

УДК: 616.33.002.44:539.1.047

ОСОБЛИВОСТІ ПОЄДНОЇ ДІЇ ОМЕПРАЗОЛУ І ФАМОТИДИНУ НА ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ШЛУНКОВОГО СОКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ ІМУНОДЕПРЕСІЇ

**Євтушенко Н.В., *Іліка В.Г., Говоруха Т.М., Бабан В.М.,
Весельський С.П.**

*НДІ фізіології ім. академіка Петра Богача Київського національного
університету ім. Тараса Шевченка, Київ*

**Вінницький національний медичний університет ім. М.І.Пирогова*

Показано, що через 21 день поєднаного впливу омепразолу з фамотидином збільшувалися вдвічі значення рН шлункового соку тварин, а також відмічалися зміни в складі білків останнього. Додатковий вплив антитимоцитної сироватки (імунодепресія) і етанолу погіршували ефект використаних препаратів, про що свідчить подальше пошкодження слизової оболонки шлунку і наявність низькомолекулярних білкових фракцій у шлунковому соку тварин.

Ключові слова: Helicobacter pylori, омепразол, фамотидин, ССК-2/гастриновий рецептор, H2-гістаміновий рецептор.

Вступ

Відомо, що високий рівень секреції соляної кислоти є основним чинником ураження слизової оболонки шлунку (СОШ) при ослабленні факторів захисту останньої. Серед лікарських препаратів, які суттєво знижують рівень секреції соляної кислоти у шлунку, є похідне бензімідазолу – омепразол. Ефективність дії його, як інгібітора протонної помпи, визначається швидкістю синтезу нових молекул соляної кислоти, а також тривалістю циркуляції омепразолу в крові [Wolfe, Sachs, 2000]. Показано, що при довготривалому безперервному застосуванні омепразолу у хворих спостерігається гіпергастринемія, що проявляється явищами атрофічного гастриту, розвитком вузлової гіперплазії ентерохроматоїдних клітин СОШ [Renga et al., 1997]. За розвитком шлункової метаплазії, дисплазії, карциноми in situ та раку шлунку спостерігали у трансгенних (INS-GAS) мишей після внутрішньо-венного навантаження омепразолом [Takaishi et al., 2005]. Автори дійшли до висновку, що хронічна гіпергастринемія у мишей разом із інфекцією *Helicobacter pylori* може призвести до зменшення кількості парієнтальних клітин та розвитку раку шлунку. Крім своєї участі у секреції шлункового соку, парієнтальні клітини виділяють ще певні фактори росту, які впливають на диференціацію го-

ловних клітин СОШ.

Подальшими дослідженнями на моделі трансгенних мишей ці вчені встановили, що омепразол самостійно не здатний викликати атрофію слизової оболонки шлунку і канцерогенез в інфікованих мишей. Комбіноване ж використання антагоністів ССК-2/гастринового й гістамінового H2-рецепторів (синергічний інгібіторний ефект) може спричинити розвиток атрофії та раку шлунку [Takaishi et al., 2005]. Існує також синергізм між інфекцією *Helicobacter pylori* та нестероїдними протизапальними засобами (НПЗЗ) в розвитку виразкової хвороби та виразкових кровотеч [Huang et al. 2002]. У літературі є дані щодо змін показників рівнів базальної та стимульованої секреції соляної кислоти в залежності від кількості гастрину в плазмі крові при періодичному прийомі омепразолу [Hewson, Yeomans, 1988].

Зокрема, у пацієнтів із гастроезофагальною рефлюксною хворобою впродовж двох тижнів проводили щодобові дослідження рН шлункового соку з метою оцінки ефективності курсу лікування інгібітором протонної помпи. Крім цього, цікавим є факт впливу надвисоких доз омепразолу в поєднанні з фамотидином (блокатором H2 гістамінових рецепторів) на функціональний стан СОШ [Warrington et al., 2002].

Мета роботи: дослідити, як за умов

імунодепресії поєднана дія омепразолу і фамотидину впливає на характеристики шлункового соку щурів.

