

УДК 577.21

ВЛИЯНИЕ ОМЕПРАЗОЛА НА ОСТЕОБЛАСТЫ И ОСТЕОКЛАСТЫ *in vivo* И В МОДЕЛИ *in vitro* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЧЕШУИ РЫБЫ

© 2021 M.I. Zanaty¹, A. Abdel-Moneim^{2*}, Y. Kitani³, T. Sekiguchi³, N. Suzuki³

¹ Biotechnology and Life Sciences Department, Faculty of Postgraduate Studies for Advanced Sciences, Beni-Suef University, 62511 Beni-Suef, Egypt

² Molecular Physiology Division, Faculty of Science, Beni-Suef University, 62511 Beni-Suef, Egypt; e-mail: adel_men2020@yahoo.com

³ Noto Marine Laboratory, Division of Marine Environmental Studies, Institute of Nature and Environmental Technology, Kanazawa University, Noto-Cho, 927-0553 Ishikawa, Japan

Поступила в редакцию 10.02.2021

После доработки 27.05.2021

Принята к публикации 06.08.2021

Омепразол подавляет чрезмерную секрецию кислоты желудочного сока за счет необратимого ингибирования H^+/K^+ -АТФазы в париетальных клетках желудка. Проведенный недавно метаанализ данных выявил связь между применением ингибиторов протонной помпы и повышенным риском переломов костей, однако молекулярный механизм, лежащий в основе такого действия ингибиторов, остается неизвестен. В настоящем исследовании мы продемонстрировали прямое влияние омепразола на метаболизм костей, используя уникальную *in vitro* модель с применением чешуи костистой рыбы, а также путем *in vivo* исследований на рыбках *Carassius auratus*. Исследование *in vitro* показало, что 6-часовая инкубация с омепразолом приводит к значительному усилению активности щелочной фосфатазы и тартрат-резистентной кислой фосфатазы. Экспрессия мРНК нескольких маркеров остеокластов повышалась после 3-часовой инкубации рыбьей чешуи с омепразолом в концентрации 10^{-7} М. В экспериментах *in vivo* было продемонстрировано значительное повышение уровня кальция в плазме *Carassius auratus* под действием омепразола. Результаты исследований *in vitro* и *in vivo* позволяют предположить, что омепразол влияет на костные клетки, усиливая резорбцию костной ткани путем регуляции экспрессии генов остеокластов, а также способствуя высвобождению кальция в кровоток. Предлагаемый анализ *in vitro* с использованием рыбьей чешуи представляет собой практическую модель, которая может быть применена для исследования воздействия лекарственных препаратов на метаболизм костей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: омепразол, чешуя рыбы, гены транскрипционных факторов, гены остеокластов.

DOI: 10.31857/S032097252110002X

ВВЕДЕНИЕ

Ингибиторы протонной помпы (ИПП) – это группа препаратов, обычно используемых для лечения кислотозависимых заболеваний желудочно-кишечного тракта, таких как пептические язвы и гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (ГЭРБ), а также для предотвращения рецидивов язвы, связанных с приемом аспири-

на/нестероидных противовоспалительных препаратов [1]. Омепразол был первым ИПП, появившимся на рынке фармакологических препаратов этой группы. Он приводит к уменьшению секреции кислоты желудочного сока путем избирательного ингибирования H^+/K^+ -АТФазы в париетальных клетках желудка и снижения переноса H^+ в полость желудка [2].

Эпидемиологические исследования показали наличие связи между длительным применением ИПП и метаболизмом костей [3]. Было обнаружено, что ИПП могут приводить к повышению риска переломов костей, особенно бедер, запястий и позвоночника [4]. Ежегодно во всем мире регистрируется ~1,6 млн случаев перелома шейки бедра, и полагают, что к 2050 г. это число достигнет 5–6 млн [5]. Основываясь на многочисленных опубликованных данных, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) США вынесло распоряжение о необходимости размеще-

Принятые сокращения: ИПП – ингибитор протонной помпы; AP – щелочная фосфатаза; STR – рецептор кальцитонина; CTSK – катепсин K; DC-STAMP – трансмембранный белок, специфичный для дендритных клеток; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; MMP-9 – матриксная металлопептидаза 9; NFATc1 – ядерный фактор активированных T-клеток цитоплазматический 1; OPG – остеопротегерин; RANKL – лиганд рецептора-активатора ядерного фактора κ B; TNF – фактор некроза опухоли; TNFR – рецептор фактора некроза опухоли; TRAP – тартрат-резистентная кислая фосфатаза; TRAF6 – фактор 6, ассоциированный с рецептором TNF.

* Адресат для корреспонденции.

ния предупреждения о повышенном риске переломов костей в инструкции по применению ИПП [6].

Ремоделирование кости – это сложный процесс, при котором старая кость заменяется новой посредством скоординированных действий четырех различных типов костных клеток: остеобластов, остеокластов, остеоцитов и мезенхимальных клеток кости, совместно формирующих анатомическую структуру, называемую базисной многоклеточной единицей [7, 8]. Связь между различными типами костных клеток и матриксом имеет особое значение, поскольку последний не только формирует подушку для костных клеток, но также играет важную роль в регулировании активности клеток посредством молекул адгезии [9]. У млекопитающих было показано наличие взаимодействия между остеобластами и остеокластами – следовательно, при исследовании метаболизма костной ткани следует учитывать связь между различными типами клеток кости [10].

Одной из удобных моделей для изучения костной ткани является чешуя костистых рыб (например, золотой рыбки *Carassius auratus*). Их чешуйки представляют собой кальцинированную ткань, состоящую из остеобластов, остеокластов и костного матрикса [11]. Кроме того, структура остеокластов и остеобластов чешуек аналогична таковой у млекопитающих [12].

Связь между приемом ИПП и повышенным риском переломов костей была выявлена ранее, хотя лежащие в ее основе молекулярные механизмы до сих пор остаются не ясными [13]. В настоящей статье мы исследовали влияние омепразола на метаболизм костей *in vivo* и *in vitro* с использованием чешуи костистых рыб, представляющей собой уникальную модельную систему.

В первую очередь на модели *in vitro* мы продемонстрировали положительное влияние омепразола на костные клетки посредством изменения активности ферментов. Затем мы определили временное окно для действия этого препарата на метаболизм костей *in vivo*. И наконец, с помощью *in vitro* модели мы изучили влияние омепразола на экспрессию генов интереса в определенные промежутки времени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные. Шестьдесят взрослых золотых рыбок (*C. auratus*) были приобретены у коммерческого продавца (рыбная ферма «Хигасикава», Япония) и помещены в аквариум, где поддерживалась температура

$25 \pm 0,5$ °С. Каждое утро рыбок кормили рекомендуемым количеством стандартного гранулированного корма, состоящего из 42,0% белков, 11,0% жиров, 2,0% клетчатки и 10,5% смеси минералов и витаминов («Feed One Co., Ltd.», Япония). Перед исследованиями *in vivo* и *in vitro* золотым рыбкам давали достичь средней массы тела 25,0–35,0 г.

