

МОТОРНА ФУНКЦІЯ ШЛУНКА У ЩУРІВ ПІСЛЯ ТРИВАЛОГО ВВЕДЕННЯ ОМЕПРАЗОЛУ ТА ЇЇ КОРЕКЦІЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКОМ

Київський національний університет імені Тараса Шевченка (м. Київ)

Робота є фрагментом планової теми Навчально-наукового центру «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій», № державної реєстрації 0104U009878.

Вступ. Блокатор протонної помпи омепразол (ОМ) широко використовується для лікування пацієнтів з пептичною виразкою, гастро-езофагальною рефлюксною хворобою і функціональною диспепсією [6]. Патогенез цих кислото-залежних і/або функціональних захворювань проксимального відділу шлунково-кишкового тракту потенційно пов'язаний з порушенням евакуаторної функції шлунка. Ретельний аналіз літератури показав, що інгібітори протонної помпи завжди гальмують евакуацію з шлунка твердої їжі, в той час як їх гальмівний ефект на евакуацію з шлунка рідкої їжі є непостійним [10]. Механізм даного феномену невідомий. Евакуаторна функція шлунка забезпечується зкоординованою моторною активністю гладеньких м'язів шлунка та дванадцятипалої кишки, а також скоротлива активність пілоричного сфінктера. В основі зміни моторної функції шлунка лежить порушення скорочення гладеньких м'язів [1, 2, 3, 4]. Однією з причин зміни скоротливої реакції гладеньких м'язів може бути порушення взаємодії скоротливих білків актину і міозину один з одним.

В зв'язку з наведеним **метою роботи** було дослідити моторну активність та функціональний стан актоміозину гладеньких м'язів шлунка за умов тривалого введення ОМ та корекції виявлених змін мультипробіотиком «Симбітер® ацидофільний» концентрований.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проведені на 30 білих нелінійних щурах, розділених на 3 групи по 10 тварин в кожній. Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Щури I групи слугували контролем, їм упродовж 28 днів щоденно внутрішньоочеревинно (в/о) та перорально (п/о) вводили відповідно 0,2 та 0,5 мл води для ін'єкцій. Щурам II групи упродовж 28 днів щоденно в/о вводили ОМ (0,14 мл/кг). Щурам III групи протягом 28 днів одночасно з ОМ вводили вводили мультипробіотик «Симбітер® ацидофільний» концентрований (0,14 мл/кг, п/о). На 29-й день експерименту тварин наркотизували уретаном (1,1 г/кг, в/о) та досліджували баланографічним методом моторику шлунка. Після 2-х годинного запису моторики щурам в/о вводили стимулятор моторики агоніст ацетилхолінових рецепторів карбахолін в дозі 10 мкг/кг. Виділення актоміозину гладеньких м'язів шлунка проводили за методикою [11]. АТФазну активність актоміозину розраховували за кількістю неорганічного фосфату (Фн), який утворюється при гідролізі АТФ активними центрами міозинових молекул. Кількість Фн визначали за методом Фіске-Суббароу [5]. АТФазну реакцію проводили при 37 °С в інкубаційному середовищі (загальний об'єм проби – 1,8 мл) такого складу: 2,5 мММgCl₂, 0,1 мМСаCl₂, імідазольний буфер 20 мМ, рН 7. 5. Для визначення К⁺(ЕГТА)-АТФазної активності до інкубаційного середовища додавали 1 мМ ЕГТА. Концентрація актоміозину в кінцевому об'ємі реакційної суміші становила 0,28 мг/мл. АТФазну реакцію ініціювали внесенням 1 мМ АТФ до середовища інкубації білка та виражали в нмольФ_n/хв на 1 мг білка.

Статистичну обробку даних проводили з використанням пакету математичних програм Statistic-Soft 6.0. У зв'язку з невеликим об'ємом вибірок, для перевірки розподілу на нормальність було застосовано W тест Шапіро-Вілка. Ймовірність похибки першого роду $\alpha > 0,05$. Оскільки одержані дані були розподілені за нормальним законом, то були використані параметричні методи порівняння вибірок. Для статистичної обробки параметричних даних був використаний t-критерій Стьюдента для незалежних вибірок. Для наших даних ми брали рівень значущості $p < 0,05$. Розраховували середнє значення (M) і стандартну похибку середнього (m).