Матеріали та методи

Були запропоновані різні схеми введення омепразолу для відтворення моделі гіпергастринемії [Kiilerich et al., 1995; Liu et al., 1998]. В експериментах було застосовано як принцип «уікендової терапії» – послідовне (через шість годин) та переривчасте введення омепразолу і фамотидину, так і феномен «рикошетного спалаху», що є наслідком введення щурам *per os* дози омепразола, яка у 5,7 рази перевищувала рекомендовану фармакологічну (400 мкмоль/кг = 13,8 мг/кг маси тіла) дозу. Впродовж 21 доби ми досліджували на фоні імунодепресії спільну дію фамотидину й омепразолу на секрецію HCl, якісні характеристики білкових фракцій шлункового соку та вільно-радикальне окиснення ліпідів. У роботі були використані реактиви вітчизняного та іноземного виробництва кваліфікації ч.д.а., омепразол (Dr.Reddy's Labs., Індія), фізіологічний розчин стерильний, фамотидин (ДНЦЛЗ, м. - Харків, Україна), етанол 96 відсотковий. Дослідження проводили на 90 білих самицях щурів лінії Westar (масою 150-180 г) із дотриманням нормативів конвенції Ради Європи з біоетики (1997), Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію з 24-годинною харчовою депривацією і вільним доступом до води перед початком спроби. Експериментальну виразку шлунку моделювали визначим пероральним введенням впродовж 1 доби 0,5 мл 80% етанолу. Щурів поділили на групи по 18 тварин. Першій групі щоденно протягом 21 доби вводили вранці омепразол (400 мкмоль/кг), а ввечері – фамотидин (175 мкмоль/кг). Щурам другої групи зі штучною етаноловою виразкою вводили препарати за схемою першої групи. Тваринам третьої і четвертої (з етаноловою виразкою) груп, окрім вищезазначених препаратів, вранці вводили 0,1 мл антитиміоцитної сироватки (АТС) на 0; 6; 13 та 20 добу експерименту [Bailly, Bertrand, Dore, 1991]. Контролем слугували тварини, які не отримували жодних препаратів. Антитиміоцитну сироватку одержували за відомими рекомендаціями Р.В.Петрова. Титр АТС, який визначали за допомогою імуноферментного аналізу [Рохлин, 1991], коли-вався в межах 1:4096 – 1:2048. Перед використанням її розводили у 8 разів. Імунодепресію у тварин моделювали, використовуючи схему, запропоновану авторами [Bailly, Bertrand, Dore, 1991]. Після певних етапів досліду щурів декапітували на 7, 14 та 21 добу експерименту. Вплив поєднаної дії омепразолу і фамотидину на стан СОШ оцінювали за змінами значень рН та за якісними характеристиками білкових фракцій шлункового соку. Вимірювання рН шлункового соку виконували за методом Langhans [Langhans et al., 1997]. Шлунковий сік отримували після центрифугування шлункового вмісту впродовж 10 хв. при 3000 об/хв. Кислотність останнього визначали за титруванням рідкого компоненту 0,01 н NaOH і виражали в мікроеквівалентах Н⁺. Точку еквівалентності фіксували за допомогою рН-метра при нейтральній реакції середовища (рН=7,0) [Kiilerich et al., 1995]. Електрофорез шлункового соку проводили за методом Laemmly [Остерман, 1981]. Були застосовані такі білки-маркери: каталаза із крові бика з молекулярною масою 240 кДа; альдолаза із м'язів кроля – 160 кДа; альбумін із крові бика – 67 кДа; яєчний альбумін – 45 кДа; білок із еритроцитів бика – 30 кДа; хімотрипсин – 25 кДа; кінський міоглобін – 17,8 кДа; цитохром С – 12,3 кДа і апротинін із крові бика – 6,5 кДа. Вміст білка у пробі визначали за методом Бредфорда [Досон с соавт., 1991]. Дію омепразолу і фамотидину на окиснювальний статус органів травлення оцінювали за вмістом тіобарбітурат-реактивних продуктів у тканині печінки щурів [Куклей с соавт., 1995].

Результати досліджень обробляли статистично, використовуючи *t*-критерій Стьюдента.

Результати та обговорення

Із отриманих результатів, відображених на рисунку 1, видно, що через тиждень після введення тваринам омепразолу разом із фамотидином відбуваються зміни значен-

ня рН шлункового соку, щодо контролю. За нашими результатами шлунковий сік у контролі має рН $3,0 \pm 0,19$, що також узгоджується з даними літератури [Kiilerich et al., 1995]. Так, у тварин 1 і 2 груп підвищується рН шлункового соку відповідно на 100 і 66% щодо контролю при застосуванні медпрепаратів впродовж 14 діб. У 3 групі тварин на фоні імунодепресії значення рН соку залишаються без змін, а в 4 групі тварин з виразкою та зниженим імунітетом рН шлункового соку зростає на 50% у порівнянні з контрольним показником.

