УДК 612.33+612.015.13

Т.В. Вовкун[1], П.І. Янчук[1], Л.Я. Штанова[1], С.П. Весельський[1], А.С. Шаламай[2]

Участь парасимпатичної ланки нервової системи в реалізації дії біофлавоноїдів на шлункову секрецію у щурів

[1] Київський національний університет ім. Тараса Шевченка;
[2] ЗАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ», Київ; E-mail: shtanova@ukr.net

Ми дослідили ефекти корвітину, модифікованої форми кверцетину, на секреторну функцію шлунка щурів з перев'язаним пілорусом та фізіологічні механізми, залучені в їх забезпечення. У тварин, яким корвітин вводили в дозі 5 мг/кг, незалежно від шляху введення – в шлунок чи в дванадцятипалу кишку, порівняно з контрольною групою, не спостерігали змін ні об'єму соку, ні загальної продукції хлористоводневої кислоти (ХК). Кількість препарату 40 мг/кг викликала збільшення об'єму шлункового соку та продукції ХК як при внутрішньошлунковому, так і внутрішньодуоденальному введенні. Нами було також встановлено, що після застосування великої дози корвітину (40 мг/кг, внутрішньошлунково) в крові експериментальних тварин спостерігалося вірогідне зменшення вмісту глюкози, чого не було виявлено при використанні 5 мг/кг препарату. Неспецифічний антагоніст М-холінергічних рецепторів атропін майже повністю блокував посилення шлункової секреції, яка була викликана введенням у шлунок 40 мг/кг корвітину. Виходячи з одержаних результатів, можна зробити висновок про те, що надходження до шлунка щура корвітину в кількості 40 мг/кг викликає гіпоглікемію, яка може спричинити зростання активності блукаючого нерва з наступною стимуляцією шлункової секреції. Блокада атропіном секреторної відповіді шлунка щурів, яка спостерігалася після застосування корвітину в зазначеній дозі, підтверджує участь парасимпатичної нервової системи в її забезпеченні.

Ключові слова: шлунок; корвітин; гіпоглікемія; шлункова секреція; хлористоводнева кислота; парасимпатична нервова система; перев'язування пілоруса.

ВСТУП

Кверцетин (3,5,7,3',4'-пентагідроксифлавон) – один із найбільш поширених у природі флавоноїдів, відомий насамперед як сильний антиоксидант. Біохімічні механізми його дії на клітину частково пов'язують з гальмуванням активності низки ферментів, зокрема редуктази, ксантиноксидази, фосфодіестерази, Ca^{2+}-АТФази, ліпоксигенази, циклооксигенази [1]. Гальмуючи активність фермента H^+,K^+-АТФази ізольованих парієтальних клітин, кверцетин пригнічує стимульовану гістаміном секрецію хлористоводневої кислоти (ХК) з цих клітин [2]. Дані інших авторів, одержані в дослідах in vivo свідчать, що кверцетин жодним чином не впливає на продукцію ХК [3]. Загалом його дія, як і інших флавоноїдів, є складною і її часто навіть називають парадоксальною. Ця сполука цікава тим, що різні її дози можуть викликати протилежні ефекти. Так, у малих дозах він виступає як антиоксидант, а у великих – як прооксидантна сполука [4]. Більшість досліджень ефектів кверцетину проведено in vitro, тому фізіологічні механізми його впливу на органи цілісного організму в переважній більшості не вивчені. Кверцетин, який є превалюючим флавоноїдом у щоденному раціоні людини, потрапляє до організму через шлунок, проте, внаслідок низької біо-

© Т.В. Вовкун, П.І. Янчук, Л.Я. Штанова, С.П. Весельський, А.С. Шаламай

доступності майже не всмоктується і тому не має значного впливу на цей орган [5]. Для кращого засвоєння та збільшення терапевтичної ефективності флавоноїдів наразі розроблено спеціальні системи доставки їх у клітину – це такі, як ліпосоми, мікросфери, наночастинки, трансферосоми, етосоми тощо [6]. Конкретно для кверцетину було розроблено нанокристали – значно ефективніші у впливі на клітину, ніж оригінальна субстанція [7]. Вітчизняний препарат корвітин має підвищену розчинність у воді та в інших рідинах. При цьому він демонструє всі біологічні ефекти, притаманні кверцетину, зокрема є потужним антиоксидантом і блокатором цілої низки клітинних ферментів. На відміну від оригінального кверцетину, корвітин швидко проникає в кров'яне русло, протягом тривалого часу діючи на тканини та клітини. Тут його зв'язок з білками плазми крові становить більше, ніж 98 % [8]. Раніше ми показали, що малі дози корвітину захищають слизову оболонку шлунка (СОШ) щура від ураження етанолом, а великі – навпаки, посилюють. Далі на щурах з перев'язаним пілорусом нами було встановлено, що при внутрішньошлунковому застосуванні малих доз корвітину об'єм шлункового соку та загальна продукція ХК в шлунку не змінюються, тоді як великі дози досліджуваного препарату провокували істотне збільшення цих показників шлункової секреції [9, 10]. Причини зміни об'єму секреції загалом та кислотопродукції в шлунку щура з перев'язаним пілорусом зокрема при застосуванні підвищених доз корвітину лишаються нез'ясованими.

