

УДК 616.33/.342-002.44-005.1-08-092

А.О. Тюпка, А.Л. Загайко, Н.М. Кононенко

Національний фармацевтичний університет

ВПЛИВ НАНОЕМУЛЬСІЇ ЛІПОСОМ З ПОЛІФЕНОЛАМИ ВИНОГРАДНОГО НАСІННЯ НА СТРУКТУРНІ КОМПОНЕНТИ КЛІТИН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ПРИ ЇЇ ВИРАЗКОВОМУ УРАЖЕННІ

Наноемульсія ліпосом з поліфенолами виноградного насіння при виразковій хворобі шлунка сприяє процесам регенерації білків та ліпідів в клітинах слизової оболонки шлунка, що призводить до відновлення структурно-функціонального стану слизової оболонки.

Ключові слова: ліпосоми, антиоксиданти; виразкова хвороба шлунка

ВСТУП

Виразкова хвороба шлунка та дванадцятипалої кишки — найбільш розповсюджені захворювання внутрішніх органів, які за даними світової статистики розповсюджені приблизно у 10% дорослого населення. За даними Центра медичної статистики України захворюваність на виразкову хворобу в Україні за останні 10 років збільшилася на 38,4% [8].

Висока захворюваність, часті рецидиви, тривала непрацездатність хворих, внаслідок чого виникають значні економічні втрати, все це дозволяє віднести проблему виразкової хвороби до числа найбільш актуальних у сучасній медицині [9].

Створення лікарських препаратів на основі наночастинок є одним з перспективних напрямків сучасної нанобіотехнології. Наночастинки мають ряд безперечних переваг: захищають клітини організму від токсичної дії лікарських речовин; пролонгують дію введеного в організм лікарського препарату; захищають лікарські речовини від деградації; сприяють прояву спрямованої специфічності за рахунок селективного проникнення з крові в тканини, що приводить до виборчої їх концентрації в зоні осередку ураження; змінюють фармакокінетику лікарських препаратів, підвищуючи їх фармакологічну ефективність; дозволяють створити водорозчинну форму ряду гідрофобних лікарських субстанцій, підвищуючи тим самим їх біодоступність [7].

Ліпосоми близькі до біологічних мембран за хімічним складом своєї структури, тому що головним компонентом мембран живих клітин є фосфоліпіди. Вони здатні відносно легко руйнуватися в організмі та вивільняти речовини, що знаходяться всередині. При цьому до моменту взаємодії з клітинами, ліпосоми захищають свій вміст від контакту з імунною системою, що може викликати подальше руйнування цієї речовини та/або стати причиною розвитку алергічних реакцій. Також вони допомагають довше зберегти високий рівень концентрації лікарських речовин у крові та клітинах. Таким чином, ліпосоми є одним з найбільш перспективних засобів у клініці для доставки екзогенних та ендогенних речовин до уражених клітин організму хворого [4].

Порушення фізико-хімічних і біохімічних процесів на рівні епітеліальних клітин слизової оболонки шлунка (СОШ) відіграє провідну роль в ініціації виразки. Основними структурними компонентами клітин є білки та ліпіди, які виконують провідну роль у клітинному метаболізмі та відіграють першорядну роль у здійсненні рецепції, загальної регуляції внутрішньоклітинних процесів. В основі порушення структури клітин лежить складний комплекс взаємозв'язаних і взаємозумовлених процесів, що охоплюють як білкову, так і ліпідну фази. Зрозуміло, що зміна в'язкості ліпідів клітин визначає структурну лабільність білків. Тому дослідження білкового і ліпідного складу клітин СОШ є необхідним при виразковій хворобі шлунка [3].