Результати досліджень та їх обговорення. В результаті досліджень встановлено, що після 28-ми денного введення ОМ частота скорочень в шлунку

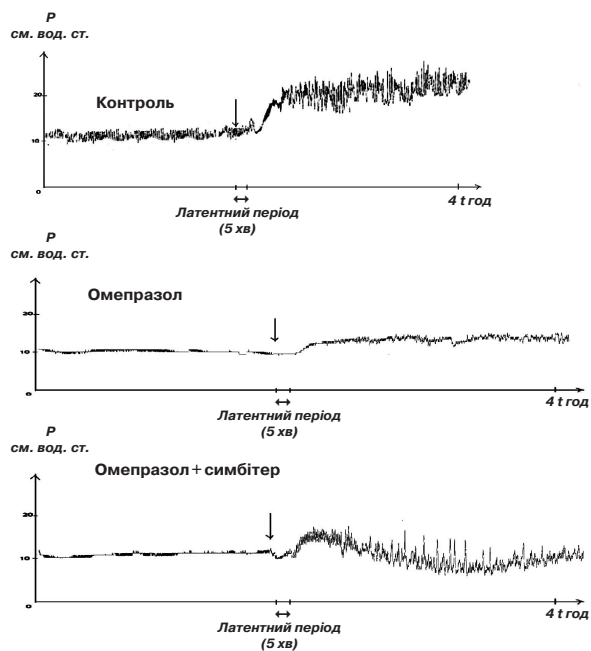


Рис. 1. Оригінальний запис моторної функції шлунка:
 ↓ – введення карбахоліну (1,01 мг/кг)

не змінювалась, проте амплітуда скорочень зменшувалась на 77,7% ($p < 0,001$), а моторна реакція на карбахолін була значно слабшою (рис. 1). Амплітуда скорочень в шлунку, викликаних карбахоліном, у щурів після 28-ми денного введення омепразолу була на 87,9% ($p < 0,001$) меншою, ніж у щурів контрольної групи. Тривале введення Ом призводило до зниження Mg^{2+}, Ca^{2+} -АТФазної та K^+ (EGTA)-АТФазної активності на 61% ($p < 0,05$) та 23% ($p < 0,05$), відповідно (рис. 2, 3).

Після сумісного введення Ом та мультипробіотика «Симбітер®ацидофільний» концентрований нестимульована моторика шлунку була такою ж, як і при введенні одного Ом (рис. 1). Проте, моторна

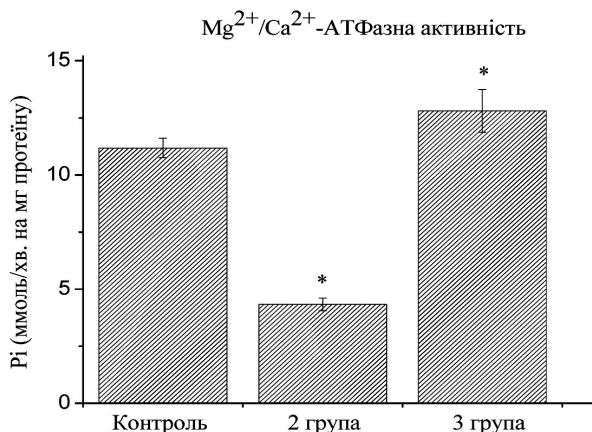


Рис. 2. $Mg^{2+}Ca^{2+}$ -АТФазна активність актоміозину гладеньких м'язів шлунка щурів при тривалому введенні омепразолу та мультипробіотика «Симбітер®ацидофільний» концентрований: $M \pm m$; $n = 10$; * – достовірна різниця відносно контролю при $P < 0,05$.

реакція на карбахолін різко зростала. Одночасне введення Ом та мультипробіотика викликало підвищення як Mg^{2+}, Ca^{2+} -АТФазної, так і K^+ (EGTA)-АТФазної активностей відносно групи тварин, яким вводили лише Ом. При цьому Mg^{2+}, Ca^{2+} -АТФазна активність підвищувалась на 75% порівняно з показником для омепразолу і статистично достовірно не відрізнялась від контрольного значення. Показники K^+ (EGTA)-АТФазної активності в групі тварин, яким сумісно вводили Ом і мультипробіотик, були статистично достовірно більшими як за показники для групи тварин, що отримували лише омепразол (на 65%), так і для контрольної групи (на 45%).

