

ВПЛИВ ОМЕПРАЗОЛУ ТА ЛАНСОПРАЗОЛУ НА Na^+ , K^+ -АТР-азну ТА Mg^{2+} -АТР-азну АКТИВНІСТЬ У ПЛАЗМАТИЧНІЙ МЕМБРАНІ ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН МІОМЕТРІЯ

Т. О. ВЕКЛІЧ¹, О. А. ШКРАБАК¹, В. В. МЕДВЕДЕВ², М. Д. КУРСЬКИЙ¹, С. О. КОСТЕРІН¹

¹Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ;

²“Д-р Редді'с Лаботоріс Лтд”, Індія;

e-mail: kinet@biochem.kiev.ua; medvedev@drreddys.com.ua

На плазматичних мембранах клітин міометрія, оброблених 0,1%-м розчином дигітоніну, досліджували вплив інгібіторів протонної помпи – омепразола та лансопразола – на активність убаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТР-ази та убаїнрезистентної Mg^{2+} -АТР-ази. Установлено, що зазначені інгібітори пригнічують активність Na^+ , K^+ -АТР-ази в концентраціях від 10 до 100 мкМ. Максимальний інгібувальний ефект омепразола порівняно з контролем (81%) та лансопразола (86%) спостерігається при концентрації 100 мкМ. Величина коефіцієнта інгібування $I_{0,5}$ омепразола становить $35,60 \pm 0,81$, а лансопразола – $29,40 \pm 1,79$ мкМ. При цьому кооперативних ефектів дії інгібіторів на Na^+ , K^+ -АТР-азну активність не виявлено, оскільки коефіцієнти Хілла n_H для омепразола і лансопразола становлять відповідно $1,00 \pm 0,08$ і $1,20 \pm 0,03$. Цим сполукам у концентрації 100 мкМ притаманний також незначний інгібувальний вплив на Mg^{2+} -АТР-азу: омепразол пригнічує активність її на 16% відносно контролю, а лансопразол – на 18%.

Зниження Na^+ , K^+ -АТР-азної активності свідчить про можливі побічні ефекти цих інгібіторів у разі застосування їх для лікування кислотозалежних хвороб шлунка. Одержані нами результати можуть бути корисними для подальшого з'ясування мембранних механізмів дії омепразола та лансопразола на іонний обмін у клітинах гладеньких м'язів матки.

Ключові слова: омепразол, лансопразол, Na^+ , K^+ -АТР-аза, Mg^{2+} -АТР-аза, ферментативний гідроліз АТР, плазматична мембрана, міометрій, гладеньком'язові клітини.

Омепразол та лансопразол відомі як необоротні інгібітори транспортування соляної кислоти парієтальними клітинами епітелію шлунка. Ці сполуки належать до заміщених бензімідазолів, що за фізіологічних умов здатні специфічно інгібувати H^+ , K^+ -АТР-азу. Саме тому їх застосовують при лікуванні кислотозалежних захворювань шлунка. Селективність дії цих інгібіторів забезпечується здатністю вибірково концентруватися в місцях із низьким значенням рН, що супроводжується активацією їх та утворенням високоактивного циклічного сульфаніламідів. Зазначені речовини інгібують також H^+ , K^+ -АТР-азу, ковалентно взаємодіючи з SH-групами цистеїнових залишків амінокислот [1]. Відомо, що протонна помпа подібна до натрієвої як структурно, так і функціонально: обидва ферменти є АТР-азами Р-типу [2–4]. Тому не виключена можливість впливу омепразолу або лансопразолу на убаїнчутливу Na^+ , K^+ -АТР-азу та інші Mg^{2+} -залежні АТР-гідролазні ферментативні системи, зокрема на убаїннечутливу Mg^{2+} -АТР-азу. Втім, дію зазначених бензімідазолів на інші АТР-азні системи вивчено недостатньо.

