

Wpływ perindoprilu, amlodypiny i indapamidu na aktywność pepsyny *in vitro*

The influence of perindopril, amlodipine and indapamid on pepsin activity in vitro

Joanna Suliburska¹, Paweł Bogdański², Zbigniew Krejpcio¹, Danuta Pupek-Musialik²

¹ Katedra Higieny Żywnienia Człowieka, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

² Klinika Chorób Wewnętrznych, Zaburzeń Metabolicznych i Nadciśnienia Tętniczego, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

Streszczenie

Wstęp. W pracy określono wpływ różnych dawek wybranych leków hipotensyjnych na aktywność pepsyny w warunkach trawienia enzymatycznego *in vitro*. **Materiał i metody.** Zastosowano perindopril z arginina (Prestarium) i amlodypinę (cardilopin) w stężeniach: 0,1; 0,2, 0,5% oraz indapamid (Tertensif) w stężeniu 0,008; 0,03 i 0,08%. Aktywność pepsyny oznaczano metodą kalorymetryczną na podstawie ilości powstałego produktu rozpadu albuminy z odczynnikiem Folina-Ciocalteu. **Wnioski.** W pracy wykazano, że amlodypina, indapamid oraz perindopril z arginina powodują znamienny wzrost aktywności pepsyny w warunkach trawienia enzymatycznego *in vitro*. (*Farm Współ* 2009; 2: 171-174)

Słowa kluczowe: amlodypina, indapamil, perindopryl, pepsyna, aktywność enzymatyczna

Summary

Introduction. In the study was determined the influence of various doses of selected hypotensive drugs on the pepsin activity in *in vitro* enzymatic digestion. **Material and methods.** Perindopril with arginine (Prestarium) and amlodipine (cardilopin) in the concentrations: 0.1; 0.2, 0.5% and indapamid (Tertensif) in the concentrations: 0.008; 0.03; 0.08%. The activity of pepsin was determined using the colorimetric method based on the reaction of the albumin degradation product complexed with the Folin-Ciocalteu phenol reagent. **Conclusions.** In this study was found that amlodipine, indapamid and perindopril with arginine significantly increased the activity of pepsin in *in vitro* enzymatic digestion. (*Farm Współ* 2009; 2: 171-174)

Keywords: amlodypina, indapamil, perindopryl, pepsin, enzymatic activity

Wstęp

Leczenie nadciśnienia tętniczego najczęściej ma charakter długotrwały i trwa do końca życia. Terapię farmakologiczną rozpoczyna się od leków pierwszego wyboru, do których należą: diuretyki, beta-blokery, antagoniści wapnia, inhibitory konwertazy angiotensyny i antagoniści receptora AT₁ angiotensyny II [1].

Podstawowym diuretykiem stosowanym w leczeniu nadciśnienia jest indapamid. Działa on poprzez

zmniejszenie napięcia mięśni gładkich naczyń krwionośnych oraz pobudzenie syntezy prostaglandyn – PGE₂, dodatkowo zmniejsza opór obwodowy i poprawia podatność tętnic [2]. Powszechnie stosowane, szczególnie w leczeniu nadciśnienia tętniczego oraz niewydolności krążenia, są inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę a wśród nich perindopril. Należą do grupy leków najbardziej skutecznych i stosunkowo bezpiecznych, obciążonych niewielką liczbą działań ubocznych i niepożądanych [3]. Leki

z grupy blokerów kanałów wapniowych są od wielu lat stosowane w leczeniu nadciśnienia tętniczego, choroby wieńcowej, zaburzeń rytmu serca, zespołu Raynauda i innych rzadszych chorób. W leczeniu chorych z nadciśnieniem tętniczym z tej grupy leków znalazła zastosowanie m.in. amlodipina [4].

