис. 1).

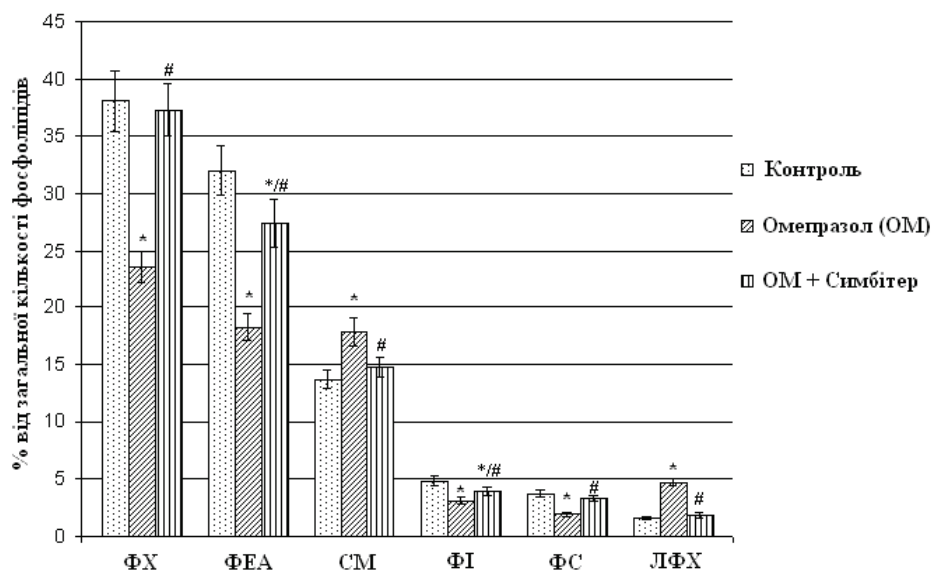


Рис. 1. Вміст фосфоліпідів у клітинах слизової оболонки шлунка щурів.

*- $p < 0,05$ порівняно з контролем;

#- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол.

Зниження рівня фосфоліпідів (ФХ, ФЕ, ФІ та ФС), може бути обумовленим активацією процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) або зниженням синтезу у клітинах СОШ за умов 28-денного введення омепразолу. Зменшення вмісту ФХ та ФІ може бути викликано активацією фосфоліпаз. Відомо, що продукти гідролізу ФХ та ФІ модулюють активність протеїнкази С, яка може відігравати суттєву роль у розвитку досліджуваної патології [9]. Необхідно також зазначити, що зниження

ФС на фоні зростання СМ, може свідчити про пригнічення сфінгомелінового циклу і керамід-індукованого апоптозу відповідно [1]. В умовах тривалої гіпоацидності це може бути додатковим ініціюючим фактором розвитку гастроканцерогенезу під впливом гіпергастринемії.

При дослідженні спектру жирних кислот (ЖК) ліпідів клітин СОШ контрольних щурів було встановлено, що вони складаються з кислот числом вуглецевих атомів від 12 до 22, насичених та ненасичених (рис. 2).