Na^+ , K^+ -АТР-аза (натрієва помпа), яка локалізується у плазматичній мембрані і селективно інгібується убаїном, є електрогенною Ca^{2+} -незалежною Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , АТР-залежною транспортувальною системою, що здійснює активне трансмембранне перенесення одновалентних іонів Na^+ і K^+ (стехіометрія – 3 : 2) і тим самим підтримує їхні електрохімічні градієнти, необхідні для нормального функціонування клітин. Йдеться про забезпечення електричної збудливості нервової та м'язової тканин, енергозабезпечення Na^+ -залежного вторинного активного транспортування іонів кальцію (шляхом Na^+ - Ca^{2+} -обміну) і протонів (Na^+ - H^+ -обміну), регуляцію клітинного об'єму тощо [5–9].

У цій роботі, з огляду на важливу роль Na^+ , K^+ -АТР-ази у спряженні збудження і скорочення гладеньких м'язів, ми досліджували концентраційну залежність впливу інгібіторів протонної помпи – омепразолу та лансопразолу – на Na^+ , K^+ -АТР-азну та Mg^{2+} -АТР-азну активність у плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин матки.

Матеріали і методи

Фракцію плазматичних мембран гладеньком'язових клітин виділяли з міометрії свині як було описано раніше [10,11]. Вміст білка в мембранній фракції визначали методом М. М. Bradford із використанням кумасі-G250 [12], загальну Mg^{2+} , Na^+ , K^+ -АТР-азну активність тестували при 37 °С [10], у стандартному середовищі (об'єм – 0,4 мл), що містило (в мМ): 1 АТР, 3 $MgCl_2$, 125 $NaCl$, 25 KCl , 1 ЕГТА, 20 Нерес-Tris-буфер (рН 7,4), 1 NaN_3 (інгібітор АТР-ази мітохондрій) [13], 0,1 мкМ тапсигаргін (селективний інгібітор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази ендо(сарко)-плазматичного ретикулума [13]) і 0,1%-й дигітонін (фактор перфорації плазматичної мембрани) [14]. Кількість білка у зразку мембранної фракції становила 20–30 мкг, тривалість інкубації – 4 хв. Ферментативну реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації 20 мкл суспензії плазматичних мембран, а зупиняли додаванням до нього 1 мл “стоп”-розчину, який містив: 1,5 М натрію оцтовокислого; 3,7% формальдегіду; 14% етанолу і 5% ТХУ (рН 4,3; температура 8 °С). Наявність у середовищі інкубації Ca^{2+} -хелатора ЕГТА забезпечувало зв'язування ендogenous іонів Ca . Mg^{2+} -АТР-азну активність тестували в такому самому середовищі інкубації, але після додавання до нього 1 мМ убаїну – селективного інгібітору Na^+ , K^+ -АТР-ази [15, 16]. Убаїнчутливу Na^+ , K^+ -АТР-азну активність обчислювали за різницею між активністю загальної АТР-ази і Mg^{2+} -АТР-ази, резистентної до дії убаїну.

У всіх дослідах контролем на неферментативний гідроліз АТР слугувало середовище інкубації, аналогічне за складом до описаного вище, до якого не вносили плазматичні мембрани. Як контроль на кількість ендogenous фосфору (P_i) в мембранному препараті використовували суспензію плазматичних мембран у водному розчині. Отже, загальну АТР-азну активність обчислювали за різницею між кількістю P_i , що утворився в середовищі інкубації у присутності та за відсутності плазматичних мембран, враховуючи поправку на неферментативний гідроліз АТР і вміст ендogenous P_i в мембранному препараті. Кількість продукту реакції P_i визначали методом W. Rathbun та V. Vetluch [17].

У дослідах з вивчення впливу омепразолу та лансопразолу (концентрації 10–100 мкМ) на активність Na^+ , K^+ -АТР-ази та Mg^{2+} -АТР-ази використовували описане вище стандартне середовище інкубації, до якого додавали аліквоти інгібіторів ферментів – 4 мМ розчини омепразолу та лансопразолу в ДМСО, які роз-

бавляли водою до потрібної концентрації. За 100% (“нульову точку”) приймали АТР-гідролазну активність, яку визначали за відсутності інгібіторів у стандартному середовищі інкубації.

