



УДК 616.33-002-092

© 2007

О. В. Богданова, Л. І. Кузьменко, Л. І. Остапченко, академік  
НАН України **М. Є. Кучеренко**

### Активність тирозинових протеїнфосфатаз у клітинах слизової оболонки шлунка за умов стрес-індукованих виразкових уражень

*Protein tyrosine phosphatase activities in plasma membranes and cytosol of stomach mucosa cells of rats are studied under conditions of stress-induced gastric lesions development and during the first – fifth days of their recovering. A significant decrease in protein tyrosine phosphatase activities is established. The treatment with omeprazole, a proton pump inhibitor with antioxidant features, caused the stabilizing result only immediately after stressing.*

Слизова оболонка шлунка (СОШ) є однією з найбільш швидко оновлюваних тканин організму. Так, клітинний склад у поверхневому шарі повністю замінюється протягом трьох діб [1]. Клітини слизового епітелію постійно злуцуються у просвіт шлунка. Для того щоб підтримувати високий темп оновлення, клітини слизової володіють потужним регенераційним потенціалом. Процеси фізіологічної регенерації у СОШ забезпечуються підвищеною експресією ростових факторів — епідермального фактора росту, судинного ендотеліального ростового фактора (VEGF), трансформувальних факторів росту- $\alpha$  й - $\beta$  (TGF- $\alpha$ , - $\beta$ ), інсулінового ростового фактора (IGF), фактора росту фібробластів (bFGF), ростового фактора тромбоцитарного походження (PDGF), фактора росту гепатоцитів (HGF), кишково-трефоїлового фактора (ITF) тощо. Оскільки більшість рецепторів ростових цитокінів є тирозиновими протеїнкіназами, роль цих ферментів у регуляції процесів фізіологічної регенерації на сьогодні є достатньо добре вивченою [2]. Показано, що ТПК-азна активність у клітинах СОШ в 20–40 разів вища, ніж у клітинах печінки і підшлункової залози [3]. Однак протягом останніх років у сучасній літературі широко дискутується участь тирозинових протеїнфосфатаз, ТПФ-аз у регуляції проходження зовнішньоклітинного сигналу [4]. Головна регуляторна функція тирозинових протеїнфосфатаз полягає у дефосфорилуванні модифікованих тирозиновими протеїнкіназами білків. Крім того, завдяки утворенню надмолекулярних комплексів з субстратами або іншими ТПФ-азами (у випадку трансмембранних білків) та можливій рецепторній активності глікозилізованих зовнішньоклітинних доменів, ферменти приймають участь у алостеричній регуляції сигнальних каскадів.

Відомо кілька ТПФ-аз у клітинах СОШ. ТПФ-аза 1В активує кіназу src родини, сприяючи утворенню структур фокальної адгезії між клітинами слизової. При цьому дефосфорилювання ефекторних кіназ іншою ТПФ-азою PTEN може пригнічувати рухливість клітин [5]. Ця ТПФ-аза здатна дефосфорилювати як фосфатидилінозитолтрифосфат, так і фосфотирозин, та є акцептором для адапторного білку Shc, який зв'язується з інтегриновими комплексами та інгібує ERK-MAP-кіназні стимули. Також відома рецепторна ТПФ-аза SAP-1 (stomach cancer-associated protein-tyrosine phosphatase-1), яка активується в клітинах СОШ і інгібує інтегринові сигнали, дефосфорилюючи білки фокальної адгезії [6]. Показано, що при канцерогенезі у шлунку відбувається надлишкова експресія ТПФ-ази SAP-1 [7].

