



УДК 616.33-002.44-085+615.276

© 2008

Л. І. Кот, О. В. Богданова, А. Д. Рахметов, Л. І. Остапченко

**Функціонування ферментів антиоксидантного захисту
в клітинах слизової оболонки шлунка за умов
виразкової патології при введенні омепразолу**

(Представлено членом-кореспондентом НАН України С. О. Костеріним)

Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase activities in stomach mucosa cells in rats are evaluated with an experimental stress model of ulcer development and healing during five days. These parameters are also investigated under omeprazole treatment. It is established that the mucosa regeneration process is accompanied by superoxide dismutase activation and inhibition of glutathione peroxidase activity. Omeprazole treatment induced a prompt increase of the superoxide dismutase activity and a decrease of the catalase and glutathione peroxidase activities. Under conditions of omeprazole injections of unstressed rats, the superoxide dismutase activity was not changed. The inhibition of the catalase and glutathione peroxidase activities after drug treatment is observed.

Виразкова хвороба шлунково-кишкового тракту є одним з найпоширеніших захворювань органів травлення. Відомо, що при патологічних змінах у тканинах шлунка відбувається нагромадження активних форм кисню (АФК) внаслідок пошкодження мітохондріальних структур і порушень використання кисню в ланцюгах тканинного дихання; активація процесів вільнорадикального окиснення ліпідів з нагромадженням продуктів ПОЛ, що супроводжується тканинною гіпоксією внаслідок зниження регіонарного кровотоку. Крім того, в умовах запальної реакції під час виразкоутворення відбувається активація макрофагів та нейтрофілів, які значною мірою здатні синтезувати АФК.

Надлишок активних метаболітів кисню в організмі знешкоджується за рахунок функціонування системи антиоксидантного захисту, яка представлена ферментативними і неферментативними компонентами. Найважливішу роль відіграють ферменти антиоксидантного захисту, такі як супероксиддисмутаза (СОД), каталаза та глутатіонпероксидаза (ГП).

У клінічних дослідженнях було встановлено пряму залежність між загоєнням виразкових дефектів і здатністю лікарських препаратів зменшувати кислотні властивості шлунка. Новим кроком у боротьбі з кислотозалежними захворюваннями стала група необоротних селективних інгібіторів H^+/K^+ -АТФази парієтальних клітин: омепразол, лансопразол тощо.

Ефект препаратів цієї групи перебуває у сфері інтенсивних наукових досліджень. Зокрема, вивченням біохімічних ефектів омепразолу доведено, що він може проявляти антиоксидантні властивості, зменшуючи кількість продуктів ПОЛ, ушкодження ДНК, частоту апоптозу [1].

Метою даної роботи було визначення активності ферментів антиоксидантної системи захисту — супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази в гомогенаті клітин слизової оболонки шлунка (СОШ) щурів у динаміці загоєння виразкових уражень в експериментальній стресовій моделі протягом 5 днів при введенні омепразолу.

Матеріали та методи досліджень. Досліди було проведено на самцях білих нелінійних щурів масою 200–250 г. Експериментальну виразку шлунка у групі піддослідних тварин викликали, згідно з методом [1], за допомогою холодового стресу. Розчин препарату омепразолу у фізіологічному розчині вводили внутрішньочеревно у дозі 0,8 мг/кг один раз на добу: відразу після стресового впливу та протягом 1–5 днів. Тварин декапітували через 40 хв (середній період напіввиведення омепразолу) після введення препарату. Після видалення слизову оболонку шлунка гомогенізували у середовищі 0,14 М NaCl.

Вимірювання супероксиддисмутазної активності здійснювали, згідно з методом [2], каталазної — за рекомендаціями [3], глутатіонпероксидазної — за нагромадженням окисненого глутатіону [4]. Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики із застосуванням стандартного пакету прикладних програм ЕОМ.