Значення коефіцієнтів інгібування $I_{0,5}$ та коефіцієнтів Хілла n_H обчислювали з використанням лінеаризованих графіків відповідно до емпіричного рівняння Хілла:

$$\lg[(A_{\max} - A)/A] = n_H \lg[I] - n_H \lg I_{0,5}$$

де A – ферментативна активність у присутності в середовищі інкубації інгібіторів в концентрації I , A_{\max} – максимальна активність за відсутності в ньому інгібіторів. Типове значення коефіцієнта кореляції R^2 становило 0,90–0,99.

Статистичний аналіз одержаних даних проводили загальновідомими стандартними методами. Кінетичні та статистичні розрахунки здійснювали в режимі програмного забезпечення “MS Office”.

У роботі застосовували такі реактиви: АТР, Нерес, убаїн, тапсигаргін, («Sigma», США), омепразол, лансопразол («Д-р Редді'с Лабораторіс Лтд», Індія), трис(гідроксиметил)амінометан («Reanal», Угорщина), дигітонін («Merck», Німеччина), ЕГТА («Fluka», Швейцарія). Інші реактиви використані в експериментах, були вітчизняного виробництва кваліфікації чда та хч.

Результати та обговорення

Раніше нами було показано, що у плазматичній мембрані клітин міометрія свині активність Na^+ , K^+ -АТР-ази і Mg^{2+} -АТР-ази становить $10,2 \pm 0,7$ та $18,1 \pm 1,2$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка відповідно ($M \pm m$, $n = 7$) [10].

Дані досліджень впливу омепразолу в різних концентраціях на активність Na^+ , K^+ -АТР-ази та Mg^{2+} -АТР-ази наведено на рис. 1. Вони свідчать, що омепразол у концентраціях від 10 до 100 мкМ пригнічує активність обох ферментів, але його вплив на активність Na^+ , K^+ -АТР-ази ефективніший, ніж на Mg^{2+} -АТР-азу (рис. 1, А). Так, у концентрації 100 мкМ омепразол інгібує порівняно з контролем активність Na^+ , K^+ -АТР-ази на 81%, у той час як Mg^{2+} -АТР-ази – лише на 16%. Лінеаризація в координатах Хілла концентраційних залежностей ефекту омепразолу на активність Na^+ , K^+ -АТР-ази показує, що значення коефіцієнта інгібування $I_{0,5}$ та коефіцієнта Хілла n_H становлять відповідно $35,60 \pm 0,81$ і $1,00 \pm 0,08$ мкМ (рис. 1, Б, таблиця).

У подальших експериментах ми вивчали концентраційну залежність впливу лансопразолу на активність обох АТР-аз (рис. 2). Встановлено, що цей інгібітор, так само як і омепразол,