Одним з поширених патологічних станів, який супроводжується розбалансуванням між процесами регенерації та елімінації клітин, є виразкова хвороба шлунка. Дослідження тирозинпротеїнкіназної активності в клітинах СОШ за умов розвитку цього патологічного стану показали залучення цих ферментів у відновлювальні процеси в слизовій [8, 9]. Метою нашої роботи було з'ясування ролі тирозинових протеїнфосфатаз у процесах розвитку та відновлення виразкових дефектів СОШ, індукованих стресовим фактором. Для виконання поставленої мети нами було досліджено активність ТПФ-аз у фракціях плазматичних мембран і цитозолі клітин слизової оболонки шлунка за умов розвитку стресової виразки та на ранніх етапах загоєння (0–5 доба) в експериментальній моделі, а також визначено ці показники за умов введення омепразолу — інгібітора секреції соляної кислоти.

**Матеріали та методи.** Досліди було проведено на самцях білих нелінійних щурів масою 200–250 г. Експериментальну виразку шлунка у піддослідних тварин викликали аналогічно методу роботи [10] за допомогою холодового стресу. Модель стрес-індукованих виразкових уражень створювали витримуванням імобілізованих тварин 3,5 год при 4 °С. Розчин омепразолу в фізіологічному розчині вводили внутрішньочеревно у дозі 0,8 мг/кг один раз на добу протягом 0–5 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 [10]) та гістологічно.

Після видалення СОШ гомогенізували у середовищі 0,14 М NaCl. Отриманий гомогенат використовували для очищення фракцій плазматичних мембран та цитозолу методом диференціального центрифугування на градієнті 30% сахарози ( $\rho = 1,127$ ) [11]. Всі процедури виділення здійснювали при 4 °С. Вимірювання ферментативної активності проводили відразу та протягом 1–5 діб після виразкоутворення, з огляду на зникнення видимих виразкових дефектів СОШ. Активність ферментів визначали методом імуноферментного 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 та їх обговорення.** Процес дефосфорилювання можна розглядати як універсальний механізм регуляції життєдіяльності клітини. ТПФ-ази є гетерогенною родиною мембранозв'язаних та цитозольних ферментів, що здійснюють дефосфорилювання специфічних сайтів у білках-мішенях, модулюючи їх залучення до сигнальних подій. З метою визначення функціонального стану ферментів дефосфорилювання за умов розвитку та ранніх етапів загоєння виразкової хвороби було досліджено ТПФ-азну активність у фракціях плазматичних мембран і цитозолі клітин СОШ.

Встановлено, що процес виразкоутворення пов'язаний зі зменшенням ТПФ-азної активності в усіх досліджуваних фракціях (табл. 1). Найбільш суттєве зниження ферментативної

Таблиця 1. Тирозинпротеїнфосфатазна активність пмоль  $\Phi_n$ /хв·мг білка у плазматичних мембранах та цитозолі клітин слизової оболонки шлунка щурів за умов експериментальної моделі стресової виразки ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

Джерело ферментативної активності	Експериментальний стан тварин						
	Контроль	Доба після виразкоутворення					
		0	1	2	3	4	5
Плазматичні мембрани	41,338 ± 5,37	13,763 ± 1,23*	21,617 ± 2,16*	28,12 ± 3,37*	26,452 ± 2,91*	28,6 ± 3,43*	18,407 ± 1,84*
Цитозоль	42,995 ± 5,60	12,998 ± 1,04*	17,82 ± 1,61*	20,507 ± 2,47*	19,27 ± 2,12*	18,167 ± 1,82*	18,243 ± 1,82*

\* $p \leq 0,05$  порівняно з контролем.Таблиця 2. Тирозинпротеїнфосфатазна активність пмоль  $\Phi_n$ /хв·мг білка у плазматичних мембранах та цитозолі клітин слизової оболонки шлунка щурів за умов експериментальної моделі стресової виразки на тлі введення омепразолу ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

Джерело ферментативної активності	Експериментальний стан тварин						
	Контроль (без препарату)	Доба після виразкоутворення					
		0	1	2	3	4	5
Плазматичні мембрани	41,338 ± 5,37	20,448 ± 2,04*	22,705 ± 2,27*	22,332 ± 2,23*	16,85 ± 1,35*	20,848 ± 2,08*	25,438 ± 2,80*
Цитозоль	42,995 ± 5,60	22,225 ± 2,22*	17,155 ± 1,37*	19,032 ± 1,71*	20,128 ± 1,81*	13,912 ± 1,11*	29,863 ± 3,58*

