



УДК 577.152.25

ВПЛИВ ПОХІДНИХ ХІНОЛІНУ ТА ТРІАЗОЛОПРИМІДИНУ НА АКТИВНІСТЬ H^+ , K^+ -АТФази ПАРІСТАЛЬНИХ КЛІТИН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА¹Строцька Є.А., ¹Раецька Я.Б., ¹Остапченко Л.І., ²Грищенко А.А.¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
біологічний факультет, Київ, Україна²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна
e-mail: strotska@ukr.net

Надійшла до редакції 20.03.2010

Стаття присвячена скринінгу хімічних сполук з класу похідних хіноліну та тріазолопіримідину та вивчення їхнього впливу на активність H^+ , K^+ -АТФази плазматичних мембран парієтальних клітин слизової оболонки шлунка шурів. Встановлено інгібіторний ефект на активність ферменту для двох сполук: етиланілін-8-метоксі-3-хінолінкарбоксилат (171788) та 3-пропіл-8,9,10,11-тетрагідро[4,5]тієно[3,2e][1,2,4]тріазоло[4,3c]піримідин (208604).

Ключові слова: H^+ , K^+ -АТФаза, парієтальні клітини, похідні хіноліну та тріазолопіримідину.

ВСТУП

Останнім часом серед населення багатьох країн, в тому числі України, спостерігається прогресуюче поширення патологій органів травлення, зокрема хвороб шлунково-кишкового тракту. Однією з найпоширеніших патологій органів травлення є виразкова хвороба шлунка (ВХШ). За даними статистики ВХШ в Україні поширена у 10% дорослого населення [1]. Небезпека захворювання, насамперед пов'язана з виникненням рецидивів 1-2 рази на рік, які є причиною розвитку ускладнень (масивні гастродуоденальні кровотечі, пенетрація та перфорація виразки, малігнізація тощо) та хірургічних втручань [2].

В комплексній терапії виразки шлунка ефективним підходом є застосування блокаторів протонного насосу – похідних бензімідазолу (омепразол, лансопразол, рабепразол, пантопразол тощо), дія яких направлена на інгібування ключового ферменту синтезу соляної кислоти парієтальними клітинами слизової оболонки шлунка – H^+ , K^+ -АТФази. Зв'язуючись з SH-групами ферменту шляхом необоротного блокування та формуючи дисульфідний зв'язок похідні бензімідазолів пригнічують активність H^+ , K^+ -АТФази за рахунок інгібування стадії калій-залежного дефосфорилування ферменту [3]. Значним недоліком похідних бензімідазолів є їхній вплив на рівень сироваткового гастрину в крові з подальшим розвитком гіперплазії ECL-клітин, що призводить до виникнення карциноідного синдрому шлунка [4]. Отже, пошук ефекторів, селективних інгібіторів, які

були здатні спрямовано впливати на активність досліджуваного ферменту є важливим, як з фундаментальної, так і з практичної точки зору.

У останні роки велика кількість робіт направлена на дослідження інгібіторних властивостей сполук, які відносяться до групи K^+ -конкурентних інгібіторів H^+ , K^+ -АТФази [5, 6]. Серед таких інгібіторів найбільш широко вивчаються похідні хіноліну і тріазолопіримідину. На основі даної групи сполук ведуться спроби синтезувати новий клас інгібіторів протонної помпи для лікування виразкової патології. Дана група інгібіторів має переваги над похідними бензімідазолів. По-перше, сполуки цієї групи здатні впливати на фермент швидше та період їх інгібіторної дії є малим, в порівнянні з похідними бензімідазолів. Така властивість має велике значення при пригніченні секреції соляної кислоти в залежності від фаз та стадій виразкового захворювання у шлунку. По-друге, зв'язуючись з певними сайтами молекули ферменту вони не здатні порушувати нативну конформацію ензиму, таким чином необхідність відновлення структури до синтезу молекули H^+ , K^+ -АТФази *de novo* відсутня. В-третьє, сполукам з групи конкурентних інгібіторів H^+ , K^+ -АТФази властива інша фармакінетика.

Метою роботи було проведення скринінгу потенційних інгібіторів активності H^+ , K^+ -АТФази плазматичних мембран парієтальних клітин шлунка шурів та вивчення їхнього впливу на функціонування ферменту.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Досліди проводили на нелінійних білих щурах-самцях масою 220 – 250 г (n=21). Тварин піддавали декапітації.