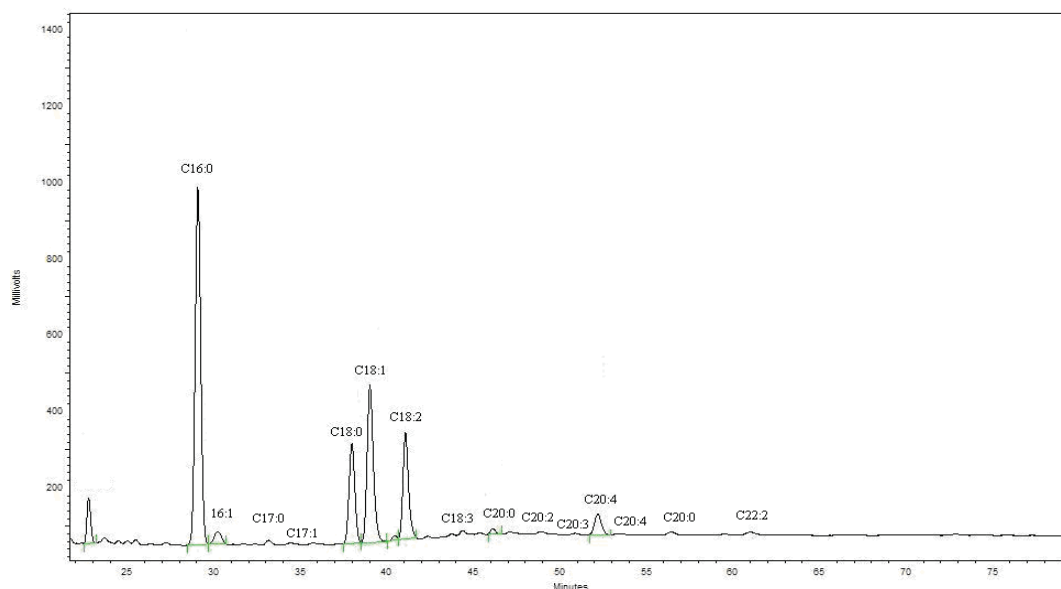


Рис. 2. Хроматограма метилових ефірів жирних кислот ліпідів клітин слизової оболонки шлунка контрольних щурів.

Встановлено, що за умов тривалого впливу омепразолу у клітинах СОШ щурів знижувався вміст основних насичених ЖК: лауринової ($C_{12:0}$) – у 7,5 рази, міристинової ($C_{14:0}$) – у 3,3 рази та пальмітинової ($C_{16:0}$) – у 1,2 рази. За цих же умов відбувалось збільшення рівня таких насичених ЖК, як маргаринової ($C_{17:0}$) – у 1,7 рази, стеаринової ($C_{18:0}$) – у 1,7 рази, арахінової ($C_{20:0}$) – у 2,7 рази та бегенової ($C_{22:0}$) – у 3 рази відносно контролю (табл. 1).

Також спостерігалось зменшення рівня мононенасичених ЖК: пальмітолеїнової ($C_{16:1}$) та олеїнової ($C_{18:1}$) відповідно у 1,7 та у 1,4 рази порівняно з контрольною групою щурів. Було зафіксовано значне збільшення вмісту гондоїнової ЖК ($C_{20:1}$) з 0,30% від загальної суми жирних кислот у контролі до 1,14% за умов гіпоацидного стану (табл. 1).

Таблиця 1. Вміст жирних кислот ліпідів (% від загальної кількості) клітин слизової оболонки шлунка щурів за умов тривалої гіпоацидності, (M ± m, n=10)