Для виконання механічної роботи м'язом використовується енергія, яка звільняється при гідролітичному розщепленні АТФ в активних центрах міозину. Тому, АТФазна активність актоміозину і міозину є головною їх функціональною характеристикою. Скорочення м'язів пов'язано з циклічною взаємодією голівки міозину з актином, що супроводжується процесом гідролізу АТФ в активному центрі міозину. Внаслідок вивільнення енергії під час гідролізу аденозинтрифосфату відбувається переміщення актинових і міозинових філаментів стосовно один одного. Відомо, що Mg^{2+}, Ca^{2+} -АТФазна активність проявляється при наявності іонів Mg^{2+} та Ca^{2+} в середовищі, які є обов'язковими учасниками м'язового скорочення. Власне, Mg^{2+} -АТФ є субстратом актоміозинової АТФази, а в присутності Ca^{2+} така АТФазна активність значно збільшується [9]. При відсутності двовалентних катіонів, що досягається введенням в розчин EGTA, актоміозинова АТФаза активується одновалентними катіонами K^+, NH_4^+, Rb^+ . Така активність АМ отримала назву K^+ (EGTA)-АТФазної активності. Іони K^+, NH_4^+, Rb^+ , на відміну від двовалентних катіонів, зменшують здатність міозину зв'язувати АТФ. K^+ -АТФазна активність, як вважають деякі автори [11], являє релаксуючу АТФ-азну активність у

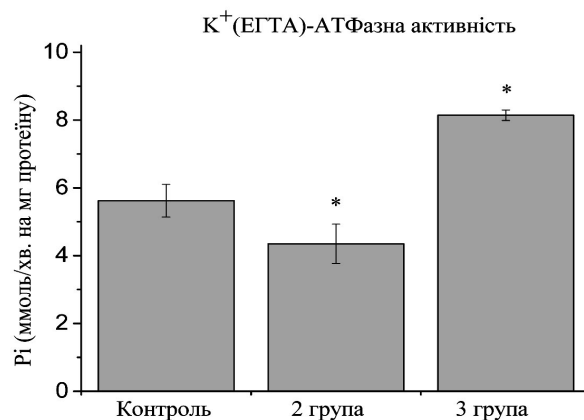


Рис. 3. K^+ -АТФазна активність актоміозину гладеньких м'язів шлунка щурів при тривалому введенні омепразолу та мультипробіотика «Симбітер®ацидофільний» концентрований: $M \pm m$; $n = 10$; * – достовірна різниця відносно контролю при $P < 0,05$.

відсутності двовалентних катіонів. АТФазна реакція чутлива до дії багатьох фізико-хімічних факторів, що можуть впливати як на регуляцію взаємодії скоротливих білків, так і безпосередньо на їх структуру. Однаковий напрям змін Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазної та K^+ (EGTA)-АТФазної активностей – зменшення при прийомі омепразолу і збільшення при сумісному введенні ОМ та мультипробіотика «Симбітер® ацидофільний» концентрований вказують на зміни, що виникають в скоротливих білках, наприклад, їх окисну модифікацію.

Крім того слід зазначити, що, гідроліз АТФ в циклі взаємодії актину з міозином супроводжуються послідовними структурними переходами в обох білках [7]. У відсутності АТФ і/або присутності АДФ, головка міозину утворює міцний і добре впорядкований комплекс з актином. Зв'язування АТФ з міозином послаблює зв'язок актину з міозином і, відповідно, веде до утворення комплексу з менш упорядкованою структурою. Вивільнення фосфату (Фн) від міозину генерує силу і ініціює новий цикл скорочення [8, 12]. Зниження АТФазної активності і, відповідно, сили скорочення гладеньких м'язів під впливом омепразолу можна пояснити тим, що система перебуває переважно у стані слабкої взаємодії між скоротливими білками і/або міцний зв'язок послаблюється. Мультипробіотик «Симбітер® ацидофільний» концентрований спричиняє стимулюючий вплив на показники перехідних станів актоміозинового комплексу, тим самим збільшуючи скоротливу активність гладеньких м'язів шлунку.