Антиоксиданти позитивно впливають на обмін речовин та регенеративні процеси, ней-

тралізують активацію процесів перекисного окиснення ліпідів та відновлюють структурний склад мембран [1, 2]. Значне місце серед великої кількості антиоксидантів займають фенольні сполуки – природні синергісти аскорбінової кислоти, широко представлені в рослинному світі. В літературних джерелах є численні повідомлення про антиоксидантні властивості виноградно-го насіння та застосування цього біооксиданта при різних захворюваннях [6]. Нові горизонти в лікуванні багатьох захворювань, в тому числі і виразкової хвороби, відкриває один з напрямків нанобіотехнології у фармації – створення ліпосомальних форм препаратів. Ліпосомальні препарати мають більш пролонговану дію та менш токсичні. Крім того, використання ліпосомальних форм препаратів дозволяє знизити їх дозу, тому що вони менше піддаються ферментативному впливу та біодеструкції [11].

Таким чином, метою нашої роботи стало дослідження впливу антиоксиданта – наноемульсії ліпосом з поліфенолами виноградно-го насіння (НЛПВН) на загальний склад білків та ліпідів клітин СОШ при виразковій хворобі шлунка.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Досліди проведені на 30 нелінійних щурах-самцях масою 200 ± 10 г. Тварин утримували в умовах віварію при сталій температурі і вологості повітря. Усі маніпуляції на тваринах проводили під гексеналовим наркозом (60 мг/кг підшкірно) відповідно до Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментів і інших наукових цілей (Страсбург, 18.03.1986). Щури були розподілені на три групи. Перша група тварин була інтактною. У щурів другої групи (контроль) відтворювали виразку шлунка за Окабе [12]. Тваринам третьої групи, починаючи з другої доби після моделювання виразки, починали вводити НЛПВН із розрахунку концентрації поліфенолів у дозі 90 мг/кг. Евтаназію шляхом передозування ефірного наркозу у всіх серіях експерименту проводили на 3 та 5 добу після початку дослідження. Отримання загальної фракції клітин СОШ проводили за методом [5]. Аналіз білкового складу клітин СОШ проводили за допомогою електрофорезу у 10% поліакриламідному гелі за методом Лемлі [10]. Ліпіди екстрагували хлороформ-метанольною сумішшю (2:1 за об'ємом). Для запобігання окиснення ліпідів у розчинники додавали антиоксидант іонол. Промиті та очищені від водорозчинних компонентів ліпідні екстракти зразків випарювали в атмосфері азоту, а потім розчиняли в 1 мл суміші хлороформ:метанол (1:1). Для вивчення

якісного і кількісного складу нейтральних та полярних ліпідів застосовували метод тонкошарової хроматографії. Ідентифікацію ліпідів здійснювали за допомогою стандартів і високоспецифічного для фосfolіпідів реактиву Васьковського-Костецького. Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням t-критерію Ст'юдента. Достовірними враховували результати при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При вивченні білкового складу клітин СОШ тварин з виразками шлунка на 3 добу експерименту встановлено, що загальний склад білків змінювався порівняно з інтактними щурами. Так, спостерігалось зникнення фракцій білків з молекулярними масами 72, 89, 95 та 99 кДа. Ця ж картина зберігалась і на 5 добу дослідження.

Отримані результати свідчили про деградацію високомолекулярних білків у клітинах СОШ при виразці, що призводило до порушення регенераційної здатності слизової оболонки.

Після введення НЛПВН встановлено статистично достовірне відновлення білків з молекулярною масою 89, 95 та 99 кДа у загальній фракції клітин СОШ на 3 добу. При цьому білок з молекулярною масою 72 кДа не відновлювався. На відміну від експериментальної моделі виразки при введенні НЛПВН зникали молекулярні білки з масою 19 кДа, разом з цим виникала нова група білків з молекулярною масою 36 кДа. Подібна тенденція зберігалась і на 5 день досліджень. Утворення нової фракції білків при введенні НЛПВН, на нашу думку, пов'язано з включенням допоміжних механізмів, які прискорюють репаративну регенерацію клітин СОШ. Вірогідно, НЛПВН сприяє виникненню регуляторних стимулів, які викликають відкриття певних генів та відповідно синтез нових білків.