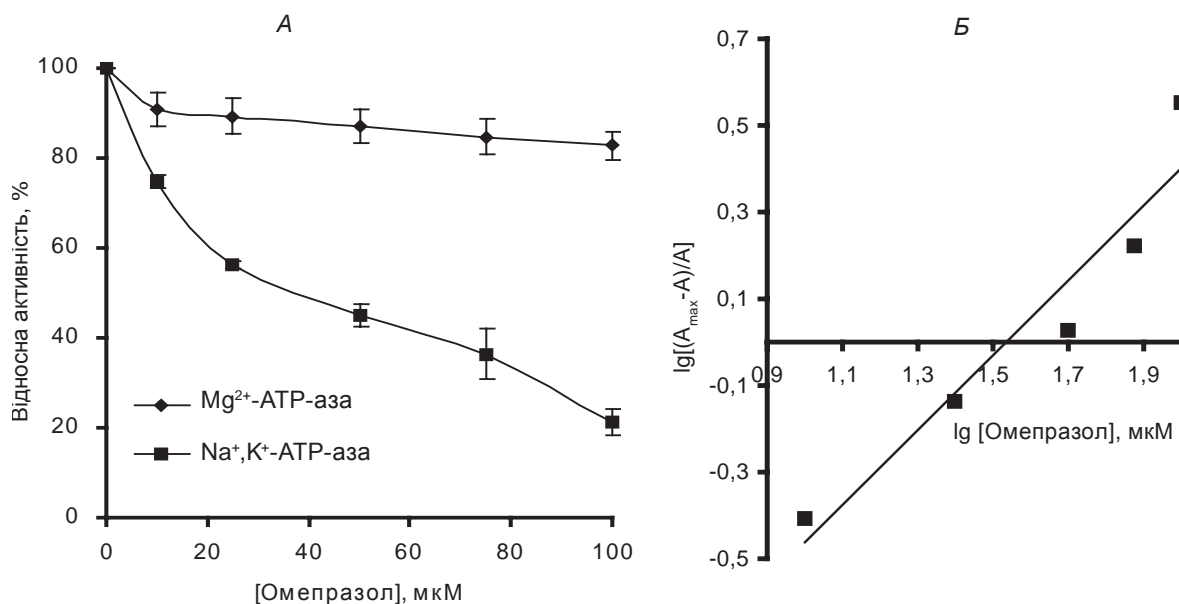


Рис. 1. Вплив омепразолу на Na⁺,K⁺-АТФ-азну та Mg²⁺-АТФ-азну активність плазматичних мембран клітин міометрія (А; $M \pm t$, $n = 5$) та залежність Na⁺,K⁺-АТФ-азної активності (Б) від концентрації омепразолу в координатах Хілла. Типовий експеримент

дозозалежно інгібує її (рис. 2, А). Лансопразол (концентрації 10–100 мкМ) пригнічує порівняно з контролем активність Na⁺,K⁺-АТФ-ази: максимально (на 85%) у концентрації 100 мкМ. Значно менш ефективно лансопразол інгібує активність Mg²⁺-АТФ-ази – в середньому на 18%. Лінеаризація в координатах Хілла даних щодо дії інгібітору на активність Na⁺,K⁺-АТФ-ази показує, що значення коефіцієнта інгібування $I_{0,5}$ та коефіцієнта Хілла n_H становлять $29,40 \pm 1,79$ і $1,20 \pm 0,03$ мкМ відповідно (рис. 2, Б та таблиця; $M \pm t$, $n = 5$).

Отже, омепразол та лансопразол здатні ефективно і майже однаково інгібувати Na⁺,K⁺-АТФ-азну активність плазматичної мембрани клітин міометрія (тестовано за значенням $I_{0,5}$). При цьому вплив цих сполук на Mg²⁺-АТФ-азну активність виявляється незначним. Припускається, що такий ефект обох інгібіторів обумовлено взаємодією їх з SH-групами в молекулах досліджуваних ферментів, подібно до інгібувального впливу на H⁺,K⁺-АТФ-азу шлунка [1]. У цьому випадку неоднакова ефек-

тивність інгібування активності Na⁺,K⁺-АТФ-ази та Mg²⁺-АТФ-ази, вірогідно, пояснюється різним ступенем доступності вільних SH-груп ферментів. Однак незрозуміло, як омепразол та лансопразол перетворюються на хімічно активну форму – сульфенамід, оскільки сульфенаміди, ковалентно зв'язані з SH-групами, утворюються в кислому середовищі після протонування піридинового кільця [1], а дослідження здійснювали в нейтральному середовищі (рН 7,4). За таких умов активація обох інгібіторів відбувається дуже повільно і тому такий механізм інгібування маловірогідний.