Умовне позначення жирної кислоти	Назва жирної кислоти згідно тривіальної номенклатури	Контроль	Омепразол (ОМ)	ОМ + Симбітер
C _{12:0}	Лауринова	2,04 ± 0,16	0,27 ± 0,02*	1,69 ± 0,14 [#]
C _{14:0}	Міристинова	3,46 ± 0,28	1,04 ± 0,08*	1,49 ± 0,12 [#]
C _{16:0}	Пальмітинова	39,63 ± 4,11	32,42 ± 3,12*	35,56 ± 3,16
C _{16:1}	Пальмітолеїнова	2,09 ± 0,15	1,19 ± 0,11*	1,53 ± 0,13 [#]
C _{17:0}	Маргарінова	0,56 ± 0,05	0,98 ± 0,08*	0,73 ± 0,07 [#]
C _{17:1}	Гептадеценива	0,34 ± 0,03	0,31 ± 0,03*	0,32 ± 0,03
C _{18:0}	Стеаринова	11,86 ± 1,06	20,57 ± 1,69*	15,91 ± 1,27 [#]
C _{18:1}	Олеїнова	19,42 ± 1,67	13,89 ± 1,03*	17,49 ± 1,68 [#]
C _{18:2 ω6}	Лінолева	12,11 ± 1,07	17,59 ± 1,19*	15,51 ± 1,11 [#]
C _{18:3 ω3}	Ліноленова	0,49 ± 0,04	0,51 ± 0,04	0,48 ± 0,04
C _{20:0}	Арахідова	0,61 ± 0,06	1,64 ± 0,13*	1,20 ± 0,11 [#]
C _{20:1}	Гондоїнова	0,30 ± 0,03	1,14 ± 0,08*	0,73 ± 0,07 [#]
C _{20:2}	Ейкозациєнова	0,21 ± 0,02	1,99 ± 0,21*	1,11 ± 0,19 [#]
C _{20:3 ω6}	Ейкозатрієнова	0,19 ± 0,01	0,43 ± 0,03*	0,36 ± 0,03 [#]
C _{20:4 ω6}	Арахідонова	4,88 ± 0,22	2,53 ± 0,37*	3,10 ± 0,28 [#]
C _{20:5 ω3}	Ейкозопентаєнова	0,21 ± 0,02	0,23 ± 0,02*	0,20 ± 0,02
C _{22:0}	Бегенова	0,53 ± 0,05	1,58 ± 0,14*	1,27 ± 0,12 [#]
C _{22:2}	Докозациєнова	0,20 ± 0,02	0,51 ± 0,05*	0,36 ± 0,03 [#]
C _{22:3}	Докозатрієнова	0,10 ± 0,01	0,16 ± 0,01*	0,12 ± 0,01 [#]
C _{22:4}	Докозатетраєнова	0,14 ± 0,01	0,30 ± 0,02*	0,19 ± 0,01 [#]
C _{22:5 ω3}	Докозопентаєнова	0,23 ± 0,02	0,33 ± 0,03*	0,27 ± 0,02 [#]
C _{22:6 ω3}	Докозагексаєнова	0,40 ± 0,03	0,39 ± 0,03*	0,38 ± 0,03

*- p<0,05 порівняно з контролем;

#- p<0,05 порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол

Було також показано, що за умов омепразол-індукованого гіпоацидного стану у клітинах СОШ щурів відмічено значне зростання кількості таких поліненасичених ЖК: лінолевої (C_{18:2 ω6}) – у 1,4 рази, ейкозациєнової (C_{20:2}) – у 9 разів, ейкозатрієнової (C_{20:3 ω6}) – у 2,2 рази, та докозациєнової (C_{22:2}) – у 2,5 рази. Паралельно з цим спостерігалось збільшення рівня докозатрієнової ЖК (C_{22:3}), докозатетраєнової ЖК (C_{22:4}) та докозопентаєнової ЖК (C_{22:5 ω3}) відповідно у 1,6, 2 та у 1,4 рази в порівнянні з контролем. Вміст арахідонової ЖК (C_{20:4 ω6}) знижувався з 4,88% у контролі до 2,53% за умов тривалого введення омепразолу.

Зростання вмісту ненасичених ЖК у ліпідах СОШ, може збільшувати плинність клітинних мембран, що може призвести до пригнічення активності мембранозв'язаного фермента H⁺, K⁺ – АТФази парієтальних клітин, і, тим самим, суттєво вплинути на подальший перебіг досліджуваної патології [5]. Зниження пальмітинової ЖК (C_{16:0}) може свідчити про деструктивні зміни лецитинової фракції фосфоліпідів клітин СОШ. Зменшення олеїнової ЖК (C_{18:1}), може вказувати про виснаження системи антиоксидантного захисту клітин, оскільки відомо, що ця кислота є інгібітором процесів ПОЛ. Зниження рівня арахідонової ЖК (C_{20:4 ω6}) у складі ліпідів клітин СОШ може бути пов'язано з активацією цитозольної фосфоліпази A₂ у відповідь на біологічний стимул. У результаті цієї реакції розривається складноєфірний зв'язок у другому положенні молекули фосфатидилхоліну і фосфатидилетаноламіну, що призводить до утворення вільного арахідолату і відповідних лізофосфоліпідів. В умовах розвитку тривалої гіпоацидності вільна арахідонова кислота може бути джерелом синтезу цілої низки прозапальних біологічно-активних речовин: простагландинів (ПГЕ₂ та ПГФ_{2α}) та лейкотрієнів (LTB₄, LTC₄, LTD₄ та LTE₄). З іншого боку, при окисненні ЖК, особливо арахідонової, можуть утворюватись продукти вільнорадикального окиснення ліпідів: F₂-ізопростани (5-, 8-, 12-, 15-серії), дієнові кон'югати та малоновий діальдегід. [10].

