

УДК 577.125.8

ПЕРОКСИДНЕ ОКИСНЕННЯ БІЛКІВ ПЕЧІНКИ ЗА УМОВ ГІПОАЦИДНОГО СТАНУ

Берник О.О., Савчук О.М., Дворщенко К.О., Берегова Т.В., Остапченко Л.І.

Навчально-науковий центр «Інститут біології»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка
e-mail: ksenia_bernyk@list.ru

Надійшла до редакції 09.04.2010

Досліджено процеси пероксидації у клітинах печінки щурів за умов тривалої гіпохлоргідрії, викликаній введенням інгібітора протонної помпи омепразолу. Встановлено, що після 28 денної гіпоацидності шлункового соку змінюється кількісне співвідношення між фракціями протеїнів. Виявлено підвищення рівня пероксиду водню в клітинах печінки за умов введення омепразолу та значне накопичення продуктів окисної модифікації білків, що може бути наслідком активації віднорадикальних процесів у клітинах, які розглядають як неспецифічний механізм розвитку запалення. Також, показано статистично достовірне підвищення медіатора гострої фази запалення – С-реактивного білку.

Ключові слова: омепразол, гіпохлоргідрія, гепатоцити, окисна модифікація білків, С-реактивний білок.

ВСТУП

На сьогодні доведено, що тривале використання інгібіторів протонної помпи паріетальних клітин шлунка, зокрема омепразолу, призводить до гіпергастринемії та розвитку шлункової атрофії і метаплазії, що створює передумови для канцерогенезу [1].

Розглядаючи фармакологічні властивості омепразолу, потрібно зазначити, що омепразол швидко (протягом 4 год) розподіляється в слизовій оболонці шлунка, тканинах печінки і жовчного міхура. Через 48 год омепразол визначається тільки в слизовій оболонці шлунка. Близько 90-95% омепразолу зв'язується з білками плазми крові. Через гематоенцефалічний бар'єр проникає обмежена кількість омепразолу. Велика частина (77%) екскретується з сечею у вигляді метаболітів, з них ідентифіковані гідроксиомепразол і карбонова кислота. Інша частина омепразолу виводиться з калом, що припускає значну екскрецію метаболітів із жовчю. Три метаболіти омепразолу ідентифіковані в плазмі крові, які мають слабку антисекреторну активність або не володіють нею взагалі. Активним метаболітом є сульфоомепразол [2].

За умов шлункової гіпоацидності знижується виділення секретину та холецистокініну, які впливають на секрецію жовчі [3]. Таким чином, в гіпоацидних умовах можливий розвиток патологічних процесів, як у гепатоцитах, так і в позапечінковій біліарній системі, що, зокрема, може проявлятися в деструкції мембран гепатоцитів та розладі синтезу жовчних кислот та ліпідів, протеїнів. З іншого боку, розглядаючи пряму дію омепразолу на печінку, при порушеннях функцій органу біодоступність омепразолу збільшується майже до 100%, при цьому тривалість періоду напіввиведення збільшується до 3 год [2].

Іншим наслідком тривалої гіпохлоргідрії є розмноження патогенної мікрофлори в шлунково-кишковому тракті, яка за даними літератури, може підсилювати гіпоацидність [4].

Одним з важливих процесів для підтримки гомеостазу та корекції інтоксикаційних явищ в організмі є система пероксидного окиснення білків. Окиснення білкових молекул під дією активних форм кисню призводить до незворотного пошкодження мембранних структур, порушення їх проникності і загибелі клітин [5]. Проте літературні дані щодо інтенсивності процесів пероксидації білків у клітинах печінки за умов гіпохлоргідрії відсутні, тому метою роботи було проаналізувати структурний розподіл поліпептидів та рівень окиснених білків гепатоцитів щурів за умов тривалого пригнічення кислотної секреції шлунка омепразолом.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Досліди проводили на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 160-200 г. Контрольну групу склали щури, які протягом 28 днів внутрішньоочеревино (в/о) отримували 0,2 мл води для ін'єкцій. Другу групу склали щури, які протягом 28 днів отримували в/о «Омез®» виробництва Dr. Reddy's Laboratories (Індія), діючою речовиною якого є омепразол. «Омез» вводили протягом 28 днів в дозі 14 мг/кг один раз на добу, розчиняючи в 0,2 мл води для ін'єкцій.