Poza właściwym działaniem leków hipotensyjnych w organizmie pacjentów występują również skutki uboczne ich aktywności. Są one najczęstszą przyczyną zaprzestania leczenia nadciśnienia tętniczego przez pacjentów [5]. Badanie i monitorowanie działań niepożądanych leków jest istotne w celu zapewnienia odpowiedniej jakości życia pacjentom.

Cel pracy

Celem pracy była ocena wpływu perindoprilu, amlodipiny i indapamidu na aktywność pepsyny w warunkach modelowych *in vitro*.

Materiał i metody

Materiał badany stanowiły trzy leki hipotensyjne z grupy: diuretyków, inhibitorów konwertazy angiotensyny i antagonistów kanałów wapniowych. Do badań wykorzystano Prestarium - inhibitor konwertazy angiotensyny zawierający w jednej tabletkie 10 mg perindoprilu z arginina równoważne 6.79 mg perindoprilu. W skład tabletki wchodziły także następujące substancje pomocnicze: laktoza jednowodna, stearynian magnezu, maltodekstryna, krzemionka koloidalna hydrofobowa, arboksymetyloskrobia sodowa, glicerol, hypromeloza, kompleks miedziowy chlorofiliny, makrogol, dwutlenek tytanu. Antagonistą kanałów wapniowych jest Cardilopin zawierający w jednej tabletkie 10 mg amlodipidy. Obok substancji czynnej, w tabletkie były obecne następujące substancje pomocnicze: krzemionka koloidalna bezwodna, stearynian magnezu, karboksymetyloskrobia sodowa, celuloza mikrokrystaliczna. W doświadczeniu wykorzystano również Tertensif - diuretyk zawierający w jednej tabletkie 1,5 mg indapamidu. W skład tabletki wchodziły także następujące substancje pomocnicze: krzemionka koloidalna bezwodna, hypromeloza, laktoza jednowodna, stearynian magnezu, powidon, glicerol, makrogol, dwutlenek tytanu.

Badaniu poddano leki na co dzień podawane pacjentom z nadciśnieniem tętniczym, leczonym w Klinice Chorób Wewnętrznych, Zaburzeń

Metabolicznych i Nadciśnienia Tętniczego w Poznaniu.

Analizy wykonano dla trzech stężeń substancji czynnej leku - perindopril z arginina (Prestarium): 0.1; 0.2; 0.5%, amlodipina (Cardilopin): 0.1; 0.2; 0.5%, indapamid (Tertensif): 0.008; 0.03; 0.08%. W doświadczeniu wykorzystano: pepsynę (*porcine gastric mucosa*, Sigma-Aldrich), albuminę jaja kurzego (cz.d.a, POCH) i odczynnik Folina-Ciocalteu (Merck). Roztwór pepsyny przygotowano rozpuszczając 16 g pepsyny w 100 ml 0,1 N HCL. W doświadczeniu użyto 1% roztwór albuminy.

Aktywność enzymu oznaczano na podstawie ilości powstałego produktu rozpadu albuminy z odczynnikiem Folina-Ciocalteu.

Układy reakcyjne zawierające mieszaninę: 1 ml roztworu pepsyny, 1 ml roztworu albuminy, 1 ml wody dejonizowanej i 1 ml roztworu leku inkubowano w temp. 40°C przez 5 min. Próbkę odniesienia stanowił układ z 1 ml wody zamiast roztworu leku. Reakcję enzymatyczną przerywano dodając 2 ml odczynnika strącającego białko (5% TCA) i dalej inkubowano w tej samej temperaturze przez 20 min. Próbkę wirovano przy prędkości 3000 obrotów/min. Następnie pobrano 1 ml supernatantu, do którego dodano 5 ml roztworu Na₂CO₃ o stężeniu 0,2 mol/l oraz 1 ml wodnego roztworu odczynnika Folina-Ciocalteu (1:5, v/v). Następnie mieszaninę inkubowano w temp. 40°C przez 20 min po czym dokonano pomiaru absorpcji przy długości fali $\lambda=625$ nm za pomocą spektrofotometru Specol 20. Aktywność enzymu wyrażono w jednostkach aktywności proteolitycznej (JAP), którą obliczono według wzoru [6]:

$$JAP/ml = A \times V/A_1 \times t = 4,938 \times 10^{-4} \times A$$

gdzie:

