

Л. І. Кузьменко, О. В. Богданова, О. О. Кравченко,
Л. І. Остапченко, К. В. Прокопова

Дослідження тирозинпротеїнкіназної активності в клітинах слизової оболонки шлунка за умов розвитку виразки та на ранніх етапах її загоєння

(Представлено академіком НАН України М. Є. Кучеренком)

Protein tyrosine kinase activities in membranes and cytosol of rat stomach mucosa cells under conditions of ulcer development and during early stages (five days) of experimental stress ulcer models healing are investigated. The level of these parameters under omeprazole treatment in therapeutic doses is evaluated. It was established that ulcerative disease forming and healing are accompanied by significant abnormalities of the functioning of tyrosine phosphorylation enzymes in stomach mucosa cells during early stages of ulcer healing. The protein tyrosine kinase activities after stressing remained to be essentially reduced in membranes and cytosol. It is shown that enzymes activities were increased on the 4th and 5th days immediately after ulceration under conditions of omeprazole treatment.

На сьогодні у зв'язку з погіршенням екологічної та економічної ситуації серед населення значно зросла кількість захворювань органів травлення. Найбільш поширеною патологією шлунково-кишкового тракту є виразкова хвороба шлунка, на яку страждає майже 5% дорослого населення. В основі цього хронічного рецидивного захворювання знаходяться порушення нейрогуморальної і ендокринної регуляції шлункової секреції, дисбаланс між факторами агресії та захисту слизової оболонки, що ускладнюється неадекватним функціонуванням імунної системи. Клінічна картина виразкової хвороби та патофізіологічні процеси, які лежать у витоках порушень цілісності слизової оболонки шлунка (СОШ), достатньо вивчені. Проте значної уваги дослідників потребують біохімічні і молекулярні механізми утворення та загоєння виразки, вивчення яких сприятиме розробці нових терапевтичних засобів лікування даного захворювання.

Відомо, що клітини СОШ мають високий регенераторний потенціал, і особливу роль у процесі відновлення цілісності СОШ відіграють ферменти тирозинового фосфорилування [1]. Тирозинові протеїнкінази (ТПКазини) (КФ 2.7.1.112), які каталізують фосфорилування тирозинових залишків у білках-мішенях, є частиною сигнальних каскадів від рецепторів факторів росту та беруть участь у регуляції проліферації, диференціації, а також трансформації клітин [1]. Більшість рецепторів ростових факторів у клітинах шлунково-кишкового тракту утримують власний ТПКазиний домен у внутрішньоклітинних ділянках, тому ТПКазини відіграють вирішальну роль у регуляції проліферації клітин СОШ після пошкоджень [2]. Так, показано, що ТПКазина активність, властива рецептору епідермального фактора росту (ЕФР-Р), який знаходиться в мембранах клітин СОШ, була значно вищою (більш ніж у 2 рази) через 30 хв після пошкоджень СОШ [3]. Тому припускають, що активація цих ферментів може бути важливим фактором в ініціації репаративних процесів [2, 3]. Однак недостатньо з'ясованою на сьогодні є роль ферментів тирозинового фосфорилування в динаміці реепітелізації утворених дефектів СОШ.

Для профілактики і лікування виразкової хвороби шлунка різної етіології застосовують антацидні засоби, гастропротектори, антагоністи H_2 -рецепторів та інгібітори протонної помпи. Дія цих препаратів спрямована головним чином на зниження секреції соляної кислоти. Найбільш ефективними лікарськими засобами є омепразол та його похідні, які знижують кислотну секрецію, селективно інгібуючи протонний насос, H^+/K^+ -АТФазу, у складі мембран парієтальних клітин шлунка. У нещодавніх дослідженнях було показано, що омепразол також виявляє антиоксидантні властивості, знешкоджуючи ендогенні OH^\bullet радикали, і, таким чином, зменшує утворення продуктів пероксидного окиснення ліпідів, а також запобігає стресіндукованій фрагментації ДНК та апоптозу клітин СОШ під час виразкоутворення [4]. Встановлено також [4], що введення омепразолу за 30 хв до холодового стресу значно зменшує кількість та площу уражень СОШ у дослідних тварин. Однак не з'ясованим залишається ефект введення даного препарату на біохімічні процеси, що знаходяться в основі відновлення цілісності СОШ. Є припущення, що цей потужний модулятор функціональної активності парієтальних клітин істотно впливає на процеси регенерації. Тому вивчення активності ТПКаз за вказаних умов може висвітлити це важливе питання.