Слід зауважити, що через два тижні дії вищезгаданих чинників на організм тварин величина рН шлункового соку лише в 4 групі суттєво знижується (на 67%), тоді, як у щурів 1 і 2 груп залишається без змін, а в третій наближається до контрольної величини. При продовженні терміну навантаження препаратом щурів (21 доба) середні значення рН шлункового соку дорівнювали $5,0 \pm 0,9$ ($p < 0,05$) та $6,25 \pm 0,25$ ($p < 0,05$), відповідно, у тварин 1 і 3 груп. Останнє свідчить, що омепразол разом із фамотидином пригнічує секрецію соляної кислоти. Це знаходить підтвердження в роботі Roh et al [2004] про те, що у пацієнтів із виразкою й ерозіями шлунку вдвічі зростає значення рН шлункового соку при введенні 20 мг або 40 мг омепразолу.

Відомо, що при підвищеній секреції гастрину клітинами антрального відділу шлунку відбувається надмірна продукція соляної кислоти, значно знижується рівень рН шлункового соку і спостерігається зворотна дифузія іонів водню [Roh et al, 2004]. Це може спричинити запалення, ерозії слизової оболонки шлунку і згодом викликати утворення виразки. Проведені нами пробні морфологічні дослідження та виявлене зниження рН шлункового соку ($pH = 2$, $p < 0,05$) свідчать про вищезазначене, оскільки в 4 групі тварин, де застосовувалась анти-

тимоцитна сироватка, через три тижні використання препаратів спостерігалась виразка шлунку з гістіоцитарно-плазмоцитарною інфільтрацією. Були виявлені набряки, а в деяких клітинах залоз, котрі розташовані ближче до просвіту шлунку, помічено поодинокі клітини бокалоподібної форми, які властиві епітелію кишківника, що може бути провісником метаплазії за кишковим типом.

Електрофоретичне дослідження білкового складу шлункового соку у тварин із виразкою (2 група, 7 і 14 доби) дозволило виявити високо-молекулярну білкову фракцію (160 кДа) та білкові фракції з молекулярною масою 50-60 кДа. За даними літератури [Алиев, 1978] такі маси відповідають фракціям Z і M_4 . У нормі вміст високомолекулярних поліпептидних фракцій (Z) у шлунковому соку є в 4 рази меншим за кількість мукопротеоз (фракції $M_1 - M_4$). Через 21 добу на електрофореграмах фракції Z і M_4 виявлялись лише в слідових кількостях. Згідно з твердженням Геллера [1975], зниження кількості фракції M_4 або навіть відсутність її, розглядається як ознака заживлення виразки шлунку. У шлунковому соку тварин 4 групи на 14 і 21 доби було виявлено білкову фракцію з молекулярною масою 17,8 кДа та фракції з молекулярною масою 6-12 кДа, тоді як у шлунковому соку всіх груп тварин на початку введення препаратів низькомолекулярних білкових фракцій практично не спостерігалось.

Відомо, що в ураженому шлунку із за-

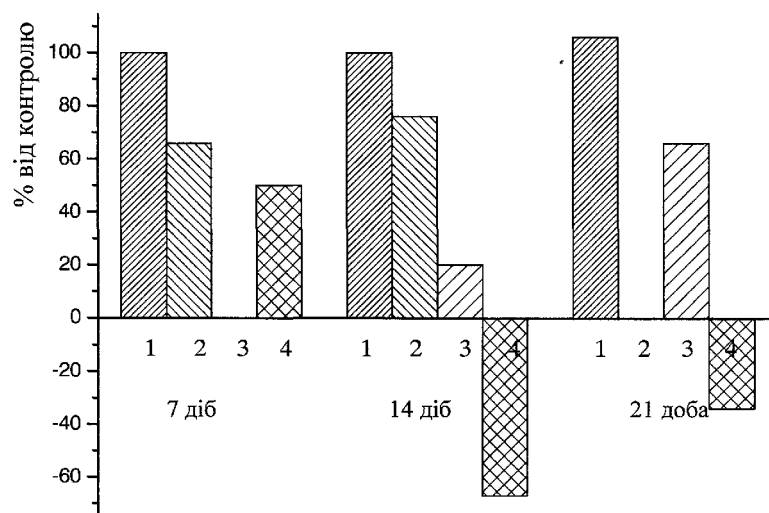


Рис. 1. Зміна значень рН шлункового соку щурів після введення препаратів (%), щодо контролю, (*- $p < 0,05$; 1-4 – групи тварин, пояснення у тексті).

