



УДК 616.33-002.44

© 2007

**К. О. Дворщенко, В. А. Ковальова, О. С. Дворщенко,  
Л. І. Остапченко**

**Характеристика білково-ліпідного складу клітин  
слизової оболонки шлунка, гепатоцитів, підшлункової  
залози, тимоцитів і плазми крові при стресовій моделі  
виразки**

*(Представлено академіком НАН України М. Є. Кучеренком)*

*The results of investigations of the general composition of proteins, neutral lipids, and phospholipids of cells of gastric mucosa, liver, pancreas, thymus, and blood plasma are given on stress models of stomach ulcer at rats. Infringements of the composition of proteins in cells of stomach mucosa, liver, thymus, and blood plasma and the augmentation of the content of lipids in all researched organs are shown.*

Виразкова хвороба займає провідне місце серед захворювань органів травлення [1, 2]. На даний час прийнято виділяти вторинні симптоматичні виразки, утворення яких пов'язано з впливом різних етіологічних факторів, таких як стрес, вживання алкоголю, використання нестероїдних протизапальних препаратів, порушення місцевого і регіонарного кровообігу тощо. Стрессова виразка шлунка виникає в екстремальних ситуаціях (при опіках, ураженнях ЦНС, інфаркті міокарда, тяжких травмах, оперативних втручаннях тощо). Її розвиток пов'язаний із превалюванням факторів агресії над факторами захисту слизової оболонки шлунка, що виникає в результаті викиду в кров стресових гормонів глюкокортикостероїдів і катехоламінів, які стимулюють утворення соляної кислоти, зменшують продукцію шлункового слизу, порушують мікроциркуляцію крові в стінці шлунка. Це, в свою чергу, призводить до крововиливів у слизову оболонку, утворення ерозій, які в подальшому перетворюються у виразки [3]. При стресових ситуаціях ерозивно-виразкові ураження шлунка та дванадцятипалої кишки розвиваються у 65–80% хворих [4].

Виразкова хвороба є системним захворюванням, яке не обмежується локальним деструктивним процесом слизової оболонки шлунка, а обумовлює порушення регулюючих систем усього організму. Анатомо-фізіологічний зв'язок шлунка з оточуючими його органами є причиною залучення в патологічний процес печінки, підшлункової залози, серцево-судинної та імунної систем [5].

На клітинному рівні важливу роль в ініціації виразки відіграє порушення функціональної системи фізико-хімічних і біохімічних процесів. Білки та ліпіди є головними компонентами біомембран клітин, вони виконують провідну роль у метаболізмі, а також беруть участь у рецепції, проникності, чутливості та загальної регуляції внутрішньоклітинних процесів. Відомо, що в основі порушення структури клітин знаходиться складний комплекс взаємозв'язаних і взаємообумовлених процесів, які охоплюють як білкову, так і ліпідну фази. Зміна в'язкості ліпідної компоненти клітин визначає структурну лабільність білків, тому дослідження білкового та ліпідного складу клітин є необхідною ланкою при вивченні даної патології.

Метою досліджень було оцінити білково-ліпідний склад клітин слизової оболонки шлунка, гепатоцитів, підшлункової залози, тимоцитів та плазми крові при стресовій моделі виразки шлунка.

**Матеріали та методи.** Досліди проводили на щурах лінії Вістар масою 180–230 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Модель “імобілізаційного стресу” створювали за методикою [6]. Отримання загальної фракції клітин слизової оболонки шлунка здійснювали за методом [7]. Гепатоцити з печінки щурів виділяли неферментативним методом [8]. Тимоцити отримували шляхом перетирання тимуса крізь чотири шари нейлонової сітки в буфері такого складу, мМ:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  — 3;  $\text{KCl}$  — 5;  $\text{NaCl}$  — 120;  $\text{CaCl}_2$  — 1; глюкоза — 10;  $\text{MgSO}_4$  — 1;  $\text{NaHCO}_3$  — 4;  $\text{HEPES}$  — 10, рН 7,4. Підшлункову залозу гомогенізували в середовищі Хенкса.

Аналіз загального складу білків досліджуваних органів виконували за допомогою електрофорезу в 10% поліакриламідному гелі за методом Леммлі [9]. Для оцінки результатів електрофорезу використовували програму TotalLab 1.10. Для екстракції ліпідів застосовували метод Кейтса [10]. Розділення та кількісне визначення вмісту фракцій нейтральних і полярних ліпідів здійснювали методом тонкошарової хроматографії та прямої денситометрії пластин у видимому світлі при  $\lambda = 475$  нм. Статистичну обробку результатів проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента.