Наша мета — дослідження ТПКазної активності у фракціях плазматичних мембран і цитозолі клітин СОШ за умов розвитку стресової виразки та на ранніх етапах загоєння (0–5 доба) в експериментальній моделі, а також за умов введення омепразолу в терапевтичних дозах.

Матеріали та методи. Досліди проведено на самцях білих нелінійних щурів масою 200–250 г. Експериментальну виразку шлунка у піддослідних тварин викликали згідно з методом [4] за допомогою холодового стресу. Модель стресіндукованих виразкових уражень створювали витриманням іммобілізованих тварин за температури $4^\circ C$ протягом 3,5 год. Розчин препарату омепразолу у фізіологічному розчині вводили внутрішньочеревно в дозі 0,8 мг/кг один раз на добу протягом п'яти діб після виразкоутворення. Тварин декапітували через 40 хв (середній період напіввиведення омепразолу). Ураження СОШ оцінювали макроскопічно (обраховували індекс виразкоутворення — співвідношення загальної площі уражень до кількості дослідних тварин згідно з [4]) та гістологічно.

Після видалення СОШ гомогенізували в середовищі 0,14 М NaCl. Отриманий гомогенат використовували для очищення фракцій плазматичних мембран та цитозолу методом диференціального центрифугування на градієнті 30% сахарози ($\rho = 1,127$) [5]. Усі процедури виділення здійснювали за температури $4^\circ C$. Активність ферментів визначали методом імуно-ферментного аналізу з використанням наборів реактивів “Sigma” (США) згідно з інструкціями. Результати обраховували, використовуючи програмний пакет прикладних програм STATISTICA 5.0 за методом ANOVA та t test.

Результати дослідження та їх обговорення. СОШ здатна до швидкого відновлення завдяки балансу між проліферацією і апоптозом клітин, а також після пошкодження [6]. Хоча внутрішньоклітинні механізми, що регулюють проліферацію і диференціацію клітин СОШ, недостатньо вивчені, проте, є переконливі докази про вирішальну роль ТПКаз у вищезазначених процесах [6]. Дослідження морфофункціональних змін у процесі виразкоутворення та на ранніх етапах загоєння виразкових уражень є важливим напрямком для визначення динаміки реепітелізації в СОШ.

Згідно з результатами наших досліджень, холодовий стрес індукував дві форми виразкових уражень у дослідних тварин: перша — з малою кількістю великих за площею виразок, а друга — з великою кількістю малих виразок. При цьому друга форма переважала на 1-шу—2-гу добу після виразкоутворення. Так, розмір виразок у 60% випадків не перевищу-

вав 1 мм^2 . Великі виразки (більше 4 мм^2) становили 20–30% загальної кількості уражень. Слід зазначити, що відразу після стресу розмір виразкових уражень не перевищував 3 мм^2 . На 3-тю добу після виразкоутворення індекс уражень становив переважно $1\text{--}3 \text{ мм}^2$, а на 4-ту добу — менше 1 мм^2 . На 5-ту добу після холодного стресу видимих морфологічних уражень слизової не виявлено. Тому дослідження активності ферментів системи тирозинового фосфорилування було проведено протягом п'яти днів після виразкоутворення.