Результати та їх обговорення. СОД є ключовою ланкою антиоксидантного захисту організму, яка здійснює перший метаболічний етап знешкодження супероксидного аніон-радикала шляхом його дисмутації в пероксид водню. При дослідженні активності цього ферменту в гомогенаті клітин СОШ за умов обраної експериментальної моделі було показано, що її рівень істотно не відрізнявся від контрольного протягом 3 днів після впливу стресогенного чинника (табл. 1). Однак на 4 й 5 добу спостерігалось зростання СОД активності в 1,6 раза. Таке підвищення ферментативної активності відображає мобілізацію резервів фізіологічної антиоксидантної системи, яка направлена на знешкодження токсичної кількості супероксидного аніон-радикала в СОШ.

АФК індукують ураження слизової оболонки шлунка через каскади оксидативних реакцій, що призводять до ініціації апоптичних процесів у клітинах в умовах стресу, інфекції *H. Pylori* та дії нестероїдних протизапальних препаратів. Із літературних даних відомо [1], що противиразковий лікарський засіб омепразол, який пригнічує кислотну секрецію шлунка та сприяє швидкому загоєнню виразкових уражень, може проявляти антиоксидантні властивості і регулювати виникнення апоптозу в клітинах СОШ після виразкоутворення. Оскільки при ульцерогенезі відбувається нагромадження ендогенного пероксиду водню, що пов'язано із підвищенням супероксиддисмутазної активності [5], нами було досліджено активність цього ферменту за умов введення препарату омепразолу протягом 5 днів після впливу стресового фактора.

Було показано, що у тварин, яким вводили препарат через 40 хв після стресу, відбувалося зростання СОД активності в 2,9 раза порівняно з контрольними значеннями (див. табл. 1). На 1 добу після впливу стресового чинника значення ферментативної активності знижувались до рівня контролю, однак на 2 добу спостерігалось їх підвищення в 5,5 раза. Таке зростання СОД активності на 2 добу після стресу може пояснюватися тим, що омепразол через специфічний ядерний рецептор може індукувати експресію цитохромів P450 [6] та здійснювати гастропротекторний вплив, який більш виражений на ранніх стадіях загоєння виразкових дефектів. Слід зазначити, що протягом 3–5 днів введення омепра-

Таблиця 1. Активність ферментів антиоксидантного в клітинах слизової оболонки шлунка щурів при експериментальній виразці за умов введення омепразолу ($M \pm m$, $n = 6$)

Експериментальна група	Термін після стресового впливу					
	40 хв	1 доба	2 доби	3 доби	4 доби	5 діб
СОД, ум. од./($\text{мг} \cdot \text{хв}$)						
Контроль	$0,008 \pm 0,001$					
Омепразол	$0,007 \pm 0,001$	$0,010 \pm 0,001$	$0,007 \pm 0,001$	$0,007 \pm 0,001$	$0,007 \pm 0,001$	$0,011 \pm 0,002$
Виразка	$0,006 \pm 0,001$	$0,008 \pm 0,001$	$0,006 \pm 0,001$	$0,010 \pm 0,002$	$(0,013 \pm 0,001)^*$	$(0,013 \pm 0,001)^*$
Виразка+омепразол	$(0,023 \pm 0,003)^*$	$0,012 \pm 0,003$	$(0,044 \pm 0,006)^*$	$(0,021 \pm 0,003)^*$	$(0,017 \pm 0,002)^*$	$(0,018 \pm 0,002)^*$
Каталаза, мкмоль H_2O_2 /($\text{мг} \cdot \text{хв}$)						
Контроль	$0,098 \pm 0,011$					
Омепразол	$0,109 \pm 0,012$	$(0,045 \pm 0,004)^*$	$(0,058 \pm 0,005)^*$	$0,087 \pm 0,009$	$(0,059 \pm 0,005)^*$	$(0,037 \pm 0,003)^*$
Виразка	$(0,127 \pm 0,010)^*$	$(0,071 \pm 0,007)^*$	$(0,129 \pm 0,010)^*$	$0,113 \pm 0,013$	$0,085 \pm 0,009$	$0,082 \pm 0,008$
Виразка + омепразол	$(0,038 \pm 0,003)^*$	$(0,057 \pm 0,005)^*$	$(0,036 \pm 0,003)^*$	$(0,062 \pm 0,006)^*$	$(0,057 \pm 0,005)^*$	$(0,062 \pm 0,006)^*$
ГП, нмоль глутатіону окисненого/($\text{мг} \cdot \text{хв}$)						
Контроль	$7,018 \pm 0,840$					
Омепразол	$(11,417 \pm 1,601)^*$	$(2,832 \pm 0,310)^*$	$5,955 \pm 0,710$	$(1,492 \pm 0,131)^*$	$(2,118 \pm 0,210)^*$	$7,167 \pm 0,860$
Виразка	$(3,011 \pm 0,331)^*$	$9,533 \pm 1,450$	$7,330 \pm 0,882$	$6,940 \pm 0,830$	$6,405 \pm 0,771$	$(2,126 \pm 0,210)^*$
Виразка + омепразол	$(0,474 \pm 0,040)^*$	$(0,569 \pm 0,050)^*$	$6,442 \pm 0,770$	$(2,690 \pm 0,271)^*$	$(1,672 \pm 0,150)^*$	$(2,455 \pm 0,250)^*$