**Результати та їх обговорення.** При дослідженні загального білкового складу клітин слизової оболонки шлунка щурів, яких піддавали дії імобілізаційного стресу, встановлено деградацію фракції білків з молекулярною масою 95 кДа (табл. 1). Показано, що в гепатоцитах при стресовій моделі виразки відбувається гідроліз групи білків з молекулярною масою 86 кДа. Отримані результати свідчать про початкові пошкодження клітин слизової оболонки шлунка та печінки. У тимоцитах на фоні стресової виразки шлунка утворюються фракції білків з молекулярними масами 10, 16 та 21 кДа, що може бути пов'язано з деградацією більш високомолекулярних білків цих клітин, оскільки при стресі відбувається інволюція тимуса [11]. У плазмі крові з'являється група білків з молекулярною масою 23 кДа. Вірогідно, ця група білків є преальбумінами, оскільки в нормі їх кількість дуже мала (0,2–0,3% загальної кількості білків плазми крові), на електрофореграмі їх виявити неможливо. Імовірно, при стресі вміст цих білків зростає, що пов'язано з їх функцією — транспорт тироксину та ретинолу. Так, при стресовій виразці під впливом тиреотропного гормону аденогіпофіза може зростати синтез тироксину, який є активним регулятором метаболічних процесів в організмі. У зв'язку з тим що при виразці шлунка ушкоджується слизова оболонка, імовірно, може збільшуватись рівень ретинолу, оскільки спиртова його форма (переважає в крові) бере участь у рості, диференціюванні клітин, забезпеченні нормального функціонування епітелію. При дії стресового фактора в підшлунковій залозі не виявлено змін загального складу білків.

Нами проведено комплексне дослідження вмісту фракцій нейтральних та фосфоліпідів клітин слизової оболонки шлунка, гепатоцитів, тимоцитів, плазми крові та підшлункової залози при стресовій моделі виразки. Встановлено зростання в клітинах слизової оболонки шлунка при стресі вмісту холестеролу (ХЛ) в 2,6 раза, триацилгліцеролів (ТГ) в 1,4 раза та загального вмісту жирних кислот (ЖК) в 2 рази (табл. 2). Визначення нейтральних ліпідів гепатоцитів при стресовій моделі виразки показало зростання вмісту ХЛ в 1,4 раза, ТГ

Таблиця 1. Молекулярні маси (Да) білкових фракцій клітин слизової оболонки шлунка, гепатоцитів, тимоцитів та плазми крові щурів за умов стресової виразки шлунка ( $M \pm m$ ;  $n = 10$ )

Клітини слизової оболонки шлунка		Гепатоцити		Тимоцити		Плазма крові	
Контроль	Стрессова модель	Контроль	Стрессова модель	Контроль	Стрессова модель	Контроль	Стрессова модель
99043	98745	93529	93752	93962	94052	111748	111000
95457	89679	90118	90349	88338	87859	103367	102378
89478	85123	86412	84072	73451	73193	96782	95541
84935	74851	83882	80669	70639	70096	57469	56772
75370	71765	80471	75037	58316	58276	32122	31577
72022	66458	75059	71635	53276	53473	27037	26759
67000	59432	72059	64360	40804	41391	17187	23190
60355	54891	64000	60840	36230	37549	9084	16497
55977	46234	60294	57555	32869	33119		9814
45899	42068	57412	55325	30070	30751		
42567	39194	54588	46819	24514	24436		
39977	32593	46353	43036	18378	21018		
33556	28659	42561	38407	13079	18680		
28999	22721	38481	36724	5201	15761		
23059	18655	36793	35041	1723	13291		
19310	14478	34870	33311		10657		
15967	7902	33041	29570		5895		
7764	4813	29617	27092		2856		
4595	2677	27366	21575				
2614		21598	17741				
		17283	14468				
		14422	12083				
		12077	9137				
		8888					

Таблиця 2. Вміст нейтральних ліпідів в органах щурів при стресовій моделі виразки шлунка ( $M \pm m$ ;  $n = 10$ )