За даними гістологічних досліджень, відразу після виразкоутворення мали місце дистрофічні зміни в клітинах залоз слизової оболонки, нейтрофільна інфільтрація була більш виражена в підслизовому шарі. На тлі нормального наповнення магістральних судин спостерігалася відсутність капілярного кровотоку. На 1-шу добу відмічалася підвищення слизоутворення, яке супроводжувалося атрофічними змінами залоз слизової та інтенсивним злущуванням епітеліального шару. Порушення іннервації слизової оболонки виявлялось у дистрофічній зміні нейронів. Більшість кровоносних судин вже були наповнені кров'ю. Відбувалось накопичення нейтрофільних гранулоцитів та лімфоцитів; була підвищена кількість активованих макрофагів у підслизовій. На 2-гу добу в шлунку наявні більш виражені атрофічні зміни, з ділянками вторинної ерозії, що не спостерігалось в попередніх обстеженнях. Слизова оболонка інфільтрована лімфоцитами. Кровоносні судини помірно кровонаповнені, а нейрони помірно дистрофічно змінені. Відмічався розвиток катарального гастриту. На 3-тю та 4-ту добу атрофічні зміни найбільш виражені, з ділянками пошкодження слизової оболонки до м'язового шару (ділянки ерозії). Найбільш чітко виражений ерозивний гастрит спостерігався на 3-тю добу. У підслизовій відбувалась дифузна лімфоцитарна та місцева нейтрофільна інфільтрація. На 5-ту добу зміни в слизовій оболонці менш виражені, порівняно з 3-ю та 4-ю добою. Гістологічна картина відповідає ознакам катарального гастриту, що супроводжувався активною десквамацією епітелію.

Для з'ясування можливих механізмів участі ферментів тирозинового фосфорилування в процесі утворення та на ранніх етапах загоєння виразкової хвороби було досліджено ТПКазну активність у фракціях плазматичних мембран і цитозолі клітин слизової оболонки за умов розвитку експериментальної стресової моделі виразки шлунка. Встановлено, що стресіндукований ульцерогенез призводить до зниження активності мембранозв'язаних ТПКаз у 1,6 раза, тоді як у цитозольних фракціях їх активність зменшувалась у 2,2 раза порівняно з контрольними значеннями (рис. 1). Зниження активності ТПКаз відразу після виразкоутворення узгоджується з даними літератури, згідно з якими в умовах ішемії та наступної реперфузії значно знижується рівень тирозинового фосфорилування, ТПКазна та ТПФазна активність [7]. Оскільки в основі формування стресових уражень СОШ лежать адренергічні впливи, які призводять до звуження судин та погіршення мікроциркуляції СОШ, гострої місцевої ішемії та наступної реперфузії після зняття стресогенного впливу [8], це може бути поясненням спостережуваних нами порушень. Також зниження активності ТПКаз на початкових етапах (12 год) після стресової виразки було показано в роботі [9].

Проте на ранніх строках загоєння активність ферментів зростала. Вже на 1-шу—2-гу добу після виразкоутворення значення активності як мембранозв'язаних, так і цитозольних ТПКаз досягали контролю. У фракціях плазматичних мембран у подальшому ферментативна активність також мала тенденцію до зростання. На 3-тю та 4-ту добу активність мембраноасоційованих ТПКаз зростала в 1,5 та 2 рази відповідно, а на 5-ту добу — набувала контрольних значень. У цитозолі на 3-тю та 5-ту добу ТПКазна активність зменшувалась у 3 рази, а на 4-ту добу — в 1,7 раза.