Основним структурним компонентом біомембран клітин є холестерол та фосfolіпіди. Холестерол контролює упакування та рухливість жирнокислотних ланцюгів у фосfolіпідах, а це визначає вибіркочну проникність мембран [4]. Ми провели комплексне вивчення ліпідного складу клітин СОШ: вмісту фракцій нейтральних ліпідів і фосfolіпідів у динаміці експериментальної виразки шлунка. Проведеними дослідженнями встановлено, що виразка викликає різнонаправлені зміни вмісту ліпідів, що підтверджує участь ліпідного обміну в розвитку метаболічних порушень при цій патології. Так, на 5 добу було встановлено зниження вмісту холестеролу в 1,6 рази та триацилгліцеролу в 2,8 рази (табл. 1). Введення щурам антиоксиданта – НЛПВН при-

водило до нормалізації вмісту холестеролу та підвищувало вміст триацилгліцеролу в 1,9 рази. Можна припустити, що нормалізація вмісту холестеролу під дією НЛПВН відбувається за рахунок його участі в біосинтетичних процесах цього ліпиду.

Таблиця 1

**ВМІСТ НЕЙТРАЛЬНИХ ЛІПІДІВ
(МКГ/МГ БІЛКА) У КЛІТИНАХ СОШ ЩУРІВ
ПРИ ВИРАЗЦІ ШЛУНКА
НА 5 ДОБУ ЕКСПЕРИМЕНТУ (X±X; N=10)**

Умови досліджу	Холестерол	Триацилгліцерол	Жирні кислоти
Інтактні щури	14,0±1,2	463±8,2	165±4,0
Контроль (виразка без лікування)	9,0±0,8*	165±6,0*	630±8,5*
Виразка + НЛПВН	14,5±1,0**	319±5,6**/**	310±5,2**/**

Примітки: * – p<0,05 по відношенню до інтакту; ** – p<0,05 по відношенню до контролю.

Дослідження фосфоліпідного складу клітин СОШ щурів на 5 добу експерименту показало зниження головних фракцій фосфоліпідів – фосфатиділінозиту (ФІ) і фосфатидилетаноламіну (ФЕА) в 2,5 рази, у цей же час вміст жирних кислот підвищувався в клітинах СОШ в 3,8 рази (табл. 2). Також у контролі було встановлено зростання вмісту лізофосфатидилхоліну (ЛФХ) в клітинах СОШ в 1,9 рази, що обумовлено активацією процесів пероксидації ліпідів.

Таблиця 2

**ВМІСТ ФОСФОЛІПІДІВ (МКГ/МГ)
У КЛІТИНАХ СОШ ЩУРІВ ПРИ ВИРАЗЦІ
ШЛУНКА НА 5 ДОБУ
ЕКСПЕРИМЕНТУ (X±X; N=10)**

Умови досліджу	ЛФХ	ФІ	ФЕА
Інтактні щури	20±1,2	47±2,3	69±2,5
Контроль (виразка без лікування)	37±1,8*	19±0,8*	28±1,3*
Виразка + НЛПВН	22±1,0**	29±1,5**/**	52±1,0**/**

Примітки: * – p<0,05 по відношенню до інтакту; ** – p<0,05 по відношенню до контролю.

Введення антиоксиданта приводило до зниження вмісту жирних кислот у 2 рази та зростання вмісту ФІ і ФЕА в 1,5 і 1,9 рази відповідно. Під впливом НЛПВН знижувався вміст ЛФХ в 1,7 рази, що підтверджує його антиоксидантні властивості.

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що НЛПВН при виразковій хворобі шлунка сприяє утворенню нової фракції білків з молекулярною масою 36 кДа та приводить до нормалізації ліпідного складу клітин СОШ. Це супроводжується відновленням структурно-функціонального стану слизової оболонки.

ВИСНОВКИ

НЛПВН при виразковій хворобі шлунка сприяє процесам регенерації білків та ліпідів у клітинах слизової оболонки шлунка, що приводить до відновлення її структурно-функціонального стану.

**ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ
ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ**

- <http://03ua.info/index.php?c=34>
- <http://www.eurolab.ua/encyclopedia/Gastroenterology.patient/1781/>
- Шахмаев А.А. Липосомальные наночастицы как носители лекарственных препаратов / [А.А. Шахмаев, И.В. Волчик, Ю.М. Краснопольский, В.И. Швец] // Фармаком. – 2011. – № 3. – С. 88-95.
- Сейфулла Р.Д. Фармакология липосомальных препаратов — М.: 2010. – 241 с.
- Калинин А.В. Язвенная болезнь: от патогенеза к лечению // Фарматека. – 2002. – № 9. – С. 64-66.
- Зборовская И.А. Антиоксидантная система организма, ее значение в метаболизме. Клинические аспекты / И.А. Зборовская, М.В. Банникова // Вестник Рос. АМН – 1995. – № 6. – С. 53-60.
- Барабой В.А., Сутковой Д.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии. Ч. 2 / Под ред. Ю.А. Зозули – К.: Черныбыльинтер-информ, 1997. – 220 с.
- Харченко В.В. Природні біооксиданти та печінка / В.В. Харченко // Сучасна гастроентерологія. – 2007. – №6 (38). – С. 79-85.
- Mozafari M.R. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology / M.R. Mozafari, C. Johnson, S. Hatziantoniou et al. // Journal of Liposome Research. – 2008. – Vol. 18, № 4, P. 309-327.
- Okabe S. A method for experimental, penetrating gastric and duodenal ulcer in rats / S. Okabe, J.L.A. Roth, C.J. Pfeiffer // Digestive Diseases. – 1971. – Vol. 16, № 3. – P. 277-284.
- Таиров М.М. Клеточная локализация аденилатциклаза, стимулируемых гистамином в слизистой оболочке желудка крыс и их роль в регуляции желудочной секреции / М.М. Та-

иров, Р.И. Берсимбаев, С.В. Аргутинская // Биохимия. – 1983. – Т. 48, № 6. – С. 1035-1041.
12. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacterio-

phage T 4 / U.K. Laemmli// Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680-685.

УДК 616.33/.342-002.44-005.1-08-092

А.А. Тюпка, А.Л. Загайко, Н.Н. Кононенко

ВЛИЯНИЕ НАНОЭМУЛЬСИИ ЛИПОСОМ С ПОЛИФЕНОЛАМИ ВИНОГРАДНЫХ СЕМЯН НА СТРУКТУРНЫЕ КОМПОНЕНТЫ КЛЕТОК СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА ПРИ ЕЁ ЯЗВЕННОМ ПОРАЖЕНИИ

Наноэмульсия липосом с полифенолами виноградных семян при язвенной болезни желудка способствует процессам регенерации белков и липидов в клетках слизистой оболочки желудка, что приводит к восстановлению структурно-функционального состояния слизистой оболочки.

Ключевые слова: липосомы; антиоксиданты; язвенная болезнь желудка

UDC 616.33/.342-002.44-005.1-08-092

A.A. Tyupka, A.L. Zagayko, N.M. Kononenko

INFLUENCE OF THE NANOEMULSION OF LIPOSOMES WITH POLYPHENOLS OF GRAPE SEEDS ON THE STRUCTURAL COMPONENTS OF CELLS OF A GASTRIC MUCOSA BY IT'S ULCERATION

Nanoemulsion of liposomes with polyphenols of grape seeds in gastric ulcer promotes regeneration processes of proteins and lipids in the cells of the gastric mucosa, whah leads to the restoration of structural and functional state of the mucous membrane.

Key words: liposomes; antioxidants; gastric ulcer

Адреса для листування:
Харків, 61022, вул. Мельникова, 12,
НФАУ, кафедра паталогічної фізіології
Тел. (057) 706-30-66.
E-mail:patology@ukrfa.ua

Надійшла до редакції:
22.12.2011