Тип органа	Група тварин	ХЛ, мкг/мг білка	ТГ, мкг/мг білка	ЖК, %
Клітини слизової оболонки шлунка	Контроль	14,22 ± 1,5	463,2 ± 40,5	100
	Стрессова модель	36,7 ± 3,4*	657,7 ± 59,8*	215,8*
Гепатоцити	Контроль	11,0 ± 0,9	83,2 ± 6,8	100
	Стрессова модель	15,7 ± 0,9*	207,2 ± 20,3*	173,7*
Підшлункова залоза	Контроль	48,7 ± 4,2	42,3 ± 3,8	100
	Стрессова модель	76,2 ± 6,1*	59,6 ± 4,7	164,9*
Тимоцити	Контроль	15,4 ± 1,2	25,8 ± 2,8	100
	Стрессова модель	23,8 ± 2,2*	58,4 ± 4,7*	192,3*
Плазма крові	Контроль	14,8 ± 1,2	1,7 ± 0,1	100
	Стрессова модель	3,8 ± 0,4*	4,6 ± 0,3*	149,9*

\* $p < 0,05$  щодо контролю.

в 2,5 раза і ЖК в 1,7 раза щодо контролю. У клітинах підшлункової залози піддослідних щурів спостерігалось статистично значуще збільшення вмісту ХЛ та загального вмісту ЖК, відповідно на 56 та 65% порівняно з контрольними тваринами. У тимоцитах при стресовій виразці також встановлено зростання вмісту нейтральних ліпідів: ХЛ в 1,6 раза, ТГ в 2,3 раза і ЖК в 1,9 раза. У плазмі крові щурів, які піддавались дії стресового фактора, вміст ХЛ знижувався в 3,9 раза, при цьому рівень ТГ і ЖК зростав відповідно в 2,7 та 1,5 раза.

У клітині існує два основні фонди ХЛ: вільний (мембранний) та ліпопротеїдний. Обмін між вільним та зв'язаним ХЛ здійснюється за допомогою стеринпереносних білків, а також шляхом прямої передачі ХЛ з мембрани в ліпопротеїди чи зворотно. ХЛ є обов'язковим структурним компонентом клітинних мембран, який забезпечує їх стабільність. Збільшення його рівня в клітинах слизової оболонки шлунка, гепатоцитах, підшлунковій залозі та тимоцитах сприяє зниженню проникності їх мембран. Зростання рівня ЖК може бути причиною збільшення вмісту ХЛ у досліджуваних органах, оскільки ЖК є джерелом ацетил-КоА, який безпосередньо залучається у синтез ХЛ. Зниження вмісту ХЛ у плазмі крові може бути пов'язане з пошкодженням структури клітинних мембран печінки, яка потребує багато ХЛ для їх відновлення. Тому на поверхні гепатоцитів активуються специфічні рецептори (В/Е рецептори), що розпізнають та захоплюють ліпопротеїди низької щільності, які є основним холестеринвмісним класом ліпопротеїдів. Також рівень ХЛ у крові може зменшуватись за рахунок утворення при стресі кортикостероїдів, основою синтезу яких він є. Зростання в досліджуваних органах рівня ТГ та ЖК, імовірно, пов'язано з їх вивільненням із жирового депо під дією катехоламінів, оскільки при стресі мобілізуються енергетичні ресурси організму.

При визначенні фосfolіпідного складу клітин слизової оболонки шлунка при стресовій моделі виразки встановлено зниження вмісту досліджуваних груп фосfolіпідів: фосфоінозитулу (ФІ) — в 1,3 раза, фосфатидилсерину (ФС) — в 1,8 раза, фосфоетаноламіну (ФЕА) — в 1,7 раза (табл. 3).

У печінці та підшлунковій залозі при стресі відзначено зростання вмісту основних груп фосfolіпідів: лізофосфохоліну (ЛФХ) — в 3,4 та 3,5 раза, ФІ — в 2,2 та 2 рази, ФЕА — в 1,4 та 4 рази відповідно, при цьому в підшлунковій залозі на 50% також підвищений вміст ФС порівняно з контрольними тваринами.