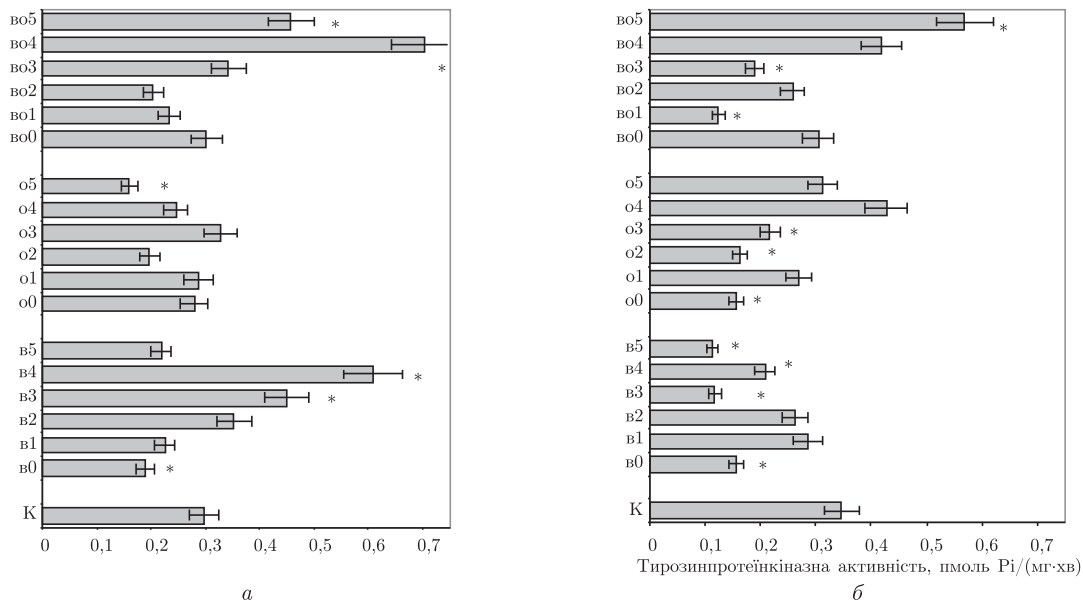


Рис. 1. Тирозинпротеїнкіназна активність у плазматичних мембранах (а) та цитозолі (б) клітин слизової оболонки шлунка щурів з виразковими ураженнями ($M \pm t$, $n = 6$):

vo0 — vo5 — група тварин із стресіндукованими ураженнями слизової оболонки шлунка, які отримували препарат омепразолу відразу після виразкоутворення (vo0) та на 1-шу—5-ту добу; o0 — o5 — група тварин, які отримували препарат омепразолу таким же чином, як і в попередній групі, за відсутності холодного стресу; v0 — v5 — група тварин із стресіндукованими ураженнями слизової оболонки шлунка; К — контрольна група тварин. * — $p \leq 0,05$

Підвищення активності мембраноасоційованих ферментів пов'язано з тим, що вже протягом декількох годин після пошкодження СОШ розпочинаються процеси репаративної регенерації епітеліальної поверхні і підвищується проліферація та подальша диференціація клітин. Ці процеси ініціюються локальною активацією генів (EGF-R, c-fos, c-jun, egr-1, Sp-1, TFF-2/SP), які активуються відразу після виразкоутворення (протягом 30 хв — 2 год) [10]. Їх стимуляція призводить до запуску шляхів сигнальної трансдукції за участю різних ростових факторів: EGF, bFGF, PDGF і VEGF (протягом 6 год — 2 діб) та HGF, ITF, c-met/HGF-R (14 діб) [10]. На ранніх етапах загоєння виразкового дефекту відбувається активація ЕФР-Р, що призводить до підвищення ТПКазної активності в його внутрішньоклітинному домені та фосфорилування мембранозв'язаних клітинних білків [3]. Внаслідок цього пригнічується кислотна секреція та стимулюється транскрипція гена гастрину, а також підвищення рівня гастрину в плазмі. Гастрин, у свою чергу, сприяє зростанню ТПКазної активності і тирозиновому фосфорилуванню клітинних білків, за участю нерцепторних тирозинових кіназ p125fak і Src, адапторних білків p130cas і паксиліну [11]. Зростання ТПКазної активності через 30 хв після виразкоутворення пов'язано зі змінами в тирозиновому фосфорилуванні деяких мембранних білків [2, 3]. Наприклад, білок pp55 є тирозиною протеїнкіназою, яка знаходиться в клітинах СОШ і активується ЕФР під час проліферації і диференціації клітин слизової оболонки після пошкоджень [12].

У дослідженнях динаміки загоєння виразкового дефекту [13] відзначено зростання кількості ЕФР-Р-репрезентуючих клітин у слизовій оболонці на 1-шу добу, яке набувало максимуму на 3-тю добу після виразкоутворення. У наших дослідженнях також спостерігається зростання мембраноасоційованої ТПКазної активності в цей період (3-тя—4-та доба), що може бути пояснено вищенаведеними літературними даними. Зниження активності цито-

зольних ТПКаз на 3-тю, 5-ту добу може бути наслідком негативної зворотної регуляції процесів сигнальної трансдукції від рецепторів ростових факторів за рахунок інгібуючого фосфорилювання.