Парієтальні клітини виділяли із загальної фракції клітин слизової оболонки шлунка та підраховували за методикою [7]. Отримання фракції плазматичних мембран проводили за рекомендаціями [8] центрифугуванням на 30% сахарозному градієнті (густина 1,127).

Потенційні інгібітори H^+, K^+ -АТФази: етил-4-бензиламіно-8-метил-3-хінолінкарбоксилат (171723), етил-4-(2-етиланілін)-8-метокси-3-хінолінкарбоксилат (171788), етил-4-(2-толуїдин)-3-хінолінкарбоксилат (2130) та 3-пропіл-8,9,10,11-тетрагідро[4,5]гієно[3,2-е][1,2,4]тріазоло[4,3-с]піримідин (208604) застосовували в концентрації 50 мМ. Досліджувані сполуки були синтезовані у відділі комбінаторної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Активність H^+, K^+ -АТФази визначали методом [9] і розраховували за кількістю неорганічного фосфату (в нмоль Φ_n за хв на мг білка) [8].

Експериментальні дані оброблялись статистично з використанням *t*-критерію Ст'юдента. Статистичний аналіз одержаних даних здійснювали в режимі програмного забезпечення *Excel – 2000*.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нами було проведено скринінг сполук, які володіли інгібіторними властивостями по відношенню до досліджуваного ферменту. Вибір потенційних інгібіторів проводилось за методиками SAR (Structure Activity Relationship). Принцип методу полягає в тому, що структура сполук з відомою біологічною активністю порівнюється між собою, після чого визначаються функціонально важливі групи і будується загальна абстрактна модель інгібітору. Абстрактна модель порівнюється з сполуками з невідомою активністю і на основі цього порівняння з первинного набору сполук для біологічного тестування обираються найбільш потенційно активні інгібітори.

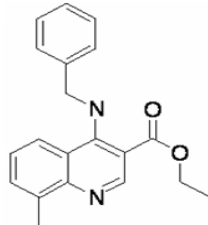
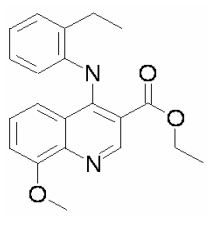
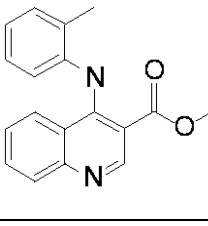
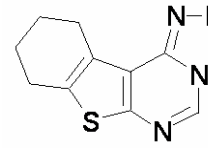
Відбір інгібіторів проводився по принципу найбільшої структурної схожості з відомими оборотними інгібіторами H^+, K^+ -АТФази серед основних структурних класів хімічних сполук – хінолінів, поліфенолів та похідних тріазолопіримідину.

В результаті проведеного скринінгу, як потенціальні інгібітори, були вибрані наступні сполуки, хімічні назви і формули, яких наведені у табл. 1.

Три сполуки, які було відібрано для подальшого дослідження відносяться до класу хінолінів, одна до класу тріазолопіримідинів. Обрані сполуки були перевірені на токсичність за правилами Ліпінського і Крамера. Потенційні інгібітори H^+, K^+ -АТФази обох класів є оборотними і конкурентними по відношенню

до іонів K^+ , а їх зв'язування з ферментом взаємовиключаюче, що дозволяє припустити, що сайти зв'язування в них частково перекриваються.

Таблиця 1.
Хімічні назви та формули сполук, потенційних інгібіторів H^+, K^+ -АТФази

Сполука	Хімічна назва інгібітору	Формула
171723	Етил-4-бензиламіно-8-метил-3-хінолінкарбоксилат	
171788	Етил-4-(2-етиланілін)-8-метокси-3-хінолінкарбоксилат	
2130	Етил-4-(2-толуїдин)-3-хінолінкарбоксилат	
208604	3-пропіл-8,9,10,11-тетрагідро[4,5]гієно[3,2-е][1,2,4]тріазоло[4,3-с]піримідин	

Для перевірки наявності інгібіторного впливу цих сполук на K^+ -залежну АТФ-азну активність фракції апікальних плазматичних мембран парієтальних клітин шлунка щурів, їх застосовували в концентрації 50 мМ. Дана концентрація вища за IC_{50} більшості відомих інгібіторів H^+, K^+ -АТФази, тому дозволяє з високою ступінню вірогідності робити висновки про інгібіторні властивості даних сполук та служить відправною точкою для визначення IC_{50} . Вибір кверцетину у якості контролю в наших експериментах, можна пояснити тим, що згідно з сучасними роботами [10, 11], для перевірки системи тестування потенційних інгібіторів у дослідженнях використовують найбільш відомі сполуки, які володіють інгібіторними властивостями на даний ензим та на фоні впливу ними на активність ферменту оцінюють інгібіторні властивості нових сполук.