Влияние омепразола на маркеры остеокластов и остеобластов *in vitro*. Золотых рыбок анестезировали этил-3-аминобензоатом («Sigma-Aldrich», США) и удаляли по 24 естественно развитых чешуйки с каждой стороны тела. Чешую инкубировали в течение 6 ч в среде Лейбовица L-15 («Invitrogen», США), содержащей 1%-ную смесь антибиотиков (пенициллин/стрептомицин) («ICN Biomedicals», США), с добавлением различных концентраций омепразола («Cayman Chemical», Япония; номер в каталоге 14880, чистота >98%) или DMSO (контроль).

Действие омепразола на остеокласты и остеобласты оценивали путем измерения активности соответствующих маркеров [тартрат-резистентной кислой фосфатазы (TRAP) и щелочной фосфатазы (AP)]. Для каждого ферментативного анализа чешую собирали у 10 рыб. Двадцать четыре чешуйки с одной стороны тела инкубировали при 15 °С в течение 6 ч с 10^{-8} , 10^{-7} и 10^{-6} М омепразола ($n = 8$ для каждой концентрации). Чешую с другой стороны тела инкубировали при тех же условиях в среде, содержащей соответствующие концентрации DMSO, и использовали в качестве контроля. Активность TRAP и AP определяли ранее описанным методом [14]. Размер чешуек рыб высчитывали с помощью программы ImageJ (NIH, США), и определяемые активности TRAP и AP нормализовали к соответствующей площади поверхности (мм^2) каждой чешуйки.

Влияние омепразола на уровень кальция в плазме крови *C. auratus in vivo*. Золотых рыбок анестезировали как описано выше, вводили внутривенно 10^{-7} М омепразола (34,5 нг/г массы тела) или 10^{-7} М DMSO (контроль) ($n = 10$ в каждой группе животных), а затем оставляли в аквариуме на один день. Длительность эксперимента была определена и скорректирована с учетом гормональных изменений в организме рыбок и токсических эффектов, влияющих на животных на протяжении двух дней [11]. Чтобы исключить потребление и усвоение кишечника кальция, полученного из корма, золотых рыбок не кормили непосредственно в ходе эксперимента.

Гепаринизированным шприцем брали образцы крови из хвостовой вены анестезированных экспериментальных и контрольных золо-

Праймеры, используемые в количественной ПЦР

| Ген | Прямой праймер | Обратный праймер | Рег. номер |
|-----------------|-------------------------|--------------------------|------------|
| <i>RANKL</i> | CGAGTGTGGCGATTTTGTG | ATGGGCGTCTTGATTGGAAG | AB894120 |
| <i>OPG</i> | CGTGAACACGGTGTGCGAGTGT | CCTCTGCGCAGGCCTCACA | AB970727 |
| <i>TRAF6</i> | TCTGATGGGTCTTCGCTCGGCT | ACTGGACATTTCTGCCCCGTGT | LC149878 |
| <i>NFATc1</i> | CTGTGGCTTTGCTTGTGGATGTC | GATGCTGGTGTTTTGGCTGTAACC | AB685221 |
| <i>CTR</i> | AAAGCAGAGCCCACCACTGA | CTGCTGCAGAACGAACCTGT | LC368623 |
| <i>CTSK</i> | TGGGAGGGCTGAAACTCAC | CATGAGCCGCATGAACCTTG | AB236969 |
| <i>MMP-9</i> | GCTTCTGCCCCAGTGAGCTT | GTGGAGCACCAGCGATACCC | AB889498 |
| <i>DC-STAMP</i> | TTCGCTGTTTTGGAGCCTTG | TGCTTTCCACCCATTTTAGC | AB894123 |
| <i>GAPDH</i> | CGCCGATGTGTCTGTTGTTG | CTTGACGGCCTCCTTGATGT | FX986058 |

рых рыбок через 3, 6, 12 и 24 ч после инъекции. Собранные образцы крови переносили в пластиковые пробирки и центрифугировали при 15 000 об./мин в течение 4 мин. Затем отбирали плазму, сразу же ее замораживали при -80°C и хранили до использования. Общую концентрацию кальция в плазме (рассчитанную в мг/100 мл) измеряли с помощью набора «Calcium E kit» («Wako Pure Chemical Industries», Япония) в соответствии с рекомендациями производителя.

Экспрессия мРНК маркеров остеобластов и остеокластов *in vitro*. Для исследования изменения экспрессии генов в костных клетках при действии омепразола (10^{-7} М) у анестезированных золотых рыбок собирали чешую и инкубировали в течение 3 и 6 ч в среде Лейбовица L-15, содержащей 1%-ную смесь антибиотиков (пенициллин/стрептомицин) и 10^{-7} М омепразола. После инкубации перед исследованием экспрессии мРНК чешую хранили при -80°C .

Тотальную РНК выделяли из чешуи с помощью набора для фиброзной ткани «Total RNA extraction kit for fibrous tissue» («MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG», Германия) и использовали в качестве матрицы для синтеза кДНК с использованием набора от «TAKARA Bio Inc.» (Япония). Для определения активности остеокластов и остеобластов мы измеряли экспрессию мРНК RANKL (лиганд рецептора-активатора ядерного фактора κB), OPG (остеопротегерин), факторов регуляции транскрипции TRAF6 (фактор 6, ассоциированный с TNF-рецептором) и NFATc1 (ядерный фактор активированных Т-клеток цитоплазматический 1) и функциональных генов CTR (рецептор кальцитонина), CTSK (катепсин К), MMP-9 (матриксная металлопептидаза 9) и DC-STAMP (трансмембранный белок, специфичный для дендритных клеток). Экспрессия исследуемых генов бы-

ла нормализована по уровню мРНК гена «домашнего хозяйства» *GAPDH* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа). Используемые в количественной ПЦР праймеры указаны в таблице; температура отжига праймеров составляла 60°C .

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения SPSS v.20 («IBM», США). Сравнение полученных значений проведено с использованием *t*-критерия Стьюдента, результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка (SE). Результат считался статистически значимым при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В нашем исследовании омепразол во всех используемых концентрациях приводил к существенному повышению активности AP и TRAP в чешуе рыб после 6-часовой инкубации ($p < 0,01$; рис. 1, *a* и *b*).

По сравнению с контрольной группой омепразол приводил к значительному повышению уровня кальция в плазме крови рыб через 6 и 12 ч ($p < 0,01$) после внутрибрюшинного введения. Спустя 24 ч после инъекции разница между контрольной и опытной группами становилась статистически недостоверной (рис. 2).