Метою нашої роботи було дослідження фізіологічних механізмів, на яких базується встановлений ефект корвітину.

МЕТОДИКА

Всі експерименти проводили з дотриманням існуючих Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, що використовуються в експериментах (Страсбург, 1986). Дослідження проведені в гострих дослідах на білих безпорідних щурах масою 210–270 г, яких утримували у віварії в умовах природного освітлення на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до питної водопровідної води. Щурів наркотизували тіопенталом натрію (35 мг/кг, внутрішньоочеревинно). Шлункову секрецію стимулювали за Шеєм 4-годинним перев'язуванням пілоруса [11]. Досліди розпочинали натще: напередодні тварин утримували голодними протягом 24 год. Усіх щурів було поділено на 13 груп, по 6–8 тварин у кожній. Вплив корвітину на шлункову секрецію при введенні препарату в шлунок вивчали на 3 групах щурів: I – контрольна група (фізіологічний розчин, 5 мл/кг), II група – корвітин, 5 мг/кг, III група – корвітин, 40 мг/кг. Ще по стільки ж груп тварин знадобилося: а) для вивчення шлункової секреції після введення корвітину в дванадцятипалу кишку; б) для визначення вмісту глюкози в крові. При дослідженні впливу блокади М-холінорецепторів атропіном на зміни інтенсивності шлункової секреції, викликані введенням корвітину в дозі 40 мг/кг, було залучено 4 групи тварин: I – контрольна (фізіологічний розчин); II – із введенням в шлунок корвітину (40 мг/кг); III – з внутрішньовенними ін'єкціями атропіну (1 мг/кг); IV – атропіну (1 мг/кг) і корвітину (40 мг/кг). Після наркотизування у щурів відкривали черевну порожнину та діставали шлунок. Пілоричну частину шлунка перев'язували лігатурою. Корвітин розчиняли у фізіологічному розчині безпосередньо перед роботою. Для того щоб виявити, які саме механізми задіяні в ефектах корвітину на шлункову секрецію у щурів з перев'язаним пілорусом – локальні чи системні, ми використали два шляхи введення препарату – внутрішньошлунковий і внутрішньодуоденальний. Усі розчини вводили через металеву орогастральну трубку. В експериментах з блокадою М-холінорецепторів атропін вводили через 5 хв після перев'язування пілоруса, а корвітин – через 15 хв. Після 4 год

досліду шлунки видаляли, а їх вміст збирали в градуйовані пробірки. Щурів виводили з досліду, ввівши велику дозу наркозу. У зібраних пробах шлункового соку визначали: загальний об'єм (мілілітри) та загальну продукцію ХК в мікромоль за 1 год. Після вимірювання об'єму сік центрифугували протягом 10 хв при 3500 хв$^{-1}$, супернатант переносили в хімічні скляночки, додавали до нього 5 мл дистильованої води, вимірювали його pH (іономір "pH-150") і титрували 0,01 N розчином NaOH до pH 7,0 для визначення загальної продукції ХК.

Вміст глюкози в крові вимірювали в мілімолях на 1 л за допомогою глюкометра та спеціальних тестів. Кров для аналізу брали з хвостової вени. В кожної тварини протягом експерименту було 5 таких аналізів: першу пробу крові відбирали за 10 хв до перев'язування пілоруса і введення корвітину в шлунок (вихідний рівень), всі наступні – в кінці кожної години експерименту. Така схема досліду дає змогу визначити не лише різницю між вихідним та кінцевим вмістом глюкози в крові, а й динаміку процесу, якщо така існує.