У тимоцитах піддослідних тварин зростав рівень ЛФХ та ФІ (в 1,7 та 2,8 раза) і знижувався вміст ФЕА (в 6,6 раза). Також спостерігались зміни вмісту фосfolіпідів плазми

Таблиця 3. Вміст фосfolіпідів в органах щурів при стресовій моделі виразки шлунка, мкг/мг ( $M \pm m$ ;  $n = 10$ )

Тип органа	Група тварин	ЛФХ	ФІ	ФС	ФЕА
Клітини слизової оболонки шлунка	Контроль	20,31 ± 2,3	47,2 ± 4,5	6,3 ± 2,5	69,0 ± 6,9
	Стрессова модель	21,7 ± 2,1	35,9 ± 3,2*	14,3 ± 1,5*	41,3 ± 3,9*
Гепатоцити	Контроль	0,48 ± 0,04	6,2 ± 0,5	75,1 ± 6,1	22,7 ± 1,8
	Стрессова модель	1,63 ± 0,09*	13,3 ± 0,9*	89,7 ± 6,7	31,4 ± 2,1
Підшлункова залоза	Контроль	2,32 ± 0,2	20,23 ± 2,8	12,87 ± 1,5	15,18 ± 1,4
	Стрессова модель	8,12 ± 0,07*	41,32 ± 3,3*	19,07 ± 1,7*	61,05 ± 4,9*
Тимоцити	Контроль	1,03 ± 0,2	6,5 ± 0,7	42,2 ± 3,8	14,9 ± 1,3
	Стрессова модель	1,74 ± 0,1*	18,0 ± 1,5*	49,7 ± 3,3	2,27 ± 0,2*
Плазма крові	Контроль	1,03 ± 0,2	29,4 ± 2,3	61,2 ± 4,9	7,9 ± 0,6
	Стрессова модель	1,1 ± 0,1	24,2 ± 2,1	76,1 ± 6,8	5,7 ± 0,4

\* $p < 0,05$  щодо контролю.

крові: зростає рівень ФС (на 24%) і знижується вміст ФІ (на 18%) та ФЕА (на 28%) порівняно з контролем.

Завдяки особливостям своєї хімічної будови, наявності в складі полярних і неполярних груп, здатних до утворення зв'язків, фосфоліпіди беруть участь у будові біомембран, від стабільності їх складу залежать усі функції клітини. Фосфоліпіди визначають проникність мембран, беруть участь у транспорті сполук, проведенні нервових імпульсів тощо. Зниження рівня ФЕА в клітинах слизової оболонки шлунка та тимоцитах може призводити до пошкоджень структури клітинних мембран, а також порушення перебігу реакцій обміну, в яких він бере активну участь. Зростання рівня лізофосфатидилхоліну пов'язано з активацією пероксидного окиснення ліпідів, яке виникає в мембранних структурах клітин печінки, тимуса та підшлунковій залозі при стресі.

За загальнотеоретичною точкою зору [12, 13], зміна білково-ліпідного складу досліджуваних органів при стресовій моделі виразки шлунка пов'язана із цілою низкою подій, що відбуваються в організмі. Спочатку розвивається адаптація організму на рівні клітин та органів, у результаті мобілізуються енергетичні і структурні ресурси через збільшення рівня ЖК, глюкози, нуклеотидів, активації гіпоталамо-гіпофізарної системи, внаслідок чого зростає рівень ряду гормонів, таких як адренкортикотропний гормон, кортикостероїди і катехоламіни, відбувається пряма та опосередкована дія на активність ліпаз, фосфоліпаз з інтенсифікацією процесів пероксидного окиснення ліпідів, що сприяє підвищенню активності ферментів, рецепторів, клітинних каналів іонного транспорту. Але тривала дія негативно-го фактора та надмірна активація стресреалізуючих механізмів призводить до стресорних пошкоджень клітин і органів, що викликає розвиток виразкової хвороби.

Таким чином, отримані результати свідчать про наявність білково-ліпідних змін у клітинах слизової оболонки шлунка, гепатоцитах, тимоцитах, підшлунковій залозі та плазмі крові при експериментальній моделі стресової виразки шлунка. Зростання рівня ліпідів зв'язано з активацією процесів пероксидації та підвищенням активності фосфоліпаз у клітинах досліджуваних органів щурів. Зміщення білково-ліпідної рівноваги є причиною змін структурно-функціональних властивостей клітини, що зумовлює порушення її життєдіяльності.