Отримані нами дані інгібіторного впливу сполук на активність H^+,K^+ -АТФази можна пояснити існуванням різних реакційно-здатних функціональних груп, за якими дані сполуки відрізняються між собою, що може свідчити про наявність цих функціональних груп в молекулі активного центру досліджуваного ферменту.

Неповне пригнічення активності H^+,K^+ -АТФази, яке нами було помічено при дослідженні впливу хімічних сполук, що відносилися до класу хінолінів: 171723 та 42130, можна пояснити, спираючись на механізм дії даних сполук, по аналогії з відомими інгібіторами [12], який проявляється у K^+ -конкурентному інгібуванню білкової молекули. Це нам дає можливість припустити, що дані сполуки при досліджуваній концентрації проявляли низьку спорідненість до ферменту в катіонзв'язуючому центрі.

У результаті наших експериментів було встановлено інгібіторний ефект на активність ферменту двох сполук: 171788, що відноситься до класу хінолінів та 208604 – з класу похідних піримідину, рис. 1. Для решти сполук при досліджуваній концентрації спостерігалось зниження активності H^+,K^+ -АТФази за відсутності його пригнічення.

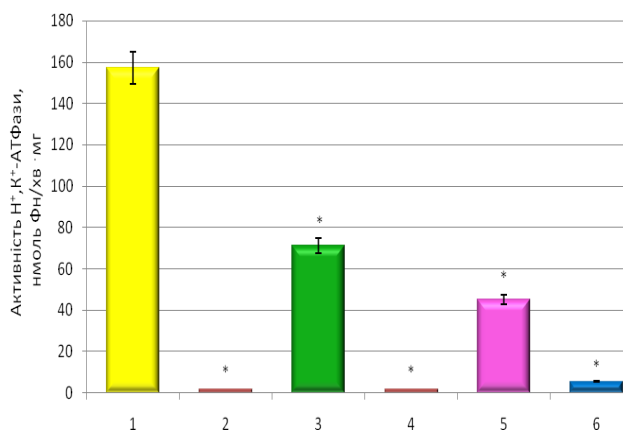


Рис. 1. Вплив сполук з інгібіторними властивостями на активність H^+,K^+ -АТФази паріетальних клітин шлунку щурів; ($M \pm m$, $n=7$): 1 – контроль, 2 – кверцетин, 3 – 171723, 4 – 171788, 5 – 42130, 6 – 208604

Отримані нами дані інгібіторного впливу сполук на активність H^+,K^+ -АТФази можна пояснити існуванням різних реакційно-здатних функціональних груп, за якими дані сполуки відрізняються між собою, що може свідчити про наявність цих функціональних груп в молекулі активного центру досліджуваного ферменту.

Неповне пригнічення активності H^+,K^+ -АТФази, яке нами було помічено при дослідженні впливу хімічних сполук, що відносилися до класу хінолінів: 171723 та 42130, можна пояснити, спираючись на механізм дії даних сполук, по аналогії з відомими інгібіторами

[12], який проявляється у K^+ -конкурентному інгібуванню білкової молекули. Це нам дає можливість припустити, що дані сполуки при досліджуваній концентрації проявляли низьку спорідненість до ферменту в катіонзв'язуючому центрі.

ВИСНОВКИ

Таким чином, отримані нами результати скринінгу сполук з класу хінолінів та похідних тріазолопіримідину та вивчення їхнього впливу на активність ферменту можуть стати основою для розробки нових фармакологічних препаратів у якості ефективних інгібіторів H^+,K^+ -АТФази.