Основываясь на том, что омепразол приводил к повышению уровня кальция в крови рыб спустя 6 ч после инъекции, мы решили исследовать паттерны экспрессии генов после инкубации с омепразолом в течение 1, 2, 3 и 6 ч. Инкубация с препаратом в течение 1 и 2 ч не оказала достоверного влияния на экспрессию генов-маркеров остеобластов и остеокластов (рис. S1 и S2 в Приложении).

Инкубация с омепразолом в концентрации 10^{-7} М в течение 3 ч приводила к повышению

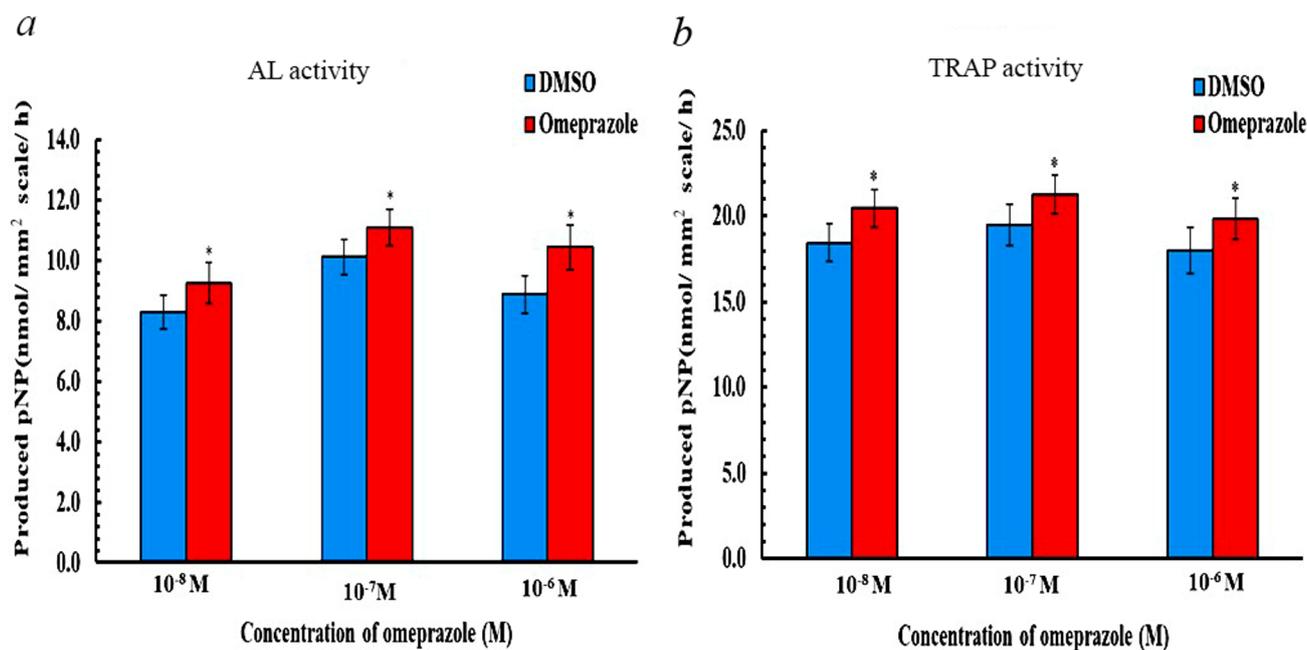


Рис. 1. Влияние омепразола на активность AP (a) и TRAP (b) в чешуе рыбы после 6-часовой инкубации; * – статистически достоверное различие при $p < 0,05$. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка (SE); $n = 8$ (по одному образцу от каждой рыбы). Синие столбцы – DMSO (контроль), красные – омепразол (omeprazole), pNP – p-Nitrophenol (n-нитрофенол)

экспрессии мРНК *RANKL*, *OPG*, *TRAF6*, *NFATc1*, *CTR*, *CTSK*, *MMP-9* и *DC-STAMP* по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Тем не менее спустя 6 ч инкубации различие в экспрессии между экспериментом и контролем было обнаружено только для гена *NFATc1* ($p < 0,05$) (рис. 3 и 4). Изменения соотношения *RANKL/OPG* через 3 и 6 ч инкубации были статистически недостоверными (рис. S3 в Приложении).

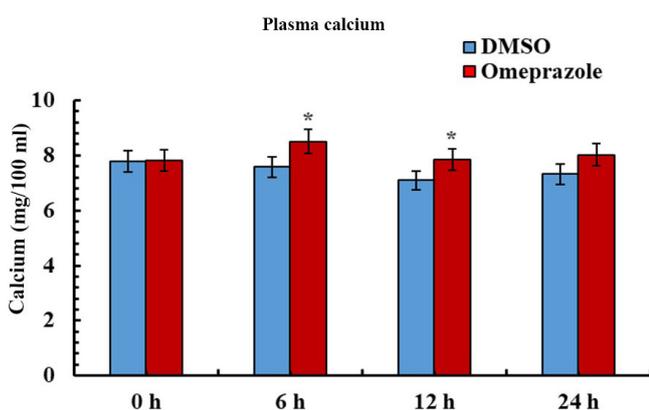


Рис. 2. Концентрация кальция в плазме крови в экспериментальной (омепразол; красные столбцы) и контрольной (DMSO; синие столбцы) группах через 0, 6, 12 и 24 ч после инъекции; * – статистически достоверное различие при $p < 0,05$. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка (SE); $n = 10$

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ингибиторы протонной помпы обычно применяют в качестве средств, подавляющих кислотность, для лечения желудочно-кишечных расстройств, вызванных действием кислоты, таких как пептические язвы, диспепсия и ГЭРБ [5]. Тем не менее использование ИПП вызывает ряд опасений в связи с возможным проявлением их побочных эффектов, включая повышенный риск переломов, недостаточную регенерацию кости, снижение скорости сращения кости, ухудшение всасывания железа и витамина B12 у мужчин, а также гипомагниемия и инфекции [15, 16].