Примітка. Зірочка (*) – $p \leq 0,05$ відносно до контролю.

золу активність СОД зменшувалась порівняно з другою добою та при цьому залишалась підвищеною (2,6; 2,1; 2,3 раза відповідно) порівняно з контрольним рівнем.

У ході наших подальших досліджень було встановлено, що на тлі введення омепразолу за відсутності виразкових уражень шлунка, СОД активність істотно не змінювалась і перебувала на рівні контрольних значень протягом усього експериментального періоду. Ці дані співвідносилися з результатами досліджень [7], в яких було показано, що у щурів за відсутності виразки шлунка введення омепразолу протягом 3 днів не впливало на зміну рівня малонового діальдегіду як показника ПОЛ. Отже, за відсутності запальних процесів та надсинтезу АФК нейтрофілами за умов введення омепразолу не відбувається активація СОД.

Багато експериментальних досліджень присвячено питанню участі каталази у розвитку уражень СОШ [8]. Каталаза є гемоглобінвмісним ферментом, що переважно локалізований у пероксисомах або мікропероксисомах, каталізує розклад пероксиду водню на воду та молекулярний кисень і таким чином захищаючи клітину від оксидативних пошкоджень.

Визначення каталазної активності в клітинах СОШ дозволило встановити, що у тварин при стресовій виразці шлунка активність ферменту зростала через 40 хв після стресового впливу та на другу добу у 1,3 раза порівняно з контрольною групою (див. табл. 1). На першу добу спостерігалось зниження ферментативної активності в 1,4 раза. Слід зазначити, що в подальшому активність каталази не змінювалась і залишалася в межах контрольних величин.

Зростання каталазної активності може бути результатом фосфорилування цього ферменту нерецепторними тирозиновими протеїнкіназами c-Abl та Arg, які активуються за умов зумовленого ішемією оксидативного стресу [9].

Інактивація таких ферментів антиоксидантної системи, як каталаза та ГП, що відновлюють пероксид водню, призводить до підвищеної акумуляції внутрішньоклітинного H_2O_2 , який значно підвищує кислотоутворення [10]. Це може бути врегульовано завдяки дії омепразолу. Однак нами було показано, що у тварин за умов експериментальної виразки шлунка на фоні введення омепразолу в клітинах слизової оболонки спостерігалось значне пригнічення каталазної активності протягом усього терміну дослідження (див. табл. 1). Найбільше зниження ферментативної активності відбувалось через 40 хв після зняття стресогенного чинника та на 2 добу (в 2,6 раза порівняно з контрольними показниками). На 1 та 3–5 добах значення каталазної активності були в 1,7 раза нижчими за контрольні. Таке зниження каталазної активності може бути пов'язано з інактивацією її пероксидом водню, що надмірно виробляється СОД, активність якої підвищувалася у цей період за таких умов. Показано [11], що постійні малі концентрації H_2O_2 , які не впливають на пероксидацію ліпідів, сприяють різкому підвищенню рівня активності каталази. У наших дослідженнях на 3 добу введення препарату спостерігалась нормалізація активності каталази, можливо, в результаті дії незначних концентрацій пероксиду водню, утвореного цитохромом P450. На 4–5 добі спостерігалось поступове зниження каталазної активності, що може бути пов'язано із розвитком процесів виснаження клітин.