Таким чином, імовірно, що омепразол та лансопразол безпосередньо взаємодіють із досліджуваними ферментативними системами. Цю взаємодію можна пояснити як безпосередньою дією на ферментний білок, так і опосередкованим впливом через мембранні ліпіди, оскільки цим інгібіторам притаманна висока ліпофільність [1]. Відомо, що Na⁺,K⁺-АТФ-аза є інтегральним білком і його конформаційна рухливість та функціонування залежать від рі-

Кінетичні характеристики інгібувальної дії омепразолу та лансопразолу на активність Na⁺,K⁺-АТФ-ази у плазматичній мембрані клітин гладенького м'яза матки ($M \pm t$, $n = 5$)

Інгібітори	Коефіцієнт інгібування $I_{0,5}$, мкМ	Коефіцієнт Хілла, n_H
Омепразол	$35,60 \pm 0,81$	$1,00 \pm 0,08$
Лансопразол	$29,40 \pm 1,79$	$1,20 \pm 0,03$

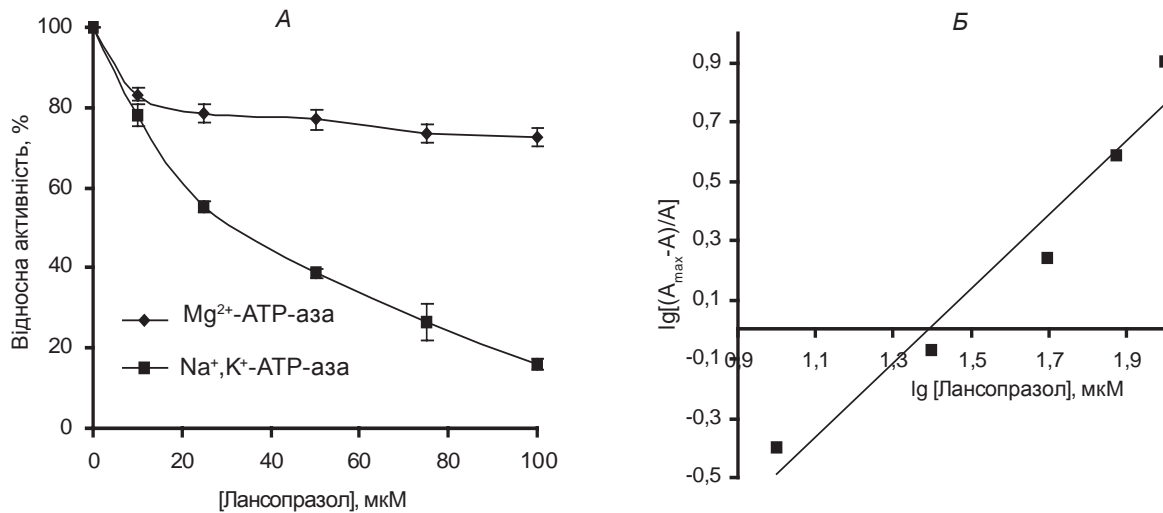


Рис. 2. Вплив лансопразолу на Na⁺,K⁺-АТФ-азну та Mg²⁺-АТФ-азну активність плазматичних мембран клітин міометрія (А; $M \pm m$, $n = 5$) та залежність Na⁺,K⁺-АТФ-азної активності (Б) від концентрації лансопразолу в координатах Хілла. Типовий експеримент

динно-кристалічного стану мембран [18]. Тому, вірогідно, омепразол та лансопразол виявляють мембранотропну дію, інгібуючи Na⁺,K⁺-АТФ-азну активність унаслідок взаємодії з анулярними ліпідами мембрани. В цьому випадку можна пояснити незначне інгібування в експериментах Mg²⁺-АТФ-азної активності, оскільки вона не залежить від складу ліпідів та рідинно-кристалічного стану мембрани [19].

Порівняння значень коефіцієнтів інгібування I_{0,5}, свідчить про майже однакову спорідненість лансопразолу та омепразолу до Na⁺,K⁺-АТФ-ази. Водночас слід відзначити, що омепразолу не властива кооперативність дії, в той час як для лансопразолу виявлено незначний рівень позитивної кооперативності (тестовано за значенням n_H).