паленням, набряками або виразкою спостерігається підвищення інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). Водночас при виразковому утворенні та імунодепресії спостерігаються зрушення біохімічних процесів, що позначається і на інших органах шлунково-кишкового тракту. Тому доцільно було паралельно відслідкувати зміни інтенсивності ПОЛ у тканині печінки. Введення омепразолу і фамотидину впродовж 21 доби супроводжувалося незначним підвищенням накопичення ПОЛ у печінці тварин 1 групи. Це можна пояснити токсичною дією даних препаратів на організм щурів. У таблиці 1 представлені дані порівняльної оцінки інтенсивності ПОЛ контрольних даних і таких, що отримані через три тижні експерименту.

Це пов'язано з тим, що використовувані препарати протягом 21 доби могли або загоїти виразку, або призвести до утворення нової. Із таблиці 1 видно, як кожний із чинників досліджуваної моделі впливає на інтенсивність ПОЛ. Відтак, можна констатувати, що у 4 групі тварин інтенсивність вільнорадикального окиснення ліпідів у печінці залишається високою і перевищує контрольні значення на 147 відсотків.

Висновки та перспективи подальших розробок

Результати проведених досліджень свідчать, що омепразол у поєднанні з фамотидином на фоні імунодепресії через три тижні викликають такі зміни у рівні рН шлункового соку й загальному складі білків клітин слизової оболонки шлунку, що, на нашу думку, можуть характеризувати процес розвитку гострої виразки шлунку із запальною, поліморфноклітинною інфільтрацією.

У перспективі, з урахуванням запропонованих нами відповідних моделей і подразників, доцільно провести морфологічні дослідження слизової оболонки шлунку після введення вищезазначених препаратів на фоні імунодепресії.

Таблиця 1

Інтенсивність ПОЛ (%) у тканині печінки щурів 1-4 груп на 21 добу експерименту ($M \pm m$, $n = 3$; * - $p < 0,05$ у порівнянні з контролем).

Контроль	1 група	2 група	3 група	4 група
100	172±10,4*	182±4,6*	176 ±11,7*	247±12,8*
	100	106±0,5*	107±1,4*	143±5,8*
		100	98±0,1	134±4,9
			100	140±3,1*

Приведені дані є лише першим кроком, який дозволить нам достовірніше підтвердити дії вищезазначених чинників на функціональний і патологічний/морфологічний стан білків клітин слизової оболонки шлунку і тканини печінки з урахуванням встановленого нами патологічного зрушення в ній антиоксидантно-прооксидантної рівноваги.

Література

1. Алиев А.И. Влияние селективной ваготомии на белковый и аминокислотный состав желудочного сока // Физиол. журнал СССР им. И.М.Сеченова. – 1978. - №6. – С.766-769 .
2. Антитела. 1. Методы / ред. О.В.Рохлина // М.:Мир, 1991. – С.156-159.
3. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. - М.: Наука, 1981. – 288 с.
4. Перекисное окисление липидов в мозге крыс при ишемии/ М.Л. Куклей, С.Л.Стволинский, В.Х.Шавратский, Ю.В. Шатрова // Нейрохимия. – 1995. – Т.12,№2. – С.28-35.
5. Справочник биохимика/ Р. Досон, Д. Эллиот, У.Эллиот, К. Джонс. – М.: Мир, 1991. – С.466-467.
6. Bailly M., Bertrand S., Dore J.F. Human tumor spontaneous metastasis in immunosuppressed newborn rats. 1. Characterization of the bioassay // Int. J. Cancer – 1991. – 49. – P.457-466.
7. Hewson E.G.,Yeomans N.D. Effect of weekend therapy with omeprazole on basal and stimulation acid secretion and fasting plasma gastrin in duodenal ulcer patients / Gut – 1988. – 29, №12. – P.1715-1720.