1. *Martins L. C., de Oliveira Corvelo T. C., Oti H. T. et al.* ABH and Lewis antigen distributions in blood, saliva and gastric mucosa and *H pylori* infection in gastric ulcer patients // *World J. Gastroenterol.* – 2006. – **12(7)**. – P. 1120–1124.
2. *Bandyopadhyay D., Chattopadhyay A.* Reactive oxygen species-induced gastric ulceration: protection by melatonin // *Curr. Med. Chem.* – 2006. – **13(10)**. – P. 1187–1202.
3. *Coursol C. J., Sanzari S. E.* Impact of Stress Ulcer Prophylaxis Algorithm Study // *Ann. Pharmacother.* – 2005. – **39**. – P. 810–816.
4. *Mitchell J., Stanley S., Stanley S.* Update on Stress Ulcer Prophylaxis in Critically Ill Patients // *Crit. Care Nurse.* – 2006. – **26**. – P. 18–28.
5. *Богер М. М.* Язвенная болезнь. – Новосибирск: Наука, 1986. – 256 с.
6. *Гройсман С. Д., Каревична Т. Г.* О влиянии атропина на стрессовые поражения слизистой оболочки желудка у крыс // Библиогр. указ. ВИНТИ. Деп. рукопись. – 1979. – № 12. – С. 131.
7. *Таиров М. М., Берсимбаев Р. И., Аргутинская С. В., Салганик Р. И.* Клеточная локализация аденилатциклаз, стимулируемых гистамином и простагландином E2, в слизистой оболочке желудка крыс и их роль в регуляции желудочной секреции // *Биохимия.* – 1983. – **48**, вып. 6. – С. 1035–1041.
8. *Петренко А. Ю., Сукач А. Н., Росляков А. Д.* Выделение гепатоцитов крыс неферментативным методом: детоксикационная и дыхательная активности // *Биохимия.* – 1991. – **56**, вып. 9. – С. 1647–1650.
9. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – **227**. – P. 680–685.
10. *Kates M.* Techniques of lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids. – Amsterdam: Elsevier, 1986. – 464 p.

11. Цейликман О. Б., Сибиряк С. В., Цейликман В. Э. и др. Активация апоптоза как механизм развития инволюции вилочковой железы при повторных иммобилизациях // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2005. – 139, № 1. – С. 38–39.
12. Кожс Т. Стресс. – Москва: Медицина, 1981. – 213 с.
13. Панин Л. Е. Биохимические механизмы стресса. – Новосибирск: Наука, 1983. – 232 с.

Київський національний університет  
ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 26.06.2006

УДК 576.311.347+576.385.5

© 2007

М. М. Марченко, Г. П. Копильчук, О. М. Волощук

## Функціональний стан мітохондріальних мембран печінки попередньо опроміненних щурів з трансплантованою карциномою Герена

(Представлено академіком НАН України М. Є. Кучеренком)

*The ATP-ase activity and swelling intensity of mitochondria are determined in livers of rats with tumor and preliminarily irradiated rats with tumor. It is shown that, at the initial stages of oncogenesis under low doses of the preliminary irradiation, the main factor of changes in the permeability of liver mitochondrial membranes and the ATP-ase activity in rats with tumor is the radiation influence. At the terminal stages, the main factor is the neoplasm influence.*

Іонізуюча радіація та онкогенез призводять до деструктивних змін мембран мітохондрій [1, 2]. При цьому порушується спряження біологічного окиснення і фосфорилування, знижується  $\Delta\mu H^+$  та інгібується біосинтез АТФ, що призводить до переключення АТФ-синтази на АТФазну активність [3, 4].

У даному повідомленні наведено результати вивчення впливу малих доз радіації та пухлинного росту на функціональний стан мітохондріальних мембран печінки як основного гомеостатичного органу щурів-пухлиноносіїв у динаміці розвитку карциноми Герена за умов попереднього фракціонованого рентгенівського опромінення. Функціональний стан мітохондріальних мембран визначали за зміною їх проникності, яку реєстрували за високоамплітудним набуханням мітохондрій, та  $H^+$ -АТФазною активністю.

Дослідження проводили на білих безпородних щурах масою 110–130 г. Тварини були поділені на групи: I — інтактні тварини (К); II — опромінені щури (Р); III — опромінені щури, яким на 1-шу добу після припинення опромінення трансплантували карциному Герена (Р + П). Опромінення проводили протягом семи діб щодобово в дозі  $36,12 \cdot 10^{-4}$  Кл/кг (13 сГр) на рентгенівській діагностичній установці 12П6 ("Lachema", Чехія) при потужності дози  $2,58 \cdot 10^{-4}$  Кл/кг (0,93 сГр/с), напрузі 80 кВ, силі струму 40 мА, шкірно-фокусній відстані 40 см з використанням фільтрів 0,5 мм Си. На 1-шу добу після припинення опромінення проводили трансплантацію карциноми Герена.