Морфологічно та функціонально інтактні клітини печінки було отримано згідно модифікованого неферментативно методу виділення гепатоцитарної фракції клітин печінки за Петренко А.Ю. зі співав.

Аналіз складу поліпептидів клітин печінки здійснювали з використанням методу

електрофоретичного розділення в поліакриламідному гелі (ПААГ). Електрофорез проводили за методом Laemmli в градієнті ПААГ з додецилсульфатом натрію (ДДС-Na) [6].

Кількісний вміст перекису водню в гепатоцитах визначали за активністю каталази [7]. Вміст С-реактивного білка турбідиметричним методом.

Для визначення окислювальної модифікації білків гепатоцитів щурів використовували метод Е.Е.Дубініної, С.О. Бурмістрова, Д.А.Ходова, І.Г. Поротова [8]. Оптичну густину утворених динітрофенілгідразинів реєстрували при довжинах хвиль: 346 і 370 нм (альдегідні і кетони продукти окисної модифікації нейтрального характеру), а також при 430 нм і 530 нм (альдегідні і кетони продукти окисної модифікації основного характеру). Ступінь окисної модифікації білків виражали в одиницях оптичної щільності, віднесених на 1 мг білка.

Статистичну обробку результатів проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали за t-критерієм Ст'юдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В результаті диск-електрофорезу в ПААГ білки печінки розділились на 7 фракцій. Виявлено кількісні зміни у співвідношенні білкових фракцій в досліджуваних групах тварин.

Таблиця 1.

Фракційний склад протеїнів клітин печінки

Молекулярна маса протеїнів, кДа \ Стан	Контроль	Омепразол
ММ 279, %	39,90±4,39	57,63±6,34*
ММ 156, %	4,17±0,46	7,06±0,78*
ММ 118, %	3,33±0,37	4,55±0,5*
ММ 95, %	11,36±1,25	5,64±0,62*
ММ 76, %	12,00±1,32	5,72±0,63*
ММ 41, %	26,58±2,92	16,73±1,84*
ММ 29, %	2,66±0,29	2,67±0,29

* - P<0,05 у порівнянні з контролем.

За умов 28 денного введення омепразолу спостерігається достовірне збільшення всіх фракцій високомолекулярних поліпептидів, які представлені імугоглобулінами, компонентами комплексу, С-реактивним білком (СРБ), ліпопротеїнами та ін. Фракції глобулінів з ММ = 279 кДа підвищувалась в 2,6 рази, ММ = 154 кДа – в 3 рази, ММ = 117 кДа в 2,5 рази. Збільшення кількості цих білків у печінці може свідчити про розвиток локального запалення (табл. 1).

Відомо, що підвищення рівня С-реактивного протеїну у крові, який належить до білків гострої фази запалення, може відбуватися у відповідь на розвиток локальних процесів запалення спричинених бактеріаль-

ними інфекціями, сепсисом, некрозом тканин та хронічними запальними процесами [9]. СРБ стимулює імунні реакції, фагоцитоз та активує класичну систему комплементу.

Відтак за умов омепразол індукованої гіпохлоргідрії шлунку нами було визначено вміст С-реактивного протеїну у клітинах печінки. Зафіксоване підвищення цього глобуліну у 3,7 рази порівняно з контрольними показниками може спостерігатися внаслідок активації його синтезу у печінці (табл. 2).

Таблиця 2.

Вміст С-реактивного білка та пероксиду водню у клітинах печінки

Досліджувані параметри \ Стан	С-реактивний білок, мкг/мл	H ₂ O ₂ , нмоль/мг білка
Контроль	4,12±0,29	16,22±1,46
Омепразол	30,11±2,08	46,28±4,17*

* - P<0,05 у порівнянні з контролем.

Аналіз білкових фракцій середньої молекулярної маси та низькомолекулярних пептидів показує їх статистично достовірне зниження у діапазоні молекулярних мас від 95 до 41 кДа. Ми припустили, що такі кількісні зміни можуть бути наслідком посилення вільнорадикальних процесів при розвитку шлункової гіпохлоргідрії (табл. 1).