Література

1. Голубчиков М.В. Статистичний огляд захворювання населення України на хвороби печінки та жовчовивідних шляхів. // Сучасна гастроентерологія і гематологія – 2000 - № 2. – С. 53–55.
2. Циммерман Я.С. Хронический гастрит и язвенная болезнь // Пермь – ПГМА.–2000. – 256 с.
3. Ивашкин В.Т. Чего мы достигаем, назначая ингибиторы протонной помпы, и следует ли нам опасаться широкого применения данных препаратов в клинической практике // РЖГК. – 2002. – № 6. – С. 4-10.
4. Hirschowitz B.I. Clinical aspects of ECL-cell abnormalities // J.Biol.Med. – 1998. – №3-4. – P. 303 – 310.
5. Perlin D.S. Ion pumps as targets for therapeutic intervention: old and new paradigms // Electronic Journal of Biotechnology – 1998. – №2 – P. 1-10.
6. Shin J.M. Chemistry of covalent inhibition of the gastric (H^+,K^+)-ATPase by proton pump inhibitors / Shin J.M., Cho Y.M., Sachs G. // J. Am. Chem. Soc. -2004 -№ 126 – P. 7800-7811.
7. Таиров М.М. Клеточная локализация аденилатциклаз, стимулируемых гистамином в слизистой оболочке желудка крыс и их роль в регуляции желудочной секреции / Таиров М.М., Берсимбаев Р.И., Аргутинская С.В., Салганик Р.И. // Биохимия. – 1983. – № 6. – С. 1035 – 1041.
8. Рыбальченко В.К. Структура и функции мембран: практ. / Рыбальченко В.К., Коганов Н.М. – Київ: – 1988. – С. 312.
9. Asano S. Functional expression of gastric H^+,K^+ -ATPase and site-directed mutagenesis of the putative cation binding site and the catalytic center / Asano S., Tega Y., Konishi K., Fujioka M., Takeguchi N. // J.B.C. – 1996. – № 5. – P. 2740 – 2745.
10. Murakami S. Inhibition of gastric H^+/K^+ -ATPase by quercetin / Murakami S., Murakami M., Otomo S. // J.Enzyme. Inhib. – 1992. – № 4 – P. 293 – 298.
11. Inhibition of gastric H^+,K^+ -ATPase activity by flavonoids, coumarins and xanthenes isolated from Mexican medicinal plants / Reyes-Chilpa R., Baggio C.H., Alavez-Solano D. [et al.] // J. Ethnopharmacology – 2006 –Vol. 105 -№ 21 – P. 167-172.
12. Watts J.A. A Model of Reversible Inhibitors in the Gastric H^+/K^+ -ATPase Binding Site Determined by Rotational Echo Double Resonance NMR / Watts J. A., Watts A., Middleton D. A. // J. B. C. – 2001. – №46. – P. 43197 – 43204.

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ХИНОЛИНА И ТРИАЗОЛОПИРИМИДИНА НА АКТИВНОСТЬ H^+,K^+ -АТФазы ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ПАРИЕТАЛЬНЫХ КЛЕТОК СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА**Строцькая Е.А., Раецкая Я.Б., Остапченко Л.И., Грищенко А.А.**

Статья посвящена скринингу химических соединений: производных хинолина и триазолопиримидина, и изучению их влияния на активность H^+,K^+ -АТФазы плазматических мембран париетальных клеток желудка крыс. Установлен ингибиторный эффект на активность фермента плазматических мембран париетальных клеток для двух соединений: этил-4-(2-этиланилин)-8-метокси-3-хиолинкарбоксилат (171788) и 3-пропил-8,9,10,11-тетрагидро[4,5]тиено[3,2-е][1,2,4]триазоло[4,3-с]пиримидин (208604).

Ключевые слова: H^+,K^+ -АТФаза, париетальные клетки, производные хинолина и триазолопиримидина.

CHEMICAL SUBSTANCES INFLUENCE (QUINOLINE- AND TRIAZOLOPYRIMIDINE-DERIVATES) ON THE H^+,K^+ -ATPase ACTIVITY FROM MUCOUS COAT OF STOMACH PARIETAL CELLS PLASMA MEMBRANE**Strotska E.A., Raetska Ya.B., Ostapchenko L.I., Grishenko A.A.**

It was studied screening compounds (quinoline- and triazolopyrimidine-derivatives) on H^+,K^+ -ATPase activity of rats parietal cells plasma membrane. Inhibitory effect for two compounds: ethyl-4-(2-ethylaniline)-8-methoxy-quinolinecarboxylic (171788) and 3-propyl-8,9,10,11-tetrahydro[4,5]thieno[3,2-e][1,2,4]triazolo[4,3-c]pyrimidine (208604), was established.

Key words: H^+,K^+ -ATPase, parietal cells, quinoline- and triazolopyrimidine-derivatives.