8. Huang JQ, Sridhar S, Hunt RH. Role of Helicobacter pylori infection and non-steroidal anti-inflammatory drugs in peptic ulcer disease: a meta-analysis. *Lancet*. 2002 Jan 5;359(9300):14-22.
9. Kiillerich S, Rannem T, Elsborg L. Effect of intravenous infusion of omeprazole and ranitidine on twenty-four-hour intragastric pH in patients with a history of duodenal ulcer // *Digestion*. – 1995. – 56, № 1. – P.25-30.
10. Langhans N. et al. Abnormal gastric histology and decreased acid production in cholecystokinin-B/gastrin receptor-deficient mice // *Gastroenterology*. – 1997. – 112. – P.280-286.
11. Liu Guo-Shi, Huang Yu-Xin et al. Experimental study on mechanism and protection of stress ulcer produced by explosive noise // *W. J. G.* – 1998. – 4, № 6. – P.519-523.
12. Renga M., Brandi G., Paganelli G.M. et al. Rectal cell proliferation and colon cancer risk in patients with hypergastrinemia // *Gut*. – 1997. – 41. – P.330-332.
13. Roh HK, Kim PS, Lee DH, Tybring G, Sagar M, Park CS, Seensalu R, Bertilsson L. Omeprazole treatment of Korean patients: effects on gastric pH and gastrin release in relation to CYP2C19 genotype and phenotypes // *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. – 2004. – 95(3). – P.112-9.
14. Taha A.S., McCloskey C., Prasad R., Bezlyak V. Famotidine for the prevention of peptic ulcers and oesophagitis in patients taking low-dose aspirin (FAMOUS): a phase III, randomised, double-blind, placebo-controlled trial // *Lancet*. – July 11. – 2009. – Vol.374. – P. 119 – 125.
15. Takaishi S, Cui G, Frederick DM, Carlson JE, et al. Synergistic inhibitory effects of gastrin and histamine receptor antagonists on Helicobacter-induced gastric cancer // *Gastroenterology*. – 2005. – 128, № 7. – P.1965-1983.
16. Warrington S, Baisley K, Boyce M, Tejura B, Morocutti A, Miller N. Effects of rabeprazole, 20 mg, or esomeprazole, 20 mg, on 24-h intragastric pH and serum gastrin in healthy subjects // *Aliment Pharmacol Ther*. – 2002. – 16, № 7. – P.1301-7.

17. Wolfe M.M., Sachs G. Acid suppression: optimizing for gastroduodenal ulcer healing, gastroesophageal reflux disease, and stress-related erosive syndrome // *Gastroenterology* – 2000. – 118. – S9-S31.

Резюме

**ОСОБЕННОСТИ СОЧЕТАННОГО
ДЕЙСТВИЯ ОМЕПРАЗОЛА И
ФАМОТИДИНА НА ФИЗИКО-
ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЖЕЛУДОЧНОГО
СОКА КРЫС ПРИ ИММУНОДЕПРЕССИИ**

*Евтушенко Н.В., Илика В.Г., Говоруха Т.М.,
Бабан В.М., Весельский С.П.*

Показано, что через 21 день сочетаемого действия омепразола с фамотидином увеличивается в два раза значение pH желудочного сока животных, а также отмечается изменение в составе белков последнего. Дополнительное воздействие антитимочитной сыворотки (иммунодепрессия) и этанола усугубляли эффект использованных препаратов, о чем свидетельствует дальнейшее поражение слизистой оболочки желудка и наличие низкомолекулярных белковых фракций в желудочном соке животных.

Ключевые слова: Helicobacter pylori, омепразол, фамотидин, ССК-2/гастриновый рецептор, гистаминовый рецептор.

Summary

**THE PECULIARITIES COMBINED ACTION OF
OMEPRAZOLE AND FAMOTIDINE ON THE
PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF
RAT GASTRIC JUICE AT THE
IMMUNODEPRESSION**

*Evtushenko N.V., Ilika V.G., Govorukha T.N.,
Baban V.N., Vesel'sky S.P.*

It has been shown that after 21 days, combined with action omeprazole and famotidine increases twice the value of pH gastric juice of animals, as well as indicates a change in the composition of proteins of the latter. Additional influence of antitymocyte serum (immunodepression) and ethanol was aggravated effect of the used preparations, to what the further defeat of gastric mucosa and presence of low-molecular protein fractions testifies in gastric juice.

Key words: SSK-2/gastrine receptors, H₂-histamine receptors, M₁-choline receptors, phamotydyne, omeprazole.