Таким чином, зниження моторики шлунку може бути пов'язаним з порушенням функціонування основного скоротливого компонента гладеньких м'язів – актоміозину. Зміни, що в виникають в скоротливих білках під впливом довготривалого прийому ОМ, ведуть до зниження АТФазної активності актоміозину, що позначається на функціонуванні

м'язів. Застосування мультипробіотика «Симбітер® ацидофільний» концентрований, ймовірно, справляє стимулюючий вплив на взаємодію між актином і міозином, тим самим збільшуючи скоротливу активність гладеньких м'язів шлунку, що позначається на його моториці.

Висновки.

1. Пригнічення шлункової секреції омепразолом упродовж 28-ми днів не впливає на частоту скорочень в шлунку, проте зменшує амплітуду їх скорочень на 77,7% ($p < 0,001$) та на 87,9% ($p < 0,001$) послаблює амплітуду скорочень, викликаних карбахоліном.

2. Тривале введення омепразолу призводило до зниження Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазної та K^+ (EGTA)-АТФазної активності актоміозину гладеньких м'язів шлунку щурів на 61% ($p < 0,05$) та 23% ($p < 0,05$), відповідно.

3. Після 28-ми денного сумісного введення омепразолу та мультипробіотика «Симбітер® ацидофільний» концентрований нестимульована моторика шлунку була такою ж, як і при введенні одного омепразолу. Проте, моторна реакція на карбахолін зростала на 228% ($p < 0,001$) та підвищувались Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазна і K^+ (EGTA)-АТФазної активності актоміозину гладеньких м'язів шлунка.

Перспективним напрямком подальших досліджень є з'ясування ефективності застосування мультипробіотика «Симбітер® ацидофільний» концентрований як засобу корекції порушення моторно-евакуаторної функції шлунку у хворих з гіпоацидністю шлункового соку та у хворих, яким тривало призначають омепразол (хворі з гастро-езофагальною рефлюксною хворобою; хворі з ерозивно-виразковими ураженнями шлунково-кишкового тракту, викликані нестероїдними протизапальними засобами та ін.).

Література

1. Ading and gastrointestinal neuromuscular function: insight from within and outside the gut / [Bitar K. N., Greenwood-Van B., Saad R., Wiley J. W.]. – Neurogastroenterol. Motil. – 2011. – Vol. 23. – P. 490-501.
2. Aging-related alterations in the contractile responses to acetylcholine, muscarinic cholinergic receptors and cholinesterase activities in jejunum and colon of the male Fischer 344 rats / [Tezuka A., Ishihata A., Aita T., Katano Y.]. – Exp. Gerontol. – 2004. – Vol. 39. – P. 91–100.
3. Aging-related changes of intracellular Ca^{2+} stores and contractile response of intestinal smooth muscle / [Lopes G. S., Ferreira A. T., Oshiro M. E. et al.]. – Exp. Gerontol. – 2005. – Vol. 40. – P. 543-549.
4. Bitar K. N. Aging and Gi smooth muscle fecal incontinence: is bioengineering an option / K. N. Bitar // Exp. Gerontol. – 2005. – Vol. 40. – P. 643–649.
5. Fiske C. The colorimetric determination of phosphorus / C. Fiske, Y. J. Subbarow // Biol. Chem. – 1925. – Vol. 66. – P. 375-400.
6. Kamiya T. The effect of omeprazole on gastric myoelectrical activity and emptying / Kamiya T., Shikano M., Tanaka M. [et al.] // J. Smooth. Muscle Res. – 2011. – Vol. 47, №3-4. – P. 79-87.
7. Levitsky D. I. Actomyosin systems of biological motility / D. I. Levitsky // Biochemistry Mosc. – 2004. – Vol. 69, №11. – P. 1177–1189.
8. Prochniewicz E. Structural dynamics of actin during active interaction with myosin: different effects of weakly and strongly bound myosin heads / E. Prochniewicz, T. F. Walseth, D. D. Thomas // Biochemistry. – 2004. – Vol. 43. – P. 10642–10652.
9. Reisler E. Role of magnesium binding to myosin in controlling the state of cross-bridges in skeletal rabbit muscle / E. Reisler, J. Liu, P. Cheung // Biochemistry. – 1983. – Vol. 22. – P. 4954–4960.
10. Sanaka M. Effects of proton pump inhibitors on gastric emptying: a systematic review / M. Sanaka, T. Yamamoto, Y. Kuyama // Dig. Dis. Sci. – 2010. – №55, №9. – P. 2431-2440.