Слід також зауважити, що інгібування Na⁺,K⁺-АТФ-азної активності, ймовірно, свідчить про побічні ефекти омепразолу та лансопразолу в разі застосування їх для лікування кислотозалежних хвороб шлунка. Одержані нами експериментальні дані можуть бути корисними для подальшого з'ясування мембранних механізмів дії омепразолу та лансопразолу на іонний обмін у клітинах гладеньких м'язів, в експериментах з вивчення ролі плазматичної мембрани в забезпеченні електромеханічного спряження у клітинах міометрія під час функціонального спокою та вагітності, а також у дослідженнях закономірностей мембранного контролю іонного гомеостазу в міоцитах матки.

ВЛИЯНИЕ ОМЕПРАЗОЛА И ЛАНСОПРАЗОЛА НА Na⁺,K⁺-АТФ-азную И Mg²⁺-АТФ-азную АКТИВНОСТЬ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК МИОМЕТРИЯ

Т. А. Веклич¹, А. А. Шкрабак¹,
В. В. Медведєв², М. Д. Курский¹,
С. А. Костерин¹

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;

²«Д-р Редди'с Лабораторис Лтд», Индия;
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua;
medvedev@drreddys.com.ua

На плазматических мембранах клеток мио- метрия, обработанных 0,1%-м раствором ди- гитонина, исследовали влияние ингибиторов протонного насоса – омепразола и лансопразола – на активность убаинчувствительной Na⁺,K⁺-АТФ-азы и убаинрезистентной Mg²⁺- АТФ-азы. Установлено, что оба ингибитора в диапазоне концентраций от 10 до 100 мкМ угнетают активность Na⁺,K⁺-АТФ-азы. Макси- мальный ингибиторный эффект омепразола (81%) и лансопразола (86%) сравнительно с кон- тролем наблюдается в концентрации 100 мкМ. Величина коэффициентов ингибирования I_{0,5} составляет 35,60 ± 0,81 и 29,40 ± 1,79 мкМ со- ответственно. При этом кооперативные эффек- ты действия на Na⁺,K⁺-АТФ-азную активность отсутствуют, так как коэффициент Хилла n_H

для омепразола равен $1,00 \pm 0,08$, а для лансопразола — $1,20 \pm 0,03$. Данные вещества оказывают также незначительное ингибиторное влияние на Mg^{2+} -АТФ-азу: 100 мкМ омепразол подавляет ее активность на 16% относительно контрольной величины, а 100 мкМ лансопразол — на 18%.

Ингибирование Na^+, K^+ -АТФ-азной активности может свидетельствовать о возможных побочных эффектах омепразола и лансопразола при использовании их в качестве лекарственных средств при болезнях желудка, связанных с нарушением кислотного гомеостаза. Кроме того, полученные экспериментальные данные могут быть полезны при дальнейшем исследовании мембранных механизмов действия этих ингибиторов ферментативной активности на ионный обмен в клетках гладких мышц миометрия.

Ключевые слова: омепразол, лансопразол, Na^+, K^+ -АТФ-аза, Mg^{2+} -АТФ-аза, ферментативный гидролиз АТФ, плазматическая мембрана, миометрий, гладкомышечные клетки.

INFLUENCE OF OMEPRASOLE AND LANSOPRASOLE ON Na^+, K^+ -ATPase AND Mg^{2+} -ATPase ACTIVITY OF THE PLASMATIC MEMBRANE OF MYOMETRIUM SMOOTH MUSCLE CELLS

*T. O. Veklich¹, O. A. Shkrabak¹,
V. V. Medvedev², M. D. Kurskiy¹,
S. O. Kosterin¹*

¹Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

²“Dr Reddy’s Laboratories Ltd”, India;
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua;
medvedev@drreddys.com.ua