\* $p \leq 0,05$  порівняно з контролем.Таблиця 3. Тирозинпротеїнфосфатазна активність пмоль  $\Phi_n$ /хв·мг білка у плазматичних мембранах та цитозолі клітин слизової оболонки шлунка щурів на тлі введення омепразолу ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

Джерело ферментативної активності	Експериментальний стан тварин						
	Контроль (без препарату)	Доба введення препарату					
		0	1	2	3	4	5
Плазматичні мембрани	41,338 ± 5,37	33,61 ± 4,03	30,288 ± 3,63*	31,128 ± 3,74*	28,63 ± 3,44*	21,847 ± 2,18*	22,138 ± 2,21*
Цитозоль	42,995 ± 5,60	22,82 ± 2,28*	16,462 ± 1,32*	21,438 ± 2,15*	20,392 ± 1,84*	15,307 ± 1,22*	16,25 ± 1,3*

\* $p \leq 0,05$  порівняно з контролем.

активності спостерігалось відразу після холодового стресу (у 2,5 раза у фракціях плазматичних мембран і 3 рази — у цитозолі), першу добу (у 1,9 раза у фракціях плазматичних мембран і 2,5 — в цитозолі) і п'яту добу в фракціях плазматичних мембран (у 2,3 раза) після виразкоутворення. Значення ТПФ-азної активності у інші терміни досліджень залишалися нижче контрольного рівня. Таким чином, отримані результати свідчать про значну інактивацію як мембранозв'язаних, так і цитозольних ТПФ-аз на ранніх етапах розвитку та загоєння (0–5 доба) стрес-індукованої виразки шлунка.

Встановлене нами зниження активності ТПФ-аз може бути наслідком окиснення амінокислотних залишків в активному центрі ферментів активними формами кисню [12, 13], які утворюються у надвеликих концентраціях під час стрес-індукованої запальної реакції у процесі виразкоутворення. Крім того, відбувається нітрозилювання активних центрів ТПФ-аз пероксинітрином, який може утворюватись при взаємодії оксиду азоту, синтезованого індукцією NO-синтазою з гідроксил-радикалом [14] за умов розвитку виразкових уражень слизової шлунка.

Індукована катехоламінами ішемія тканин шлунка та пов'язаний з нею викид медіаторів запальної реакції призводить до генерації активних форм кисню, оксидативного та нітрозативного стресу. Це, поряд з гіперсекрецією соляної кислоти та послабленням факторів захисту, є одним з основних механізмів розвитку виразкових уражень тканин шлунка за умов стресового впливу. Одними з найбільш відомих противиразкових препаратів є лікарська група необоротних селективних інгібіторів протонної помпи: омепразол, лансопризол та ін. Вивчення молекулярних механізмів дії вищевказаних речовин є актуальним в сучасних експериментальних дослідженнях [15]. Відомо, що введення омепразолу у дозах, які не знижували секреторну активність шлунка, значно зменшує виразкоутворення за умов холодового стресу [10]. Дослідженнями механізмів такого ефекту доведено, що омепразол демонструє антиоксидантні властивості, зменшуючи кількість продуктів ПОЛ, ушкодження ДНК, частоту апоптозу [10]. Встановлене нами значне інгібування ТПФ-аз після формування виразки шлунка, можливо, є наслідком інактивації реакційно активними вільними радикалами, тому для нас було цікавим дослідити активність цих ферментів за умов введення омепразолу у терапевтичних дозах.

Показано, що за умов введення тваринам омепразолу (табл. 2), також відбувається зниження активності тирозинових протеїнфосфатаз після стресогенного впливу, проте менш виражене (у плазматичних мембранах у 2 рази, у цитозолі в 1,9 раза). Це може бути пов'язано з одного боку, з гастропротективними властивостями відповідної речовини, а з іншого — проявом антиоксидантної активності препарату. Особливо виражений ефект інгібування активності спостерігався на третю добу для мембранозв'язаних ТПФ-аз (у 2,45 раза) та на четверту добу для цитозольних форм (у 3,1 раза). Таким чином, за умов введення омепразолу піддослідним тваринам спостерігався незначний та нетривалий (лише відразу після формування стресової виразки) стабілізуючий ефект на активність тирозинових протеїнфосфатаз в клітинах СОШ.