-
-
11. Sobieszek A. Preparation and properties of vertebrate smooth-muscle myofibrils and actomyosin / A. Sobieszek, R. Bremel // Eur. J. Biochem. – 1975. – Vol. 55. – С. 49–60.
12. Thomas D. D. Changes in actin and myosin structural dynamics due to their weak and strong interactions / D. D. Thomas, E. Prochniewicz, O. Roopnarine // Results Probl. Cell. Differ. – 2002. – Vol. 36. – P. 7–19.

УДК 591. 1+577. 353

МОТОРНА ФУНКЦІЯ ШЛУНКА У ЩУРІВ ПІСЛЯ ТРИВАЛОГО ВВЕДЕННЯ ОМЕПРАЗОЛУ ТА ЇЇ КОРЕКЦІЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКОМ

Пилипенко С. В., Шелюк О. В., Цейслер Ю. В., Нурищенко Н. Є., Берегова Т. В., Янковський Д. С.

Резюме. Досліджено моторну функцію шлунка (Ш) у щурів за умов тривалого введення блокатора H^+K^+ -АТФази омепразолу (ОМ) та корекції мультипробіотиком «Симбітер[®] ацидофільний» концентрований (С). Показано, що після 28-ми денного введення ОМ частота скорочень в Ш не змінювалась, проте амплітуда скорочень зменшувалась, а моторна реакція на карбохолін була значно слабшою. Ці зміни супроводжувались зниженням Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазної та K^+ (EGTA)-АТФазної активності актомиозину гладеньких м'язів Ш. Після сумісного введення ОМ та С нестимульована моторика Ш була такою ж, як і при введенні одного ОМ. Проте, моторна реакція на карбохолін різко зростала. При цьому Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазна активність підвищувалась порівняно з показником для ОМ і майже не відрізнялась від контролю. Показники K^+ (EGTA)-АТФазної активності були більшими у порівнянні з групою тварин, що отримували лише ОМ та з контролем. Таким чином, під впливом С відновлюється АТФазна активність актомиозину, що позначається, на моторній функції Ш через збільшення скоротливої активності гладеньких м'язів.

Ключові слова: моторика, шлунок, омепразол, актомиозин, мультипробіотик.

УДК 591. 1+577. 353

МОТОРНАЯ ФУНКЦИЯ ЖЕЛУДКА У КРЫС ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ОМЕПРАЗОЛА И ЕЕ КОРРЕКЦИЯ МУЛЬТИПРОБИОТИКОМ

Пилипенко С. В., Шелюк О. В., Цейслер Ю. В., Нурищенко Н. Е., Береговая Т. В., Янковский Д. С.

Резюме. Исследовано моторную функцию желудка у крыс в условиях длительного введения блокатора H^+K^+ -АТФазы омепразола (ОМ) и коррекции мультипробіотиком «Симбітер[®] ацидофильный» концентрированный. Показано, что после 28-ми дневного введения омепразола частота сокращений в желудке не изменялась, однако амплитуда сокращений уменьшалась, а моторная реакция на карбохолин была значительно слабее. Эти изменения сопровождались снижением Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазной и K^+ (EGTA)-АТФазной активности актомиозина гладких мышц желудка. После совместного введения ОМ и мультипробіотика нестимулированная моторика желудка была такой же, как и при введении одного ОМ. Однако, моторная реакция на карбохолин резко возрастала. При этом Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазная активность повышалась по сравнению с показателем для ОМ и статистически не отличалась от контрольного значения. Показатели K^+ (EGTA)-АТФазной активности в этой группе животных, были статистически большими как относительно показателей группы животных, получавших только ОМ, так и контрольной группы. Таким образом, под влиянием мультипробіотика восстанавливается АТФазная активность актомиозина, что сказывается, вероятно, на моторной функции желудка из-за увеличения сократительной активности гладких мышц.