Перевантаження дихального ланцюга мітохондрій при активному гліколізі призводить до того, що молекула кисню здатна приєднувати один електрон, утворюючи супероксиданіон-радикал •O²⁻. За цих умов супероксиданіон-радикал зазнає перетворення, що призводять до утворення інших високореакційних радикалів, які можуть безпосередньо ушкоджувати клітинні структури [10]. При адаптації організму до стресових ситуацій для швидкого отримання АТФ мають місце більш короткі шляхи тканинного дихання: відщеплені в процесі окислення в циклі Кребса атоми водню переносяться на флавінові ферменти електронно-транспортного ланцюга мітохондрій, минаючи систему нікотинамідних ферментів. При цьому утворюється лише дві молекули АТФ замість трьох. Коротшим шляхом швидкого отримання АТФ є перенесення атомів водню з окиснених субстратів за допомогою флавінових ферментів безпосередньо на молекулярний кисень, минаючи систему цитохромів. Кінцевим продуктом окиснення в цих випадках буде не вода, а пероксид водню [11], як нами показано, концентрація якого була підвищеною у 2,88 разів у клітинах печінки за умов шлункової гіпохлоргідрії (табл. 2).

Зростання швидкості утворення вільних радикалів порушує роботу антиоксидантних систем, а отже, веде до накопичення активних форм кисню, надлишкова продукція яких має токсичну дію і призводить до окиснювального пошкодження тканин та органів.

Так надмірне посилення окисдаєтвних реакцій може призводити до порушення архітектоніки мембран, а отже і до змін у функціонуванні клітин внаслідок окисних модифікацій ліпідів, нуклеїнових кислот та білків.

Для оцінки окисного ушкодження різних компонентів клітини доцільно визначити ступінь окиснення білків молекул.

Результати проведених досліджень свідчать, про те, що вплив тривалої гіпохлоргідрії призводить до збільшення рівня окисно-модифікованих білків: вміст альдегід-дінитрофенілгідразонів і кетон-дінитрофенілгідразонів як нейтрального, так і основного характеру в гепатоцитах дослідних груп

лабораторних щурів був статистично достовірно вищим у порівнянні з контролем.

Так, рівень нейтральних альдегідних (макс. абсорбції при 346 нм) і нейтральних кетонних (E max = 370 нм) продуктів в гепатоцитах збільшилася в 1,71 і в 2,13 раз порівняно з контролем. За тих же умов експерименту кількість основних альдегідних (максимум поглинання при 430 нм) і кетонних (E max = 530 нм) продуктів перевищувала ці показники у контрольних тварин у збільшено – в 2,15 раз та у 1,86 разів відповідно (табл. 3).

Таблиця 3.

Вміст продуктів окисної модифікації білків у гепатоцитах щурів

Досліджувальний параметр Стан	Продукти нейтрального характеру, ум.од./мг білка		Продукти основного характеру, ум.од./мг білка	
	356 нм	370 нм	430 нм	530 нм
Контроль	0,96±0,09	1,47±0,13	1,34±0,12	1,36±0,11
Омепразол	1,65±0,15*	3,13±0,28*	2,88±0,22*	2,54±0,19*

* - P<0,05 у порівнянні з контролем.

Збільшення рівня продуктів окисної модифікації білків в гепатоцитах щурів при довготривалій зниженій кислотності вказує на активацію вільнорадикальних процесів і розвиток окислювального стресу. Це можна пояснити тим, що при хронічному лікуванні омепразолом протонна помпа парієтальних клітин шлунка стабільно гальмується, що призводить до хіпохлоргідрії. Зміна кислотності шлунку (лужне рН) призводить до зниження бактерицидних функцій шлункового соку. Таким чином, можлива колонізація у шлунково-кишковому тракті умовно-патогенної мікрофлори, що є стабільним ендемічним джерелом інфекції. У зв'язку з розвитком патогенної та умовно-патогенної мікрофлори, може підсилюватись запалення викликане іншими екзо- чи ендемічними чинниками у шлунково-кишкового тракту і пов'язаних з ними органах, зокрема у печінці.

ВИСНОВКИ

За умов тривалої шлункової гіпохлоргідрії відбувається підвищення рівня високомолекулярних білків у печінці, що може вказувати на розвиток запалення, яке супроводжується розвитком окислювального стресу у гепатоцитах, результатом якого є накопичення продуктів пероксидно окиснених білків.