При введенні препарату тваринам, які не підлягали стресовому впливу через 40 хв після введення не спостерігалось значимого зниження активності ТПФ-аз в плазматичних мембранах клітин СОШ. У цитозолі при цьому встановлено зменшення досліджуваної ферментативної активності у 1,9 раза (табл. 3). На більш пізніх строках дослідження спостерігалось поступове зниження активності ТПФ-аз, особливо їх цитозольних форм.

Оскільки за фізіологічних умов у клітині генерується певний рівень активних форм кисню, деякі з яких є месенджерними молекулами (оксид азоту, пероксид водню), можна

припустити, що за відсутності ушкоджувального фактора введення омепразолу створює перешкоди для нормального проходження ростових та інших зовнішньоклітинних сигналів, що й зумовлює виключення тирозинових протеїнфосфатаз з ланцюгів сигнальних подій. З іншого боку, омепразол є блокатором протонної помпи, що створює перешкоди для нормального іонного обміну між клітиною та зовнішнім середовищем та змінює клітинний метаболізм. За таких умов клітина не здатна адекватно реагувати на проліферативні сигнали, які регульовані родиною ТПФ-аз, тому можна припустити, що введення омепразолу негативно впливає на процеси фізіологічної регенерації клітин СОШ.

Таким чином, дослідження активності ТПФ-аз у клітинах СОШ за умов виникнення та на ранніх етапах загоєння стрес-індукованих виразкових дефектів СОШ дозволили встановити, що розвиток такого патологічного стану призводить до значної інактивації досліджуваних ферментів. Активність ТПФ-аз залишалася зниженою протягом усього терміну дослідження (0–5 діб після виразкоутворення), незважаючи на зникнення макроскопічних дефектів слизової. Введення противиразкового препарату, омепразолу (блокатора протонної помпи з антиоксидантними властивостями), мало стабілізуючий ефект лише відразу після формування виразок, що свідчить про необхідність комбінованої терапії виразкової хвороби.

1. *Wong W. M., Wright N. A.* Cell proliferation in gastrointestinal mucosa // *J. Clin. Path.* – 1999. – **52**. – P. 321–333.
2. *Glenney J. R.* Tyrosine-phosphorylated proteins: mediators of signal transduction from tyrosine kinases // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1992. – 1134. – P. 113–127.
3. *Schlessinger J.* Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases // *Cell.* – 2000. – **103**. – P. 211–225.
4. *Petrone A., Sap J.* Emerging issues in receptor protein tyrosine phosphatase function: lifting fog or simply shifting? // *J. Cell Sci.* – 2000. – **113**. – P. 2345–2354.
5. *Tamura M., Gu J., Takino T., Yamada K. M.* Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130 Cas // *Cancer Research.* – 1999. – **59**. – P. 442–449.
6. *Takada T., Noguchi T., Inagaki K. et al.* Induction of Apoptosis by Stomach Cancer-associated Protein-tyrosine Phosphatase-1 // *Biol. Chem.* – 2002. – **277**, No 37. – P. 34359–34366.
7. *Matozaki T., Suzuki T., Uchida T. et al.* Molecular cloning of human transmembrane-type protein tyrosine phosphatase and its expression in gastrointestinal cancers // *J. Biol. Chem.* – 1994. – **269**, No 3. – P. 2075. – 2081.
8. *Bogdanova O., Kuzmenko L., Prokopova K. et al.* Activity of protein tyrosine phosphorylation enzymes in stomach mucosa cells of rats with stress induced gastric lesions // *Proc. Phys. Soc.* 2006. – Main Meeting. – Univ. College London, 5th – 7th July 2006. – London, Great Britain. – P. 193.
9. *Ковальова В. А.* Вплив пероксидації ліпідів на стан мембран клітин слизової оболонки шлунка щурів за умов експериментальної виразки: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.04 / Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка. – Київ, 2005. – 35 с.
10. *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.
11. *Рибальченко В. К., Коганов М. М.* Структура и функции мембран. – Киев: Вища шк. – 1988. – С. 79–83.
12. *Tonks N. K.* Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling // *Cell.* – 2005. – **121**, No 5. – P. 667–670.
13. *Yilmaz M., Kucseoplu M., Akalin N. et al.* Role of free radicals in peptic ulcer and gastritis // *Turk J. Gastroenterol.* – 2003. – **14**, No 1. – P. 39–43.
14. *Lopez C. J., Qayyum I., Mishra O. P. et al.* Effect of nitration on protein tyrosine phosphatase and protein phosphatase activity in neuronal cell membranes of newborn piglets // *Neurosci. Lett.* – 2005. – **386**, No 2. – P. 78–81.