При введенні тваринам мультипробіотику "Симбітер" ацидофільний на тлі тривалої гіпоацидності, спостерігалось відновлення вмісту фосфоліпідів та жирних кислот у клітинах СОШ щурів майже до контрольних значень, порівняно з групою тварин, яким вводили

омепразол 28 діб без корекції. Такий корегуючий ефект мультипробіотику на фосфоліпідний та жирнокислотний склад клітин СОШ щурів в умовах тривалої гіпоацидності може бути зумовлений широким спектром його пробіотичних ефектів. Відомо, що окремі штами бактерій у складі мультипробіотику "Симбітер" ацидофільний здатні синтезувати вітаміни групи В, в тому числі кобаламіни (в середньому 120 мкг/кг), екзополісахарида та коротколанцюгові жирні кислоти, які проявляють мембраностабілізуючі, протизапальні та антиоксидантні властивості [4].

Висновки. Таким чином, згідно отриманих результатів експериментальних досліджень встановлено, що за умов тривалої гіпоацидності змінюється фосфоліпідний та жирнокислотний склад клітин СОШ щурів, що свідчить про порушення структурного та функціонального статусу епітеліоцитів шлунка. При введенні тваринам мультипробіотику "Симбітер" ацидофільний за умов розвитку гіпоацидного стану, зафіксовано відновлення рівня фосфоліпідів та жирних кислот практично до контрольних значень.

1. Ипатова О.М., Торховская Т.И., Захарова Т.С., Халилов Э.М. Сфинголипиды и клеточная сигнализация: участие в апоптозе и атерогенезе // Биохимия. – 2006. – №7. – С. 882-891. 2. Нейко С.М., Маяковська Н.Р. До питання етіології і патогенезу виразкової хвороби на сучасному етапі // Галицький лікарський вісник -2006. – №1. – с.122-128. 3. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. – М.: Информполиграф, 2002. – 305 с. 4. Сухомлин А.А., Непорада К.С. Экспериментальная коррекция мультипробiotиком "Симбітер" ацидофільний оксидативного стрессу та протеїназно-інгібіторного дисбалансу слинних залоз в умовах гіпергастринемії // Світ медицини та біології. – 2010. – №2. – С. 169-171. 5. Calder P. N-3 fatty acids, inflammation and immunity-relevance to postsurgical and critically ill patients // Lipids. – 2004. Vol. 39. – P.1147–1161. 6. Folch J., Lees M. and Stanley G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. – 1957. – Vol. 226. – P. 497-509. 7. Kates M. Techniques of lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids. – Amsterdam: Elsevier, 1986. – 464 p. 8. Maxwell R., Marmer W. Systematic protocol for the accumulation of fatty acid data from multiple tissue samples: Tissue handling, lipid extraction and class separation and capillary gas chromatographic analysis // Lipids. – 1983. Vol.18. – P. 453-459. 9. Poulsen C., Moughan J. Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids and the Regulation of Bone Metabolism // Experimental Biology and Medicine. – 2007. – Vol. 232. – P.1275–1288. 10. Tilley S., Coffman T., Koller B. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes // J Clin Invest. – 2001. Vol.108. – P.15–23.

Надійшла до редколегії 25.09.10