Статистичний аналіз одержаних результатів здійснювали за стандартними методами варіаційної статистики з використанням W-тесту Шапіро-Уілка та критерію t Стьюдента. Відмінності між окремими групами вважали статистично значущими при $P<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У тварин, які одержували 5 мг/кг корвітину, незалежно від способу введення, не спостерігали змін ні об'єму соку, ні загальної продукції ХК, порівняно з контрольною групою. Доза препарату 40 мг/кг викликала збільшення цих показників як при внутрішньошлунковому, так і внутрішньодуоденальному введенні корвітину (таблиця).

Вміст глюкози в крові щодо контролю не змінювався при дозі корвітину 5 мг/кг і зменшувався при введенні 40 мг/кг препарату (рис. 1). Вірогідне зменшення цього показника було виявлене в кінці другої години досліду і тривало до завершення експерименту, поступово повертаючись до вихідного рівня. Мінімальний вміст глюкози в крові відмічали після третьої години досліду.

Щоб підтвердити нашу думку про те, що індукована корвітином в дозі 40 мг/кг секреція шлункового соку та ХК опосередкована парасимпатичними шляхами, ми дослідили вплив на неї неселективного антагоніста мускаринових рецепторів – атропіну і порівняли його з ефектом самого атропіну

Ефекти різних доз корвітину на показники шлункової секреції щурів з перев'язаним пілорусом

Схема досліду	Об'єм шлункового соку, мл	Δ, %	Продукція хлористоводневої кислоти, мкмоль/год	Δ, %
Внутрішньошлункові введення (n=8)				
фізіологічного розчину 5 мл/кг	3,7±0,16	–	47,7±2,97	–
корвітину 5 мг/кг	3,7±0,16	–	48,7±3,0	–
40 мг/кг	8,1±0,32***	220	253,2±12,2***	421
Внутрішньодуоденальні введення (n=6)				
фізіологічного розчин 5 мл/кг	2,84±0,47	–	44,56±4,2	–
корвітину 5 мг/кг	3,01±0,4	–	45,2±4,8	–
40 мг/кг	6,3±0,65***	210	169,65±24,8***	275

***P<0,001 щодо контролю.

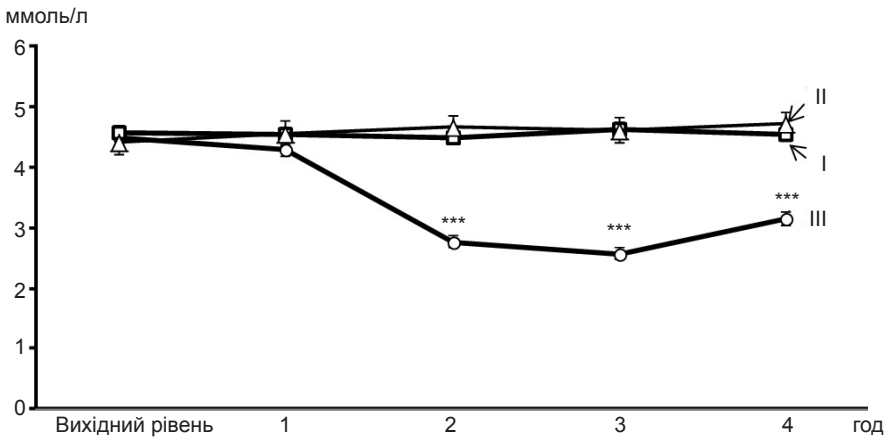

Рис.1. Зміни вмісту глюкози в крові щурів при внутрішньошлунковому введенні 40 мг/кг корвітину: I – контроль; II – після введення корвітину в дозі 5 мг/кг; III – після введення корвітину в дозі 40 мг/кг. ***P<0,001 щодо вихідного рівня

на секрецію шлунку щура з перев'язаним пілорусом. Як показано в таблиці, одне лише перев'язування пілоруса стимулювало шлункову секрецію у щурів: об'єм соку становив 3,67±0,16 мл, загальна продукція кислоти – 47,68±2,97 мкмоль/год. Корвітин в дозі 40 мг/кг збільшував ці показники: об'єм соку до 8,1±0,32 мл, дебіт кислоти – до 253,2±12,2 мкмоль/год. Атропін зменшував об'єм соку інтактних щурів до 0,71±0,06 мл, а в групі з корвітином – до 0,63±0,07 мл; загальна продукція ХК у цих самих групах знижувалася до 3,7±0,21 та 3,9±0,32 мкмоль/год відповідно (рис. 2).