У клінічних та експериментальних дослідженнях показано, що виразкова хвороба шлунка супроводжується значними змінами в глутатіоновій системі [12]. ГП є однією з найчутливіших ланок регуляції антиоксидантного захисту в клітинах СОШ за умов патологічних станів. Цей селенвмісний фермент здійснює утилізацію H_2O_2 та інших гідропероксидів водню, окиснюючи відновлений глутатіон, таким чином захищає клітини від оксидативних пошкоджень.

Встановлено, що через 40 хв після впливу стресового фактора відбувалося зниження ГП активності в клітинах СОШ у 2,3 раза порівняно з контрольними значеннями (див. табл. 1). Таке інгібування ГП відбувається за умов багатьох патологій та свідчить про виснаження цієї ланки антирадикального захисту, нагромадження продуктів розпаду та токсинів. Це збігається з даними літератури про оксидативну інактивацію пероксидази клітин СОШ активними формами кисню під час стрес-індукованого ульцерогенезу [13]. Значне пригнічення ГП активності через 40 хв після стресового впливу також може бути спричинене відокремленням селену від залишків селеноцистеїну в активному центрі ферменту, який перерозподіляється в лімфоцитарні клітини [14]. Слід зазначити, що вже через добу після утворення виразкових дефектів значення ГП активності відновлювалися до контрольного рівня і залишались такими на 2–4 доби. На 5 добу спостерігалось зниження ферментативної активності в 3,3 раза. Інгібування активності ГП у більш віддалені терміни може бути пов'язано з надмірним використанням відновленого глутатіону без його достатнього відновлення із окисненого стану глутатіонредуктазою.

У клітинах СОШ тварин, яким вводили противиразковий препарат омепразол протягом 5 діб після холодного стресового впливу, нами було встановлено значне пригнічення функціонування ферменту, за виключенням 2 доби, де значення активності перебували на контрольному рівні (див. табл. 1). Найбільш значне зниження ферментативної активності, в 14,8 та 12,3 раза, спостерігалось через 40 хв після стресу та через 24 год, тоді як на 3–5 доби показники активності були в 2,6; 4,2 та 2,9 раза відповідно нижчими за контрольні.

Показано, що система глутатіону та омепразол перебувають в антагоністичних взаємозв'язках щодо регуляції активності H^+/K^+ -АТФази [15]. Так, додавання екзогенного відновленого глутатіону призводить до реставрації активності протонної помпи, заінгібованої введенням омепразолу. З огляду на це можна припустити наявність негативного впливу омепразолу на систему глутатіону. Цим можна пояснити більш виражену інактивацію ГП у клітинах СОШ тварин, яким вводили цей препарат. Інгібування ферментативної активності на початкових етапах дослідження може бути також пов'язано зі значним нагромадженням АФК, зокрема гідроксил-радикала, який сполучається щонайменше з двома залишками лізину у складі ГП, викликаючи її інактивацію [13]. Зростання активності ГП на 2 добу після стресу, можливо, є результатом індукції омепразолом синтезу компонентів антиоксидантної системи, цитохромів P450 та глутатіонтрансферази, що може приводити до підвищення детоксикуючої здатності клітинних систем.

Відзначимо, що відразу після введення омепразолу за відсутності морфологічних уражень СОШ спостерігалось зростання активності ГП у 1,6 раза (див. табл. 1), що може бути пов'язано з нормальною захисною відповіддю клітин на введення цього препарату за відсутності інших уражувальних чинників. Однак на 1, 3 та 4 доби введення противиразкового препарату значення ГП активності знижувалися порівняно з контролем у 2,5; 4,5 та 3,3 раза відповідно, що підтверджувало негативний вплив введення омепразолу на систему глутатіону в клітинах СОШ.