В ходе настоящего исследования мы обнаружили, что инкубация чешуи золотой рыбки с омепразолом в течение 6 ч приводит к значительному повышению активности как AP, так и TRAP (маркеров остеобластов и остеокластов соответственно). Наши результаты согласуются с результатами проведенных ранее исследований, которые продемонстрировали прямое влияние ИПП на остеокласты и остеобласты [17, 18]. Белок AP представляет собой связанный с плазматической мембраной остеобластов тетрамерный фермент, который играет ключевую роль в образовании и минерализации остеоидов посредством ферментативной деградации пирофосфата (ингибитора минерализации) при

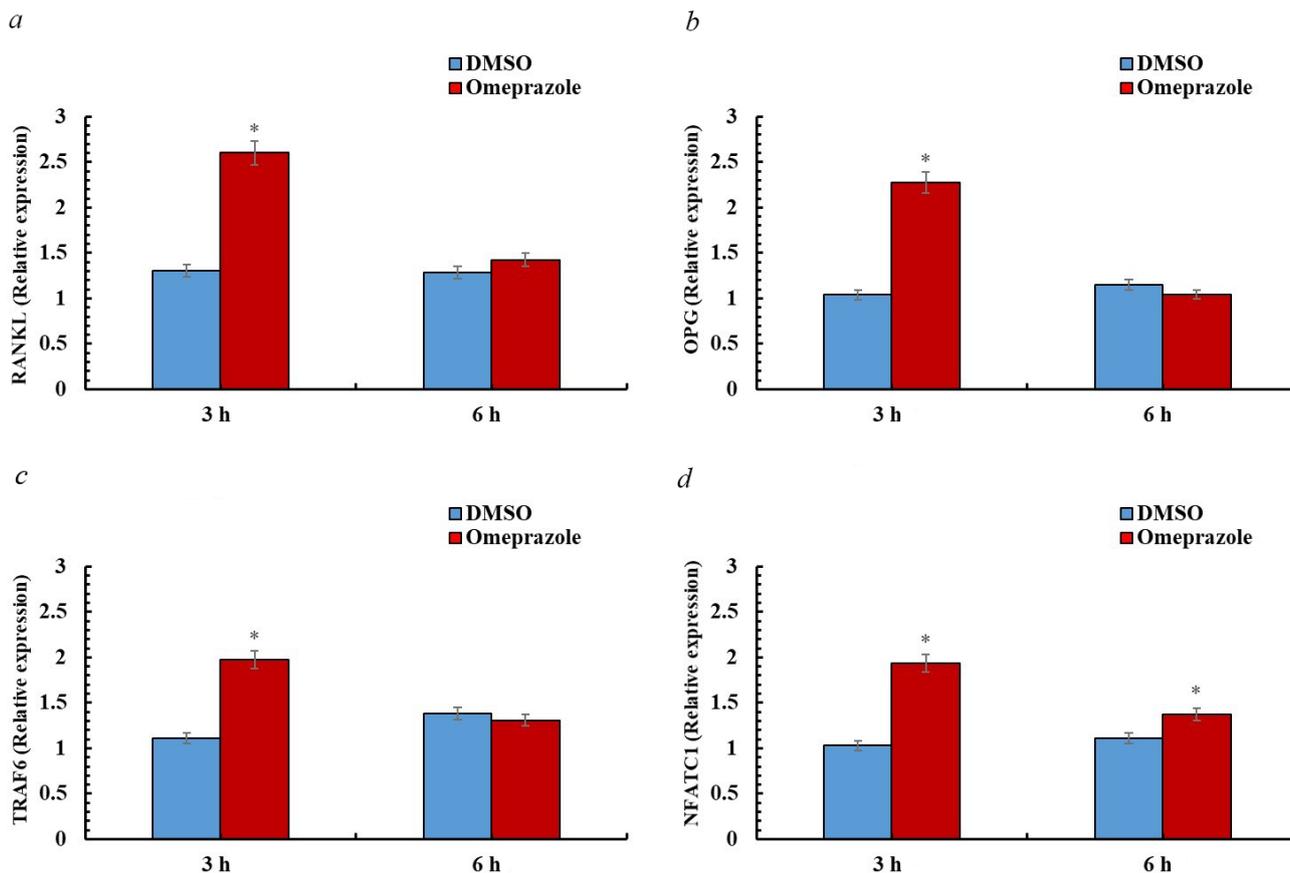


Рис. 3. Относительная экспрессия мРНК в чешуе рыбы, инкубированной с омепразолом (10^{-7} М; красные столбцы) в течение 3 и 6 ч, и в контрольных образцах (DMSO; синие столбцы): *a* – RANKL; *b* – OPG; *c* – TRAF6; *d* – NFATc1; * – статистически достоверное различие при $p < 0,05$. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка (SE); $n = 8$ (по одному образцу от каждой рыбы)

щелочном значении pH [19]. Ранее было обнаружено, что ИПП приводят к значительному повышению выживаемости остеобластов (1–10 мкг/мл пантопразола) и росту активности AP (3–10 мкг/мл пантопразола) в клетках MC3T3-E1, а также повышению уровня остеокальцина (маркера дифференцировки) в остеобластах человека (1–4 мкг/мл омепразола) [17]. Напротив, Costa-Rodrigues et al. [20] отметили выраженное снижение активности AP в культивируемых мезенхимальных стволовых клетках человека на 14-й и 21-й день после инкубации с омепразолом, эзомепразолом и лансопразолом в концентрациях от 10^{-6} до 10^{-3} М. Данные результаты не подтверждают гипотезу о том, что снижение функции остеобластов является основной причиной повышенного риска переломов у пациентов, получавших ИПП.

В отличие от AP, TRAP устойчив к деградации при действии тартрата и обнаруживается в области фестончатого края остеокластов. Его содержание обычно увеличивается при ускоренном метаболизме костной ткани, сопровождаю-

щим такие состояния, как болезнь Педжета, метастазы в кости и множественная миелома [19]. Hyun et al. [21] не обнаружили значительных изменений в количестве TRAP-положительных остеокластоподобных клеток после лечения с применением ИПП. Более того, ИПП ингибировали формирование TRAP-положительных многоядерных клеток в культивируемых мононуклеарных клетках периферической крови на 21-й день инкубирования с омепразолом в концентрациях от 10^{-5} до 10^{-3} М [20]. Это несоответствие полученных результатов можно объяснить тем, что ремоделирование кости является чрезвычайно сложным процессом, при котором старые костные клетки заменяются новыми за счет скоординированного взаимодействия компонентов костной ткани [22]. Ни в одном из проведенных ранее исследований не учитывали передачу сигналов и взаимодействие между клетками кости.