Активність шлункових залоз регулюється як місцевими, так і центральними механізмами. Провідна роль у передачі центральних сигналів до шлунка належить блукаючим нервам. Перев'язування пілоруса збільшує шлункову секрецію внаслідок активації міс-

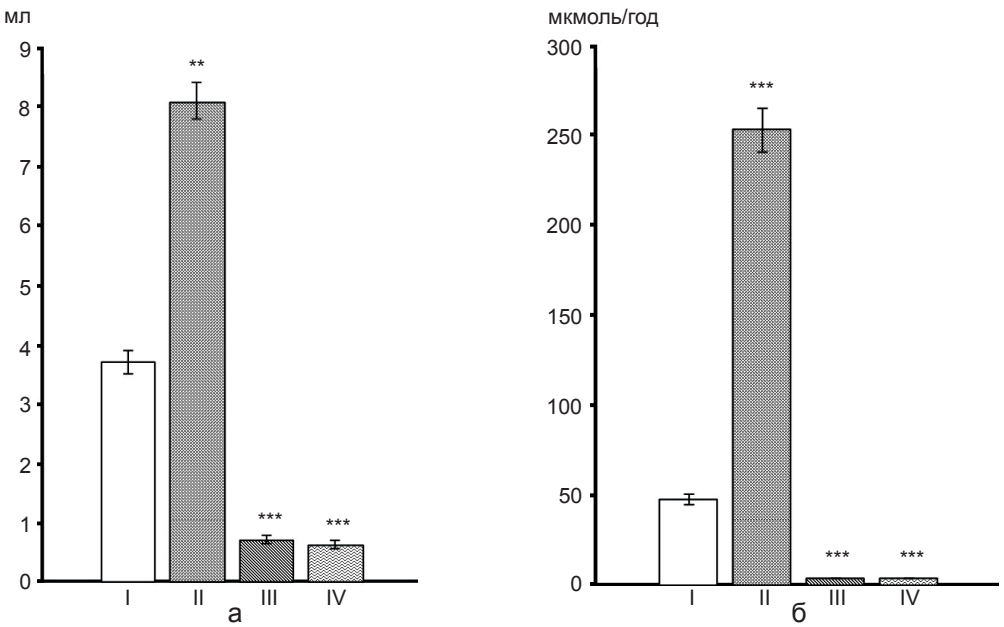

Рис. 2. Вплив блокади М-холінорецепторів атропіном на зміни інтенсивності шлункової секреції у щурів з перев'язаним пілорусом, викликані введенням корвітину в дозі 40 мг/кг: а – об'єм соку, б – продукція хлористоводневої кислоти; I – контроль (фізіологічний розчин); II – корвітин, 40 мг/кг; III – атропін, 1 мг/кг; IV – атропін і корвітин. **P<0,01; ***P<0,001

цевих ваго-вагальних рефлексів, збуджених стимуляцією механорецепторів антральної зони СОШ [12]. Локальні механізми стимуляції шлункової секреції включають холін- та пептидергічні волокна шлункової стінки, а також гістамін і пептиди чи гормони (гастрин, соматостатин), що секретуються фундальними і антральними залозистими клітинами. Гастрин, гістамін та ацетилхолін стимулюють шлункову секрецію, збільшуючи як кількість соку, так і вміст ХК [13]. Згідно з даними літератури, у щура з перев'язаним пілорусом застосування гістаміну чи карбахоліну посилює секрецію шлункового соку в середньому в 1,5 раза, проте продукцію ХК збільшує лише гістамін (також в 1,5 раза) [14]. Результати нашої роботи свідчать, що корвітин в дозі 40 мг/кг посилює секрецію ХК у шлунку з перев'язаним пілорусом більше ніж у 4 рази. Така шлункова секреція можлива при центральній активації блукаючого нерва, зокрема через зниження вмісту глюкози в крові, яке можна спровокувати в експерименті введенням інсуліну. Гіпоглікемія є потужним подразником ядер блукаючих нервів. Через неї інсулін викликає значне і довготривале посилення роботи шлункових залоз, яке гальмується атропіном [15]. Вміст глюкози в крові знижується вже через 30 хв після введення інсуліну і для активації шлункової секреції він не повинен перевищувати 50 мг% [16]. У науковій літературі можна знайти підтвердження тому, що кверцетин може прямо стимулювати секрецію інсуліну β-клітинами підшлункової залози завдяки збільшенню надходження Ca^{2+} через L-тип кальцієвих каналів [17]. Оскільки корвітин добре розчиняється у воді та інших розчинниках і досить швидко потрапляє в кров'яне русло, то при введенні його у великих дозах у плазмі крові може швидко накопичуватися значна його кількість, провокуючи надходження інсуліну з підшлункової залози. В дослідах на щурах було показано, що екстракти лікарських рослин з високим вмістом флавоноїдів, зокрема кверцетину, викликають дозозалежне зменшення вмісту глюкози в крові тварин як з експериментальним діабетом, так і з глікемією в межах норми [18].