Таким чином, регенераційний процес СОШ супроводжувався значними змінами активності ферментів антиоксидантного захисту. Слід зазначити, що різні ланки цієї системи диференційно реагують на уражувальний чинник. Відразу після впливу стресового фактора активність СОД залишалась незмінною, відбувалось оксидативне пригнічення активності ГП та активація каталази. У процесі загоєння виразкових дефектів розвиток запальних процесів індукував активацію СОД та вторинне інгібування ГП. Введення противиразкового препарату ініціювало швидке зростання активності СОД, яке було більш вираженим на

початкових етапах регенерації слизової оболонки шлунка. У динаміці загоєння стрес-індукованих уражень шлунка введення препарату тваринам призводило до інгібування активності каталази та ГП. За відсутності впливу стресового фактора при введенні омепразолу активність СОД не змінювалася, проте спостерігався негативний вплив введення препарату на каталазну та ГП активність.

1. *Biswas K., Bandyopadhyay U., Chattopadhyay I., et al.* A Novel Antioxidant and Antiapoptotic Role of Omeprazole to Block Gastric Ulcer through Scavenging of Hydroxyl Radical // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**, No 13. – P. 10993–11001.
2. *Сирота Т. В.* Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы // *Вопр. мед. химии.* – 1999. – № 3. – С. 1–2.
3. *Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. И.* Метод определения активности каталазы // *Лаб. дело.* – 1988. – № 1. – С. 16–17.
4. *Власова С. Н., Шабунина Е. И., Перслегина И. А.* Активность глутатионзависимых ферментов при хронических заболеваниях печени у детей // *Там же.* – 1990. – № 8. – С. 19–20.
5. *Das D., Banerjee R. K.* Effect of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration // *Mol. and Cell. Biochem.* – 1993. – **125**, No 2. – P. 115–125.
6. *Bandyopadhyay D., Biswas K., Bhattacharyya M., et al.* Gastric Toxicity and Mucosal Ulceration Induced by Oxygenderived Reactive Species: Protection by Melatonin // *Curr. Mol. Med.* – 2001. – **1**. – P. 501–513.
7. *Burdan F., Burak B., S'k A.* Level of malondialdehyde after short-time omeprazole administration // *Med. Sci. Monit.* – 2001. – **7**, No 1. – P. 89–92.
8. *Ковальова В. А.* Вплив пероксидації ліпідів на стан мембран клітин слизової оболонки шлунка щурів за умов експериментальної виразки: Автореф. дис. . . . канд. біол. наук: 03.00.04 / Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка. – Київ, 2005. – 20 с.
9. *Cao C., Leng Y., Kufe D.* Catalase activity is regulated by cAbl and Arg in the oxidative stress response // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**. – P. 29667–29675.
10. *Bandyopadhyay U., Chatterjee R., Chakraborty T. K. et al.* Activation of parietal cell by mercaptomethylimidazole: a novel inducer of gastric acid secretion // *Biochem. Pharmacol.* – 1997. – **54**, No 2. – P. 241–248.
11. *Sen P., Chakraborty P. K., Raha S.* P38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) upregulates catalase levels in response to low dose H₂O₂ treatment through enhancement of mRNA stability // *FEBS Lett.* – 2005. – **579**, No 20. – P. 4402–4406.
12. *Kimura N., Miwa T.* Immunocytochemical and Biochemical Studies of Glutathione-Peroxidase (GPH-PO) in Rat Gastric Parietal Cells // *Acta Histochem. Cytochem.* – 2002. – **35**, No 1. – P. 23–31.
13. *Das D., Bandyopadhyay D., Banerjee R. K.* Oxidative inactivation of gastric peroxidase by site-specific generation of hydroxyl radical and its role in stress-induced gastric ulceration // *Free Radic. Biol. Med.* – 1998. – **24**, No 3. – P. 460–469.
14. *Фроликова М. В., Горчаков В. Н., Колмогоров Ю. П.* Динамика содержания селена в структурах “лимфатического региона” желудка при язвенном процессе и в условиях лимфотропной коррекции // *Микроэлементы в медицине: Материалы Первого съезда РОСМЭМ.* – 2005. – С. 148–151.
15. *Shin J. M., Sachs G.* Differences in binding properties of two proton pump inhibitors on the gastric H⁺, K⁺ – ATPase in vivo // *Biochem. Pharmacol.* – 2004. – **68**, No 11. – P. 2117–2127.

Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 30.01.2008