В ходе исследования мы обнаружили, что внутрибрюшинное введение омепразола вызывало заметное повышение концентрации каль-

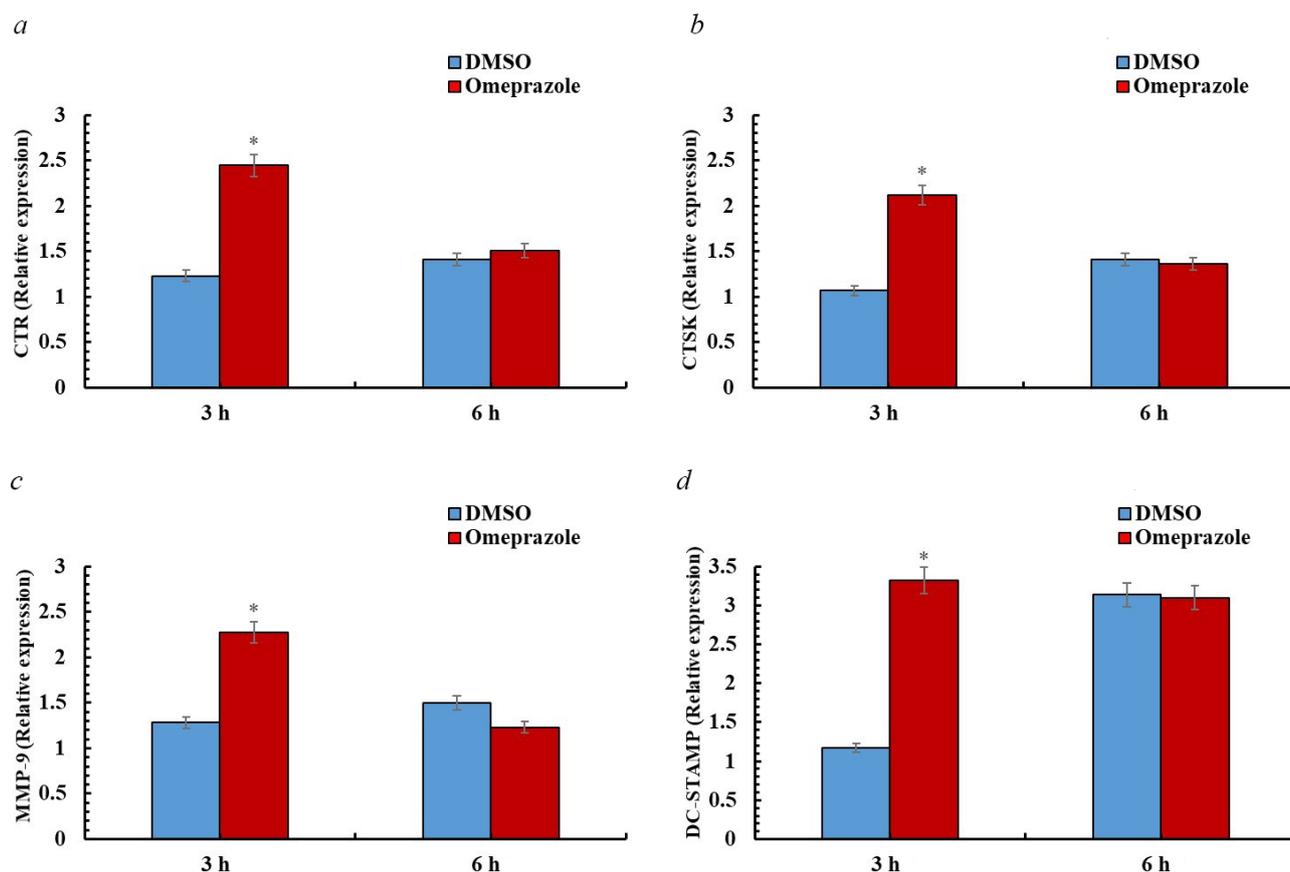


Рис. 4. Относительная экспрессия мРНК в чешуе рыбы, обработанной омепразолом (10^{-7} М; красные столбцы) в течение 3 и 6 ч, и в контрольных образцах (DMSO; синие столбцы): *a* – *CTR*; *b* – *CTSK*; *c* – *MMP-9*; *d* – *DC-STAMP*; * – статистически достоверное различие при $p < 0,05$. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка (SE); $n = 8$ (по одному образцу от каждой рыбы)

ция в плазме рыб через 6 ч после инъекции. Кальций необходим для поддержания микро-структуры костей [23]. Повышенная концентрация кальция в плазме является маркером ускоренной резорбции костной ткани и может наблюдаться при многих заболеваниях, таких как первичный гиперпаратиреоз, рак и заболевания почек [24]. Полученные нами результаты согласуются с результатами Ye et al. [25], которые продемонстрировали, что омепразол (20 мг/день) значительно снижает минеральную плотность костей за счет высвобождения минералов из костной ткани. При приеме не натошак ИПП могут влиять на регенерацию костей за счет повышения рН в тонком кишечнике, что приводит к снижению доступности кальция и ускорению потери минералов костной тканью [26]. Следовательно, снижение всасывания кальция может объяснить связь между применением ИПП и повышением риска переломов костей [27]. Более того, снижение содержания кальция в плазме способствует усилению секреции паратиреоидного гормона паращитовидной железой [28].

Паратгормон мобилизует кальций из костных клеток, что снижает прочность костей и увеличивает риск переломов [29]. Тем не менее в нескольких исследованиях было высказано предположение, что омепразол снижает резорбцию костной ткани и замедляет прогрессирование остеопороза [17, 21]. Таким образом, вопрос о связи между применением ИПП, деминерализацией костей и повышенным риском переломов остается открытым.

В нашем исследовании золотые рыбки не получали корм в течение одного дня. Следовательно, ни контрольная, ни получавшая омепразол группа не имела внешнего источника кальция в составе пищи. В контрольной группе снижение уровня кальция через 12 ч можно интерпретировать как результат голодания. В экспериментальной группе, напротив, наблюдалось повышение уровня кальция в плазме через 6 и 12 ч, что может объясняться действием омепразола на костные клетки, а именно индукцией деминерализации кости и высвобождением кальция, что приводит к резорбции костной

ткани. Известно, что содержание кальция в пресной воде очень мало; следовательно, пресноводные рыбы должны регулировать уровень кальция в плазме крови при помощи чешуи [30], поскольку через жабры концентрация кальция не может быть быстро увеличена. Повышение уровня кальция в крови также может быть индуцировано паратиреоидным гормоном посредством активации остеокластов [31]. Таким образом, весьма вероятно, что омепразол увеличивает уровень кальция в крови за счет активации остеокластов.

Romdhane et al. [32] установили, что ИПП могут действовать непосредственно на костные клетки. Более того, авторы обнаружили, что длительное применение ИПП связано со снижением минеральной плотности костей (МПК). Снижение МПК и изменение микроструктуры кости считаются маркерами остеопороза [5]. Кроме того, ИПП могут вызывать изменения прочности, геометрии, трабекулярного состава и микроархитектуры кости, что может влиять на прогрессирование ее ремоделирования и способствовать переломам костей [27]. ИПП играют жизненно важную роль в метаболизме костей и могут напрямую влиять на их регенерацию [25, 26]. Тем не менее имеющиеся данные о молекулярных механизмах действия ИПП на ремоделирование кости, полученные на культурах клеток, являются противоречивыми, поскольку в таких исследованиях не была учтена передача сигналов между костными клетками.