Отже, попереднє застосування атропіну пригнічує шлункову секрецію у щурів, викликану корвітином, до того ж рівня, що й у тварин, яким вводили лише атропін. Цілком можливо, що стимуляція корвітином секреції шлункового соку і ХК здійснюється за участю парасимпатичної нервової системи, активація якої може бути викликана гіпоглікемією, зумовленою введенням великої дози препарату.

Т.В. Вовкун, П.И. Янчук, Л.Я. Штанова, С.П. Весельский, А.С. Шаламай

УЧАСТИЕ ПАРАСИМПАТИЧЕСКОГО ЗВЕНА НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ В РЕАЛИЗАЦИИ ДЕЙСТВИЯ БИОФЛАВОНОИДОВ НА ЖЕЛУДОЧНУЮ СЕКРЕЦИЮ У КРЫС

Мы исследовали эффекты корвитина, модифицированной формы флавоноида кверцетина,на секреторную функцию желудка крысы с перевязанным пилорусом и физиологические механизмы, вовлеченные в их обеспечение. У животных, которые получали 5 мг/кг корвитина, независимо от способа введения – в желудок или в двенадцатиперстную кишку не наблюдали изменений ни объема желудочного сока, ни общей продукции хлористоводородной кислоты сравнительно с контрольной группой. Доза препарата 40 мг/кг вызывала увеличение объема сока и продукции хлористоводородной кислоты как при внутрижелудочном, так и внутридуоденальном введении. Нами также было установлено, что после применения большой дозы корвитина в крови экспериментальных животных наблюдалось достоверное уменьшение содержания глюкозы, чего не было обнаружено при использовании 5 мг/кг препарата. Неспецифический антагонист М-холинергических рецепторов атропин почти полностью блокировал усиление желудочной секреции, вызванное введением в желудок корвитина в большой дозе. Исходя из полученнных результатов, можно сделать вывод о том, что поступление в желудок крысы с перевязанным пилорусом большой дозы корвитина провоцирует гипогликемическую реакцию крови, которая может стать причиной увеличения активности блуждающего нерва с последующей стимуляцией желудочной секреции. Блокада атропином секреторного ответа желудка, которая наблюдалась после применения 40 мг/кг корвитина, подтверждает участие парасимпатической нервной системы в этом процессе у крысы с перевязанным пилорусом.

Ключевые слова: желудок; корвитин; гипогликемия; желудочная секреция; хлористоводородная кислота; парасимпатическая нервная система; перевязка пилоруса.

T.V. Vovkun[1], P.I. Yanchuk[1], L.Y. Shtanova[1], S.P. Veselskyy[1], A.S. Shalamay[2]

PARTISIPATION OF PARASYMPATHETIC PART OF NERVOUS SYSTEM IN REALIZATION OF BIOFLAVONOIDS ACTION ON GASTRIC SECRETION IN RATS

In this study we investigated the effects of corvitin – modified form of flavonoid quercetin on the stomach secretory function and physiological mechanisms involved in the maintenance of such effects in rat's pylorus-ligated model. In animals which corvitin was injected at a dose of 5 mg/kg, regardless of the route of administration – in the stomach or duodenum, did not observe any changes in the volume of gastric juice or general production of hydrochloric acid, compared with the control data. Dose of 40 mg/kg caused an increase in the volume of gastric juice and hydrochloric acid output as when administered in the stomach and in the duodenum. We also found that after the application of a large dose of corvitin (intragastrically) in the blood of experimental animals showed reduction in glucose levels, which was not detected when using the drug in a dose of 5 mg/kg. Nonspecific antagonist of M-cholinergic receptors – atropine almost completely blocked the enhancement of gastric secretion, which was caused by the introduction into the stomach of corvitin in large dose. From the present data, it is reasonable to conclude that intragastric administration of a large dose of corvitin to pylorus-ligated rats induces hypoglycemic reaction of blood, which may causes an increase in vagus nerve activity with subsequent stimulation of gastric secretion. The increase in gastric juice volume and gastric acid output induced by corvitin was completely inhibited by atropine. These results suggested that the increase in gastric secretion induced by intragastrically administered corvitin could be mediated by the parasympathetic nervous system.