Пригнічення кислотної секреції є одним з найпоширеніших підходів у процесі лікування виразкової хвороби. Можливість найбільш потужного антисекреторного впливу була реалізована завдяки групі препаратів, які безпосередньо блокують роботу H^+/K^+ -АТФази, що знаходиться на базолатеральній мембрані парієтальних клітин, шляхом пригнічення заключного етапу утворення соляної кислоти — перенесення іонів водню з парієтальної клітини в порожнину шлунка. Секреція кислоти відновлюється тільки тоді, коли синтезуються нові молекули протонної помпи [14]. До препаратів, які інгібують протонну помпу належать омепразол, пантопразол, лансопразол та рабепразол, які є заміщеними похідними бензимидазолу та здатні утримувати значення рН в інтервалі, який сприяє загоєнню виразки шлунка. Омепразол — один з найбільш поширених лікарських засобів цієї групи. Він є слабкою основою, яка в кислому середовищі каналців парієтальних клітин швидко (2–4 хв) перетворюється на активний метаболіт сульфенамід, який за рахунок дисульфідного зв'язку сполучається з активним центром мембранної H^+/K^+ -АТФази і необоротно її інгібує. Таким чином, цей препарат ефективно пригнічує базальну і викликану будь-яким подразником секрецію соляної кислоти та виділення пепсину, знижує загальний об'єм шлункової секреції [14]. Крім того, є дані, що омепразол виявляє гастропротекторні властивості, індукуючи загоєння виразкової хвороби в дозі, яка не впливає на кислотну секрецію [4]. Однак тривале введення омепразолу може викликати гіпергастринемію, яка спричинює трофічну дію на парієтальні клітини СОШ і повну гіперплазію ентерохромоефільних клітин, а також формування карциноідів та аденокарцином шлунка [15].

Нами було досліджено активність ферментів тирозинового фосфорилювання в клітинах слизової оболонки за умов розвитку та на ранніх етапах загоєння стресіндукованої моделі виразки шлунка на фоні введення омепразолу. Показано, що на тлі введення препарату активність мембранозв'язаних та цитозольних ТПКаз залишалася на контрольному рівні відразу після виразкоутворення. На 1-шу, 2-гу та 3-тю добу після формування стресової виразки активність ТПКаз в плазматичних мембранах не змінювалась щодо контрольних значень. Найбільша активація цих ферментів спостерігалася на 4-ту та 5-ту добу (підвищення активності у 2,4 та 1,5 рази відповідно).

На тлі введення препарату активність цитозольних ТПКаз зменшувалась на 1-шу (у 2,8 рази) та 3-тю добу (у 1,8 рази) після виразкоутворення, тоді як на 5-ту добу зростала в 1,6 рази. Таке інгібування цитозольних форм ферменту на ранніх етапах загоєння виразки може свідчити про порушення передачі зовнішньоклітинного сигналу через каскади ТПКаз. Це може бути пов'язано з пригніченням функціональної активності парієтальних клітин внаслідок порушення іонного обміну за умов інгібування протонної помпи. За таких умов неможливою є нормальна відповідь на сигнали ростових факторів.

Підвищення активності на більш віддалених термінах може бути результатом індукції синтезу компонентів антиоксидантної системи омепразолом, внаслідок кумулятивного ефекту на фоні утворення виразкового дефекту. Індукована препаратом експресія ізоформ цитохромів P450 та глутатіонтрансферази може призводити до підвищення детоксикуючої здатності клітинних систем та поліпшення проходження репаративного сигналу від ростових факторів (які надходять у значно підвищеній кількості в ході репараційних процесів) на 4-ту, 5-ту добу після виразкоутворення, наслідком чого може бути зростання ТПКазної активності у фракціях плазматичних мембран та цитозолу за таких умов.