Продукти окисної модифікації протеїнів не в змозі виконувати звичайні функції відповідних білків. Більше того, у великих кількостях вони можуть бути небезпечними для клітин. Таким чином, з результатів нашого експерименту випливає, що використання інгібіторів протонної помпи, зокрема омепразолу, у лікуванні хворих повинні бути дуже обережними, особливо у випадку молодих пацієнтів та дітей.

Література

1. *Jensen R.* Consequences of long-term proton-pump blockade: insights from studies of patients with gastrinomas // *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology.* – 2006. – Vol.98, №1. – P.4-19.
2. *Clissold S.P., Campoli-Richards D.M.* Omeprazol. A Preliminary Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Potential in Peptic Ulcer Disease and Zollinger-Ellison Syndrome // *Drugs.* –1986.– Vol. 32.–P 15-47.
3. *Burkitt M., Varro A., Pritchard D.* Importance of gastrin in the pathogenesis and treatment of gastric tumors // *World Journal of Gastroenterology.* – 2009. – Vol.15, №1. – P. 1-16.
4. *Цирюк О.І., Берегова Т.В.* Вплив мультипробіотика "Симбітер ацидофільний" концентрований на стан мікроекології шлунка у щурів // *Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології.* - 2007. – Вип. 3-4. - С. 62-70.
5. *Койков В.В.* Состояние окислительной модификации белков и нуклеиновых кислот при злокачественных новообразованиях (на примере рака легкого): Автореф. дис. канд. мед. наук - Алматы, 2000. - 23 с.
6. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // *Nature.* – 1970. – P. 680-685.
7. *Лапкин В.З., Тихадзе А.К., Беленков Ю.Н.* Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях.– М., 2001. – 78 с.
8. *Дубинина Е., Бурмистров С., Ходов Д., Поротов И.* Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // *Вопросы медицинской химии.* - 1995. - Т. 41, №1. - С.24-26.
9. *Guven A, Cetinkaya A, Aral M, et al.* N. High-sensitivity C-reactive protein in patients with metabolic syndrome // *Angiology.* – 2006. – Vol. 57, N 3. – P 295-302.
10. *Болдарев А., Куклей М.* Свободные радикалы в нормальном и ишемическом мозге // *Нейрохимия.* – 1996. – №13. – С. 271 – 278.
11. *Владимиров Ю. А.* Свободные радикалы в клетке // *Природа.* – 1997. – №4. – С. 47 – 54.

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ БЕЛКОВ ПЕЧЕНИ В УСЛОВИЯХ ГИПОАЦИДНОГО СОСТОЯНИЯ**Берник О.О., Савчук О.М., Дворщенко К.О., Берегова Т.В., Остапченко Л.И.**

Исследованы процессы пероксидации в клетках печени крыс в условиях длительной гипохлоридрии вызванной введением ингибитора протонной помпы омепразола. Установлено, что после 28 дневной гипоацидности желудочного сока изменяется количественное соотношение между фракциями протеинов. Выявлено повышение уровня пероксида водорода в клетках печени в условиях введения омепразола и значительное накопление продуктов окислительной модификации белков, что может быть следствием активации свободнорадикальных процессов в клетках, которые рассматривают как неспецифический механизм развития воспаления. Следовательно, показано статистически достоверное повышение медиатора острой фазы воспаления - С-реактивного белка.

Ключевые слова: омепразол, гипохлоридрия, гепатоциты, окислительная модификация белков, С-реактивный белок

PEROXIDATION OF LIVER PROTEIN UPON HYPOACIDITY**Bernyk O.O., Savchuk O.M., Dvorshchenko K.O., Bereгова T.V., Ostapchenko L.I.**

The processes of peroxidation in liver cells of rats upon long-term hypoacidity caused by the introduction of proton pump inhibitor omeprazole. Found that after 28 day hypoacidity gastric juice changes the proportion between the factions proteins. We detected increase of hydrogen peroxide in liver cells under conditions of administration of omeprazole and a significant accumulation of products of oxidative modification of proteins that may be due to activation free-radical processes in cells, which are regarded as non-specific mechanism of inflammation. Therefore, it is shown statistically significant increase in acute phase mediator of inflammation - C-reactive protein.

Key words: omeprazole, hypoacidity, hepatocytes, oxidative modification of proteins, C-reactive protein.