Ключевые слова: моторика, желудок, омепразол, актомиозин, мультипробіотик.

UDC 591. 1+577. 353

Motor Function of Stomach in Rats after Long-Term Omeprazole Injection and its Correction with Multiprobiotic

Pylypenko S. V., Shelyuk O. V., Tseysler Yu. V., Nuryschenko N. E., Bereгова T. V., Yankovskyi D. S.

Summary. Motor function of rats stomach was investigated under long term injection of H^+K^+ -ATPase blocker (omeprazole) and multiprobiotic «Symbiter[®] acidophilic» concentrated (Symbiter) for pathological state correction.

Experiments have been carried out on nonlinear rats that were divided into 3 groups. Animals of Ist group were control, they intraperitoneally (i. p.) and per os (p. o.) got correspondently 0. 2 and 0. 5 ml water for injections every day during 28 days. Rats of IInd group were i. p. injected with omeprazole (0. 14 mg/kg). Rats of IIIrd group simultaneously got i. p. omeprazole and p. o. Symbiter. At 29th day all rats were narcotized with urethane (1. 1. g/kg, i. p.) and gastric motility was measured by balloonographic method. Carbacholine (stimulator of motility, acetylcholine receptor agonist) was administrated after 2 hours of gastric motility registration. Actomyosin of smooth muscles was obtained by Sobieszek (1975) method. Actomyosin ATP activity was calculated by the number of inorganic phosphate (Pi) that was formed due to ATP hydrolysis by active sites of myosin. The amount of Pi was calculated by Fiske and SubbaRow method (1925). ATP reaction was conducted at 37°C in incubation medium (total sample volume was 1. 8 ml). Medium consisted of: 2. 5 mM $MgCl_2$, 0. 1 mM $CaCl_2$, imidazole buffer 20 mM, pH

7.5.1 mM of EGTA was added to incubation medium to determine K⁺(EGTA)-ATP activity. Actomyosin concentration in final volume of reaction mixture was 0.28 mg/ml. ATP reaction was initiated by application of 1 mM of ATP to protein incubation medium, results were represented in nmolPi/min per 1 mg of protein.

It was established that after 28 days of omeprazole injection frequency of gastric contraction didn't change, amplitude of contractions decreased by 77.7% ($p < 0.05$) and amplitude of carbacholine induced gastric contraction decreased by 87.9% ($p < 0.001$). Also Mg²⁺, Ca²⁺-ATP and K⁺(EGTA)-ATP activities of smooth muscles actomyosin were decreased by 61% ($p < 0.05$) and 23% ($p < 0.05$) correspondently. In case of simultaneous omeprazole and multiprobiotic injection unstimulated gastric motility was the same as after single omeprazole administration, but carbacholine stimulated motility increased by 223% ($p < 0.001$). Simultaneous omeprazole and multiprobiotic injection increased Mg²⁺, Ca²⁺-ATP and K⁺(EGTA)-ATP activities compared to single omeprazole injection. Mg²⁺, Ca²⁺-ATP and K⁺(EGTA)-ATP activities increased by 75% ($p < 0.05$) in comparison with omeprazole and didn't significantly differ from control. In group that got omeprazole and multiprobiotic simultaneously K⁺(EGTA)-ATP activities increased by 65% in comparison with group of omeprazole and by 45% compared to control.

Thus, decrease of gastric motility after long-term injection of omeprazole may be closely connected with functional disturbance of main contractile smooth muscle component – actomyosin. Changes in contractile protein, caused by long-term omeprazole injection, leads to decrease of actomyosin ATP activity, that affects the functioning of the muscles. Multiprobiotic “Symbiter © acidophilic” concentrated consumption probably has stimulating effect on the interaction between actin and myosin, thus increasing the contractile activity of gastric smooth muscle that affects gastric motility.

Key words: motility, stomach, omeprazole, actomyosin, multiprobiotic.

*Рецензент – проф. Непорада К. С.
Стаття надійшла 12.08.2013 р.*