При застосуванні омепразолу в терапевтичних дозах у тварин, у яких була відсутня виразка шлунка, активність мембранозв'язаних ТПКаз в клітинах СОШ зменшувалась лише на 5-ту добу введення препарату, тоді як цитозольні форми ферменту інгібувались відразу після початку введення та на 2-гу і 3-тю добу. Інгібування активності ТПКаз може бути підтвердженням пригнічуючого впливу омепразолу на функціонування клітин СОШ, зокрема парієтальних за відсутності морфологічних уражень та на фоні базального рівня ростових стимулів.

Таким чином, формування та загоєння виразкових уражень шлунка супроводжується істотними порушеннями функціонування ферментів тирозинового фосфорилування в клітинах слизової оболонки на ранніх етапах загоєння виразкової хвороби. Нами встановлено, що, незважаючи на зникнення макроскопічних проявів виразкових уражень СОШ, процеси регенерації та відновлення нормального функціонування клітин є незавершеними. Активність ТПКаз як у цитозолі, так і в плазматичних мембранах залишалась істотно зниженою. За умов введення омепразолу ферментативна активність зростала лише на 4–5-ту добу після виразкоутворення.

З огляду на отримані нами результати вивчення функціонування тирозинових протеїнкіназ за умов утворення виразки та дослідження особливостей її загоєння на ранніх етапах можна говорити про зміни в традиційному лікуванні виразкової хвороби, оскільки, незважаючи на зникнення видимих уражень, активність ферментів залишається порушеною.

1. Jones M. K., Tomikawa M., Mohajer B., Tarnawski A. S. Gastrointestinal mucosal regeneration: role of growth factors // *Frontiers in Bioscience*. – 1999. – 4. – P. d303–309.
2. Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases // *Cell*. – 2000. – 103. – P. 211–225.
3. Relan N. K., Fligel S. E., Dutta S. et al. Induction of EGF receptor tyrosine kinase during early reparative phase of gastric mucosa and effect of aging // *Lab. Invest.* – 1996. – 73. – P. 717–226.
4. 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.
5. Рубальченко В. К., Козанов М. М. Структура и функции мембран. – Киев: Вища шк., 1988. – С. 79–83.
6. Majumdar A. P., Luk G. D. Gastric epithelial cell proliferation after injury // *J. Clin. Gastroenterol.* – 1992. – 14. – P. S25–S28.
7. Sakiyama S., Perrot M., Han B. et al. Ischemia-reperfusion decreases protein tyrosine phosphorylation and p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation in rat lung transplants // *J. Heart. Lung. Transplant.* – 2003. – 22, No 3. – P. 338–346.
8. Баранская Е. К. Патогенез язвенной болезни // *Рус. мед. журн.* – 2000. – 2, № 2. – С. 29–35.
9. Nomura H., Iwakawa S., Saito Y. et al. Regulation of epidermal growth factor receptors in rat gastric mucosa: effect of gastric ulceration // *J. Pharmacobiodyn.* – 1991. – 14, No 9. – P. 527–531.
10. Tarnawski A., Halter F. J. Cellular mechanisms, interactions, and dynamics of gastric ulcer healing // *Clin. Gastroenterol.* – 1995. – 21. – P. S93–S97.
11. Rozenfurt E., Walsh J. H. Gastrin, Cck, Signaling And Cancer // *Annu. Rev. Physiol.* – 2001. – 63. – P. 49–76.
12. Adhip P. N., Majumdar A. P., Goldenring J. R. Localization and significance of p55, a gastric mucosal membrane protein with tyrosine kinase activity // *Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* – 1998. – 274. – P. G863–G870.
13. Ito S., Lacy E. R., Rutten M. J. et al. Rapid repair of injured gastric mucosa // *Scand. J. Gastroenterol.* – 1984. – 101, No 19. – P. 87–95.
14. Ткач С. М. Сходства и различия ингибиторов протонной помпы: какой препарат считать оптимальным? // *Сучасна гастроентерологія*. – 2003. – 12, № 2. – С. 89–93.
15. Laine L., Ahnen D., McClain C. et al. Review article: potential gastrointestinal effects of long-term acid suppression with proton pump inhibitors // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2000. – 14, No 6. – P. 651–658.

Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 13.09.2006