В настоящем исследовании мы показали, что инкубация рыбьей чешуи с омепразолом в концентрации 10^{-7} М в течение 3 ч вызывала значительную активацию экспрессии мРНК *RANKL* и *OPG*, а также мРНК факторов регуляции транскрипции *TRAF6* и *NFATc1*. Экспрессия мРНК маркеров остеокластов *CTSK*, *CTR*, *MMP-9* и *DC-STAMP* в чешуе, обработанной омепразолом, также была заметно повышена по сравнению с контролем. При этом единственным белком, экспрессия мРНК которого оставалась значительно повышенной после 6-часовой инкубации, был *NFATc1*.

Наши результаты согласуются с результатами работы Hyun et al., где было показано, что омепразол увеличивает активность остеобластов за счет стимуляции экспрессии гена остеокальцина *OCN* и повышения соотношения *OPG/RANKL* в клетках MC3T3-E1. Соотношение *OPG/RANKL* значительно увеличивалось с повышением концентрации омепразола [21]. Hyun et al. также обнаружили, что омепразол приводит к снижению активности остеокластов в клетках RAW 264.7 и подавлению экспрессии

мРНК *c-Fos*, *NFATc1*, *CTR* и *MMP-9* независимо от концентрации препарата. Такой ответ на препарат может приводить к снижению риска переломов [21], что противоречит результатам нашего исследования. Costa-Rodrigues et al. продемонстрировали снижение содержания маркеров остеокластов, в частности *CTSK*, и обнаружили, что активность *TRAP* связана с резорбтивной активностью при концентрациях ИПП более 10^{-5} М [20]. Тем не менее в нескольких предыдущих исследованиях было продемонстрировано, что применение ИПП, особенно в высоких дозах и в течение продолжительных периодов времени, не обладало остеопротекторным эффектом; напротив – повышало риск переломов костей [33]. Такое расхождение в результатах, опять же, может быть связано с тем, что при проведении исследований мы принимали во внимание передачу сигналов между костными клетками.

Обнаружено множество молекул, участвующих в передаче сигналов между остеокластами и остеобластами [34]. Белок *RANKL* принадлежит к суперсемейству фактора некроза опухоли α (*TNF- α*) и связывается с активатором мембранного рецептора ядерного фактора κ B (*RANK*) из суперсемейства *TNF*-рецепторов [35]. При связывании со своим рецептором (*RANK*, продуцируемым остеокластами), *RANKL* запускает дифференцировку предшественников остеокластов в многоядерные остеокласты (активная форма этого типа клеток) [36]. Взаимодействие между *RANKL* и *RANK* приводит к индукции внутриклеточного сигнального каскада, контролируемого рецептором-ловушкой *OPG*, продуцируемым остеобластами. *OPG* предотвращает связывание *RANKL* с *RANK*, тем самым подавляя остеокластогенез. Таким образом, соотношение *RANK/RANKL/OPG* было использовано в качестве маркера активации остеокластов [37]. В нашем исследовании экспрессия мРНК *RANKL* и *OPG* была значительно повышена, свидетельствуя о том, что омепразол привел к изменению соотношения *RANKL/OPG*. Кроме того, экспрессия генов остеокластов также была значительно повышена, указывая на то, что омепразол вызывает резорбцию, но не формирование кости (что также проявляется в усилении высвобождения кальция).

Подобно другим рецепторам суперсемейства *TNFR*, *RANK* не обладает тирозинкиназной активностью, которая необходима для активации последующих в сигнальном пути (*downstream*) молекул [38]. Следовательно, для индукции сигнального каскада *RANK* нуждается во взаимодействии с адаптерными белками (например, *TRAF6*) [36]. Исследования на мышах с дефици-

том TRAF6 показали, что он является основным адаптерным белком, который играет решающую роль в проведении сигнала по путям, активируемым RANKL [39], а также в инициации последующего сигнального каскада, который характеризуется индукцией митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), ядерного фактора κ B (NF- κ B) и белка-активатора 1 (AP-1) [40].

Активированный NF- κ B инициирует работу NFATc1, который играет важную роль в остеокластогенезе [36]. Более того, на промежуточной стадии передачи костимулирующий сигнал инициирует флуктуацию ионов кальция, опосредованную активацией фосфолипазы C β 2 (PLC β 2). Совместно с комплексом c-Fos/AP-1 кальциевый сигнал опосредует стабильную выработку NFATc1 [41]. Эти процессы, предположительно, объясняют заметное увеличение содержания NFATc1 после инкубации чешуи с омепразолом в течение 3 и 6 ч. Наши результаты согласуются с данными Takayanagi et al. [42], где было продемонстрировано, что NFATc1 является основным фактором транскрипции в остеокластогенезе, а также с результатами группы Lee et al., которые обнаружили, что большинство белков NFAT в T-клетках контролируется поступлением кальция [43]. Кальмодулин связывает свободные ионы кальция и активирует кальциневрин, который дефосфорилирует множество остатков серина в NFAT, что приводит к транслокации этих белков в ядро. Стоит отметить, что NFATc1 активируется по типу аутоамплификации после стимуляции при помощи RANKL [44].

В результате передачи сигнала NFATc1 перемещается в ядро, где он взаимодействует с другими факторами транскрипции и связывается с ДНК, повышая экспрессию генов-мишеней NFATc1, таких как *CTSK*, *TRAP* и *DC-STAMP* [37, 45]. С соответствующих мРНК синтезируются белки, ответственные за резорбцию кости, в ходе которой происходит дифференцировка, слияние и собственно функционирование остеокластов [36]. Эти результаты согласуются с полученными нами данными, демонстрирующими повышенную экспрессию мРНК *CTR*, *CTSK* и *DC-STAMP* в экспериментальной группе (с добавлением омепразола) по сравнению с контролем после 3-часовой инкубации. Данный факт может быть связан с тем, что DC-STAMP и остеокласт-стимулирующий трансмембранный белок (OC-STAMP) необходимы для слияния остеокластов, но не для их дифференцировки [40].

Следовательно, DC-STAMP и OC-STAMP рассматриваются как мишени NFATc1 в остеокластах [46]. Podgorski et al. [45] продемонстрировали, что избыточная экспрессия *CTSK* с одновременной секрецией провоспалительных цитокинов может опосредовать механизм прогрессирования заболеваний костей при участии *CTSK*, что согласуется с нашей гипотезой. Кроме того, полученные нами результаты согласуются с результатами работы Herroon et al. [47], в которой была продемонстрирована ключевая функция *CTSK* в развитии аутоиммунных и воспалительных заболеваний костей в дополнение к резорбции кости.