Summary

The paper deals with the influence of the proton pump inhibitors — omeprazole and lansoprasole on the enzymatic activity of the ouabain-sensitive Na^+, K^+ -ATPase and the ouabain-resistant Mg^{2+} -ATPase in the suspension of the myometrium cell plasmatic membranes treated with 0.1% digitonin solution. It was found, that omeprazole and lansoprasole inhibited Na^+, K^+ -ATPase in the range from 10 to 100 μM . The maximal effect was observed at a concentration of 100 μM with the percentage of inhibition of 81 and 86% at an average as compared with the control for omeprazole and lansoprasole,

respectively. The magnitudes of the inhibition coefficient $I_{0,5}$ for omeprazole and lansoprasole were 35.60 ± 0.81 and $29.40 \pm 1.79 \mu M$ respectively. Meanwhile cooperative effects on the Na^+, K^+ -ATPase activity were not found, as the Hill coefficient n_H for omeprazole was 1.00 ± 0.08 , while for lansoprasole it was 1.20 ± 0.03 . These substances had also insignificant influence on Mg^{2+} -ATPase: the enzymatic activity was decreased to 84 and 82% as compared with the control with omeprazole and lansoprasole, respectively, in concentration of 100 μM for each inhibitor.

The inhibition of Na^+, K^+ -ATPase activity can evidence for the possible side effects of omeprazole and lansoprasole when they are used for treatment of acid-dependent diseases of the stomach. In addition, obtained experimental data can be useful for further research of the membrane mechanisms of omeprazole and lansoprasole action on cationic exchange in the smooth muscle cells.

Key words: omeprazole, lansoprasole, Na^+, K^+ -ATPase, Mg^{2+} -ATPase, enzymatic hydrolysis of ATP, kinetic properties of ATPase, plasmatic membrane, myometrium, smooth muscle cells.

1. Лопина О. Д. // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатолог., колопроктологии. — 2002. — 2. — С. 38–44.
2. Лопина О. Д. // Биохимия. — 2001. — 66, № 10. — С. 1389–1400.
3. Kotyk A. // Cell Mol. Biol. Lett. — 1997. — 2, N 1. — P. 131–144.
4. Scheiner-Bobis G. // Eur. J. Biochem. — 2002. — 269, N 10. — P. 2424–2433.
5. Кривой И. И., Дробкина Т. М., Добрецов М. Г. и др. // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. — 2004. — 90, № 1. — С. 59–72.
6. Лопина О. Д. // Биохимия. — 2001. — 66, вып. 6. — С. 1389–1400.
7. Boldyrev A. A. // Membr. Cell Biol. — 2000. — 13, N 6. — P. 715–719.
8. Avkiran M., Snabaitis A. K. // J. Tromb. Trombolysis. — 1999. — 8. — P. 25–32.
9. Greger R. // Am. J. Med. — 2000. — 319. — P. 51–62.
10. Веклич Т. О., Костерин С. О. // Укр. біохім. журн. — 2005. — 77, № 2. — С. 66–75.
11. Кондратюк Т. П., Быченко С. Ф., Прищепина Л. А. и др. // Укр. біохім. журн. — 1986. — 58, № 4. — С. 50–56.
12. Bradford M. M. // Anal. Biochem. — 1976. — 72. — P. 248–282.
13. Flynn E. R. M., Bradley K. N., Muir T. C., McCarron J. G. // J. Biol. Chemistry. — 2001. — 276, N 39. — P. 36411–36418.

14. Векліч Т. О., Костерін С. О., Шинлова О. П. // Укр. біохім. журн. – 2002. – **74**, № 1. – С. 42–48.
15. Valente R. C., Capella L. S., Monteiro R. Q. et al. // FASEB J. – 2003. – **17**, N 12. – P. 1700–1702.
16. Wang H., Haas M., Liang M. et al. // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**, N 17. – P. 17250–17259.
17. Rathbun W., Betluch V. // Ibid. – 1969. – **28**. – P. 436–445.
18. Капля А. А., Кравцова В. В., Кравцов А. В. // Биол. мембр. – 1997. – **14**, № 1. – С. 73–82.
19. Srinivasarao P. et al. // Neurochem. Intern. – 1997. – **31**, N 6. – P. 789–794.

Отримано 16.09.2007