15. Гришук В. М., Вороніна О. К., Дзержинський Е. М. Динаміка змін у слизовій оболонці шлунка щурів при гіпергастринемії різної тривалості // Біологічні дослідження молодих вчених на Україні: Матеріали VI Всеукр. наук. конф. студентів та аспірантів (Київ, 21–22 верес., 2006). – Київ, 2006. – С. 68–69.

Київський національний університет  
ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 13.12.2006

УДК 612.453:612.433.451:612.015.1

© 2007

О. І. Ковзун

## Участь протеїнкіназ, що активуються мітогенами, і фактора транскрипції AP-1 в перенесенні регуляторного сигналу кортикотропіну в адренокортикоцитах щурів

(Представлено членом-кореспондентом НАН України М. Д. Троньком)

*The messenger mechanisms mediating corticotropin regulatory signals in adrenal cortex are studied. We have measured the secretion of corticosteroids, levels of ERK1/2, JNK, p38 mitogen-activated protein kinases, and transcription factors c-jun and c-fos in adrenal cortex of rats after the corticotropin treatment. ACTH increased the ERK1/2 level by a factor of 1.5 in adrenocortical tissue. The level of ERK1/2 was decreased in 6 h after the corticotropin injection. ACTH influence on the JNK level is very significant. The protein kinase JNK level was 2 times higher after 1 h and decreased after 6 h of the corticotropin treatment. The level of p38 kinase was not changed under these conditions. The role of the transcription factor AP-1, which includes the c-fos and c-jun factors, attracts attention in realization of corticotropin signal transduction. C-jun was increased 2-fold by 1 h, and c-fos was increased 1.7-fold after 6 h of ACTH treatment. Together these findings suggest that JNK kinase and the transcriptional factor c-jun mediate the fast corticotropin signal transduction in adrenocorticoytes.*

Кортикотропін (АКТГ) є основним регулятором ендокринної активності та росту надниркових залоз. Зв'язуючись з рецепторами, які асоційовані з  $G_s$ -білками, він активує аденілатциклазу, що призводить до збільшення внутрішньоклітинного рівня сАМР та активації протеїнкінази А (ПКА) [1, 2]. Дослідження адренокортикальних неоплазій дозволило виявити велику кількість сигнальних шляхів, змінених порівняно до нормальної тканини кори надниркових залоз. Хоча трансдукція сигналу кортикотропіну в корі надниркових залоз є необхідною для забезпечення адренокортикальної функції і опосередковується здебільшого сАМР-залежною ПКА, існує припущення, що цей шлях перенесення сигналу може водночас призводити до пригнічення росту адренокортикальної пухлини.

Останнім часом одержано чіткі дані про те, що дія АКТГ опосередковується не тільки сАМР і протеїнкіназою А, кортикотропін запускає розгалужену систему трансдукції сигналу, окремі компоненти якої взаємодіють на різних етапах [3]. Він здатен активувати інші