Таким образом, с целью объяснения расхождений в описанных эффектах омепразола на метаболизм костей, в настоящем исследовании мы использовали новый метод анализа *in vitro* с использованием рыбьей чешуи, а также *in vivo* исследования. Мы обнаружили, что омепразол оказывает значительное влияние на функционирование системы OPG/RANKL. Кроме того, омепразол способен взаимодействовать с костными клетками и приводить к повышению экспрессии основного фактора транскрипции, NFATc1, который дополнительно стимулируется высвобождением кальция, что приводит к активации функциональных генов остеокластов (*MMP-9*, *CTSK*, *DC-STAMP* и *CTR*) и, в конечном итоге, к стимуляции резорбции кости.

Благодарности. Мы благодарны всем сотрудникам Морской лаборатории Ното Отдела экологических исследований морской среды Института природы и экологических технологий университета Канадзавы (Ното-Чо, Исикава, Япония) за их неоценимую поддержку в продолжение всего нашего исследования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соответствие этическим стандартам. Эксперимент проводился в соответствии с инструкциями по уходу и работе с лабораторными животными университета Канадзавы (протокол № 93255).

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (www.springer.com/journal/10541), том 86, вып. 10, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kinoshita, Y., Ishimura, N., and Ishihara, S. (2018) Advantages and disadvantages of long-term proton pump inhibitor use, *J. Neurogastroenterol. Motil.*, **24**, 182-196.
- Tian, H., Xu, Y., Wang, J., Tian, W., Sun, J., et al. (2018) Effects of plasma albumin on the pharmacokinetics of esomeprazole in ICU patients, *Biomed. Res. Int.*, **2018**, 6374374, doi: 10.1155/2018/6374374.
- Yanagihara, G. R., de Paiva, A. G., Neto, M. P., Torres, L. H., Shimano, A. C., et al. (2015) Effects of long-term administration of omeprazole on bone mineral density and the mechanical properties of the bone, *Rev. Bras. Ortop.*, **50**, 232-238.
- Thaler, H. W., Sterke, C. S., and Van Der Cammen, T. J. M. (2016) Association of proton pump inhibitor use with recurrent falls and risk of fractures in older women: a study of medication use in older fallers, *J. Nutr. Health Aging*, **20**, 77-81.
- Thong, B. K. S., Ima-Nirwana, S., and Chin, K. Y. (2019) Proton pump inhibitors and fracture risk: A review of current evidence and mechanisms involved, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **16**, 1571.
- FDA Drug Safety Communication (2011) Possible increased risk of fractures of the hip, wrist, and spine with the use of proton pump inhibitors, Update: 3/23/2011. Available at: <https://www.fda.gov/drugs/postmarket-drug-safety-information-patients-and-providers/fda-drug-safety-communication-possible-increased-risk-fractures-hip-wrist-and-spine-use-proton-pump>.
- Andersen, T. L., Sondergaard, T. E., Skorzynska, K. E., Dagnaes-Hansen, F., Plesner, T. L., et al. (2009) A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone, *Am. J. Pathol.*, **174**, 239-247.
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., and Cerri, P. S. (2015) Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells, *Biomed Res. Int.*, **2015**, 421746, doi: 10.1155/2015/421746.
- Zohar, R. (2012) Signals between cells and matrix mediate bone regeneration, in: *Bone Regeneration*, Haim Tal, IntechOpen, doi: 10.5772/38292.
- Manolagas, S. C. (2000) Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis, *Endocr. Rev.*, **21**, 115-137.
- Suzuki, N., Suzuki, T., and Kurokawa, T. (2000) Suppression of osteoclastic activities by calcitonin in the scales of goldfish (freshwater teleost) and nibbler fish (sea-water teleost), *Peptides*, **21**, 115-124.
- Thamamongood, T. A., Furuya, R., Fukuba, S., Nakamura, M., Suzuki, N., and Hattori, A. (2012) Expression of osteoblastic and osteoclastic genes during spontaneous regeneration and autotransplantation of goldfish scale: a new tool to study intramembranous bone regeneration, *Bone*, **50**, 1240-1249.
- Briganti, S. I., Naciu, A. M., Tabacco, G., Cesareo, R., Napoli, N., et al. (2021) Proton pump inhibitors and fractures in adults: a critical appraisal and review of the literature, *Int. J. Endocrinol.*, doi: 10.1155/2021/8902367.
- Suzuki, N., Kitamura, K., Nemoto, T., Shimizu, N., Wada, S., et al. (2007) Effect of vibration on osteoblastic and osteoclastic activities: Analysis of bone metabolism using goldfish scale as a model for bone, *Adv. Sp. Res.*, **40**, 1711-1721.
- Al Subaie, A., Emami, E., Tamimi, I., Laurenti, M., Eimar, H., et al. (2016) Systemic administration of omeprazole interferes with bone healing and implant osseointegration: an *in vivo* study on rat tibiae, *J. Clin. Periodontol.*, **43**, 193-203.
- Wang, L., Li, M., Cao, Y., Han, Z., Wang, X., et al. (2017) Proton pump inhibitors and the risk for fracture at specific sites: data mining of the FDA adverse event reporting system, *Sci. Rep.*, **7**, 5527.
- Prause, M., Seeliger, C., Unger, M., van Griensven, M., and Haug, A. T. (2014) Pantoprazole increases cell viability and function of primary human osteoblasts *in vitro*, *Injury*, **45**, 1156-1164.
- Prause, M., Seeliger, C., Unger, M., Rosado Balmayor, E., van Griensven, M., and Haug, A. T. (2015) Pantoprazole decreases cell viability and function of human osteoclasts *in vitro*, *Mediators Inflamm.*, **2015**, 413097, doi: 10.1155/2015/413097.
- Shetty, S., Kapoor, N., Bondu, J. D., Thomas, N., and Paul, T. V. (2016) Bone turnover markers: Emerging tool in the management of osteoporosis, *Ind. J. Endocrinol. Metab.*, **20**, 846-852.
- Costa-Rodrigues, J., Reis, S., Teixeira, S., Lopes, S., and Fernandes, M. H. (2013) Dose-dependent inhibitory effects of proton pump inhibitors on human osteoclastic and osteoblastic cell activity, *FEBS J.*, **280**, 5052-5064.
- Hyun, J. J., Chun, H. J., Keum, B., Seo, Y. S., Kim, Y. S., et al. (2010) Effect of omeprazole on the expression of transcription factors in osteoclasts and osteoblasts, *Int. J. Mol. Med.*, **26**, 877-883.
- Robling, A. G., Castillo, A. B., and Turner, C. H. (2006) Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **8**, 455-498.
- Price, C. T., Langford, J. R., and Liporace, F. A. (2012) Essential nutrients for bone health and a review of their availability in the average North American Diet, *Open Orthop. J.*, **6**, 143-149.
- Minisola, S., Pepe, J., Piemonte, S., and Cipriani, C. (2015) The diagnosis and management of hypercalcaemia, *BMJ*, **350**, h2723, doi: 10.1136/bmj.h2723.
- Ye, X., Liu, H., Wu, C., Qin, Y., Zang, J., et al. (2011) Proton pump inhibitors therapy and risk of hip fracture: a systematic review and meta-analysis, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **23**, 794-800.
- O'Connell, M. B., Madden, D. M., Murray, A. M., Heaney, R. P., and Kerzner, L. J. (2005) Effects of proton pump inhibitors on calcium carbonate absorption in women: a randomized crossover trial, *Am. J. Med.*, **118**, 778-781.
- Wu, X., Al-Abedalla, K., Abi-Nader, S., Daniel, N. G., Nicolau, B., and Tamimi, F. (2017) Proton pump inhibitors and the risk of osseointegrated dental implant failure: a cohort study, *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.*, **19**, 222-232.
- Goltzman, D., Mannstadt, M., and Marcocci, C. (2018) Physiology of the calcium-parathyroid hormone-vitamin D axis, *Front. Horm. Res.*, **50**, 1-13.
- Moe, S. M. (2008) Disorders involving calcium, phosphorus, and magnesium, *Primary Care*, **35**, 215-237.
- Suzuki, N., Kitamura, K., and Hattori, A. (2016) Fish scale is a suitable model for analyzing determinants of skeletal fragility in type 2 diabetes, *Endocrine*, **54**, 575-577.
- Suzuki, N., Danks, J. A., Maruyama, Y., Ikegame, M., Sasayama, Y., et al. (2011) Parathyroid hormone 1 (1-34) acts on the scales and involves calcium metabolism in goldfish, *Bone*, **48**, 1186-1193.
- Romdhane, H., Ayadi, S., Elleuch, N., and Abdelghani, K. (2018) Effect of long-term proton pump inhibitors on bone mineral density, *Tunis Med.*, **96**, 193-197.
- Corley, D. A., Kubo, A., Zhao, W., and Quesenberry, C. (2010) Proton pump inhibitors and histamine-2 receptor antagonists are associated with hip fractures among at-risk patients, *Gastroenterology*, **139**, 93-101.