Key words: stomach, corvitin, hypoglycemia, gastric secretion, hydrochloric acid, parasympathetic nervous system, pylorus ligation.

[1] Kyiv Taras Shevchenko National University;
[2] Closed Joint Stock Company «Borschagovsky Chemical-Pharmaceutical Plant «, Kyiv, Ukraine

REFERENCES

1. Ravichandran R, Rajendran M, Devapiriam D. Antioxidant study of quercetin and their metal complex and determination of stability constant by spectrophotometry method. Food Chem. 2014;146:472–8.
2. Beil W, Birkholz C, Sewing KF. Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and Helicobacter pylori growth. Arzneimittelforschung. 1995;45(6):697–700.
3. Min YS, Lee SE, Hong ST, Kim HS, Choi B-C, Sim SS, Whang WK, Sohn UD**.** The Inhibitory Effect of Quercetin-3-O-β-D-Glucuronopyranoside on Gastritis and Reflux Esophagitis in Rats. Korean J Physiol Pharmacol. 2009;13:295–300.
4. Choi EJ, Chee KM, Lee BH. Anti- and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. Eur J Pharmacol. 2003;482(1-3):281–85.
5. Murota K, Terao J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. Arch Biochem Biophys. 2003;417:12–17.
6. Kesarwani K, Gupta R, Mukerjee A. Bioavailability enhancers of herbal origin: an overview. Asian Pac J Trop Biomed. 2013;4:253–66.
7. Sahoo NG, Kakran M, Shaal LA, Li L, Muller RH, Pal M, Tan LP. Preparation and characterization of quercetin nanocrystals. J Pharm Sci. 2011;100(6):2379–90.
8. Mokhort NA, Shalamay AS, Frantsuzova SB. Study of pharmacotherapeutic properties dosage forms of quercetin. In: Moibenko AA. Bioflavonoids as organoprotectors (quercetin, corvitin, quertin). Kiev: Naukova Dumka; 2012. – p. 74–117. [Ukrainian].
9. Vovkun TV, Yanchuk PI, Shtanova LY, Veselskiy SP, Baranowskiy VA. Effect of Corvitin on secretory processes and blood flow in the gastric mucosa of rats. Physiol Zh. 2013;59(1): 40–7. [Ukrainian].
10. Tetyana V. Vovkun, Petro I. Yanchuk, Lydia Y. Shtanova, Stanislav P. Veselsky, Vasyl A. Baranowskyy. Effect of Corvitin on Secretory Processes and Blood Flow in the Rat Gastric Mucosa. Int J Physiol and Pathophysiol. 2014;i4.70(4):335-43.
11. Shay H, Komarov S, Fels SS, Meranze D, Gruenshtein M, Siplet H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. Gastroenterol. 1945;5:43–61.
12. Hakanson R, Hedenbro J, Liedberg G, Sundler F, Vallgren S. Mechanisms of gastric acid secretion after pylorus and oesophagus ligation in the rat. J Physiol. 1980;305:139–49.
13. Furutani K, Aihara T, Nakamura E, Tanaka S, Ichikawa A, Ohtsu H, Okabe S. Crucial Role of Histamine for Regulation of Gastric Acid Secretion Ascertained by Histidine Decarboxylase-Knockout Mice. The J of Pharm and Experim Ther. 2003;307:331–38.
14. Kurasawa T, Chikaraishi Y, Naito A, Toyoda Y, Notsu Y. Effect of *humulus lupulus* on gastric secretion in a rat pylorus-ligated model. Biol Pharm Bull. 2005;28(2):353–57.
15. Kovacs TO1, Lloyd KC, Walsh JH. Gastrin partially mediates insulin-induced acid secretion in dogs. Peptides. 1996;17(4):583–87.
16. Polacek MA, Ellison EH. Insulin-Induced Stimulation of Gastric Acid Secretion. JAMA. 1963;183(12):1006–7.
17. Bardy G, Virsolvy A, Quignard JF, Ravier MA, Bertrand G, Dalle S, Cros G, Magous R, Richard S, Oiry C. Quercetin induces insulin secretion by direct activation of L-type calcium channels in pancreatic beta cells. Br J Pharmacol. 2013;169(5):1102–13.
18. Ojewole JA. Hypoglycemic effect of Sclerocarya birrea [(A. Rich.) Hochst.] [Anacardiaceae] stem-bark aqueous extract in rats. Phytomedicine. 2003;10(8):675–81.

Матеріал надійшов до редакції 02.10.1014