34. Nassar, Y., and Richter, S. (2018) Proton-pump inhibitor use and fracture risk: an updated systematic review and meta-analysis, *J. Bone Metab.*, **25**, 141-151.
35. Sims, N. A., and Martin, T. J. (2014) Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit, *Bonekey Rep.*, **3**, 481.
36. Park, J. H., Lee, N. K., and Lee, S. Y. (2017) Current understanding of RANK signaling in osteoclast differentiation and maturation, *Mol. Cells*, **40**, 706-713.
37. Lacey, D. L., Boyle, W. J., Simonet, W. S., Kostenuik, P. J., Dougall, W. C., et al. (2012) Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **11**, 401-419.
38. Liu, W., and Zhang, X. (2015) Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (review), *Mol. Med. Rep.*, **11**, 3212-3218.
39. Walsh, M. C., Lee, J., and Choi, Y. (2015) Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system, *Immunol. Rev.*, **266**, 72-92.
40. Kobayashi, Y., Udagawa, N., and Takahashi, N. (2009) Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis, *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **19**, 61-72.
41. Asagiri, M., and Takayanagi, H. (2007) The molecular understanding of osteoclast differentiation, *Bone*, **40**, 251-264.
42. Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., et al. (2002) Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts, *Dev. Cell*, **3**, 889-901.
43. Lee, J. U., Kim, L. K., and Choi, J. M. (2018) Revisiting the concept of targeting NFAT to control T cell immunity and autoimmune diseases, *Front. Immunol.*, **9**, 2747.
44. Hutchings, G., Moncrieff, L., Dompe, C., Janowicz, K., Sibiak, R., et al. (2020) Bone regeneration, reconstruction and use of osteogenic cells; from basic knowledge, animal models to clinical trials, *J. Clin. Med.*, **9**, 139, doi: 10.3390/jcm9010139.
45. Podgorski, I., Linebaugh, B. E., Koblinski, J. E., Rudy, D. L., Herroon, M. K., et al. (2009) Bone marrow-derived cathepsin K cleaves SPARC in bone metastasis, *Am. J. Pathol.*, **175**, 1255-1269.
46. Chiu, Y. H., and Ritchlin, C. T. (2016) DC-STAMP: a key regulator in osteoclast differentiation, *J. Cell Physiol.*, **231**, 2402-2407.
47. Herroon, M. K., Rajagurubandara, E., Rudy, D. L., Chalasani, A., Hardaway, A. L., and Podgorski, I. (2013) Macrophage cathepsin K promotes prostate tumor progression in bone, *Oncogene*, **32**, 1580-1593.

EFFECT OF OMEPRAZOLE ON OSTEOBLASTS AND OSTEOCLASTS *in vivo* AND IN THE *in vitro* MODEL USING FISH SCALES

M. I. Zanaty¹, A. Abdel-Moneim^{2*}, Y. Kitani³, T. Sekiguchi³, and N. Suzuki³

¹ Biotechnology and Life Sciences Department, Faculty of Postgraduate Studies
for Advanced Sciences, Beni-Suef University, 62511 Beni-Suef, Egypt

² Molecular Physiology Division, Faculty of Science, Beni-Suef University,
62511 Beni-Suef, Egypt; e-mail: adel_men2020@yahoo.com

³ Noto Marine Laboratory, Division of Marine Environmental Studies, Institute of Nature
and Environmental Technology, Kanazawa University, Noto-Cho, 927-0553 Ishikawa, Japan

Omeprazole suppresses excessive secretion of gastric acid *via* irreversible inhibition of H⁺/K⁺-ATPase in the gastric parietal cells. Recent meta-analysis of data revealed an association between the use of proton pump inhibitors (PPIs) and increased risk of bone fractures, but the underlying molecular mechanism of PPI action remains unclear. In this study, we demonstrated that omeprazole directly influences bone metabolism using a unique *in vitro* bioassay system with teleost scales, as well as the *in vivo* model. The *in vitro* study showed that omeprazole significantly increased the activities of alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase after 6 h of incubation with this PPI. Expression of mRNAs for several osteoclastic markers was upregulated after 3-h incubation of fish scales with 10⁻⁷ M omeprazole. The *in vivo* experiments revealed that the plasma calcium levels significantly increased in the omeprazole-treated group. The results of *in vitro* and *in vivo* studies suggest that omeprazole affects bone cells by increasing bone resorption by upregulating expression of osteoclastic genes and promoting calcium release to the circulation. The suggested *in vitro* bioassay in fish scales is a practical model that can be used to study the effects of drugs on bone metabolism.

Keywords: omeprazole, fish scales, transcription genes, osteoclastic genes