A - absorpcja próbki badanej

A₁ - absorpcja 1 mR tyrozyny (1620)

V - objętość roztworu z enzymem (ml)

t - czas reakcji enzymatycznej (min)

Pomiar wykonano wobec próby odczynnikowej. Dla każdego układu reakcyjnego wykonano po 10 próbek równoległych, obliczając wartości średnie i odchylenia standardowe. Do weryfikacji wyników zastosowano test dla prób niezależnych, przy poziomie istotności $\alpha=0,05$, wykorzystując program komputerowy Statistica 7.0.

Tabela 1. Aktywność pepsyny w zależności od stężenia leków hipotensyjnych

Lek	Substancja aktywna	Stężenie substancji aktywnej (%)	JAP (10^{-6} /ml)	% inhibicji (-) lub aktywacji (+)	Poziom istotności*
Prestarium	Perindopril z arginina	0,0	44,4 ± 8,2	-	-
		0,1	46,9 ± 4,8	5,63 (+)	n.i.
		0,2	46,9 ± 4,9	5,63 (+)	n.i.
		0,5	88,9 ± 10,6	100,2 (+)	<0,01
Cardilopin	Amlodipina	0,0	46,9 ± 7,8	-	-
		0,1	66,7 ± 6,3	42,2 (+)	<0,01
		0,2	121,0 ± 23,3	158,0 (+)	<0,001
		0,5	138,3 ± 22,6	194,9 (+)	<0,001
Tertensif	Indapamid	0,0	46,9 ± 10,1	-	-
		0,008	64,2 ± 7,4	36,9 (+)	<0,05
		0,03	64,2 ± 9,2	36,9 (+)	<0,05
		0,08	71,6 ± 9,1	52,7 (+)	<0,01

* różnice statystyczne w stosunku do grupy odniesienia (stężenie 0,0%)

* significantly differences vs. control group (concentration 0.0%)

n.i. - nie istotne statystycznie; n.i. - not significant

Wyniki

W tabeli 1. przedstawiono wyniki uzyskane w omawianym doświadczeniu. Stwierdzono, że każdy z analizowanych leków hipotensyjnych wpływał na wzrost aktywności pepsyny w warunkach *in vitro*. Najniższe zastosowane stężenia perindoprilu z arginina (Prestarium): 0,1 i 0,2 % nie wywołały istotnego wzrostu aktywności enzymu, podczas gdy stężenie 0,5% substancji czynnej doprowadziło do stuprocentowego wzrostu aktywności pepsyny w badanym układzie. Amlodypina (Cardilopin) powodowała wzrost aktywności pepsyny w każdym analizowanym stężeniu, przy czym im wyższe stężenie leku było zastosowane, tym wyższą aktywność pepsyny obserwowano (od 42% do 195%). Indapamid (Tertensif) również spowodował znaczący wzrost aktywności pepsyny w roztworze - stężenia 0,008 i 0,03% o 37%, a stężenie 0,08% - o 53%.

Omówienie wyników

Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że badania wpływu leków hipotensyjnych na aktywność enzymów trawiennych są nieliczne.

W literaturze dotyczącej farmakoterapii perindoprilu, amlodypiny i indapamidu nie znaleziono prac, w których poruszano by problem dotyczący wpływu stosowanych leków na aktywność enzymów trawien-

nych, stan odżywienia pacjentów, czy biodostępność składników odżywczych. W niniejszej pracy stwierdzono wyraźny wzrost aktywności pepsyny w obecności analizowanych leków.

Należy jednak podkreślić, że uzyskane wyniki odnoszą się do układu modelowego *in vitro* i nie uwzględniają szeregu czynników występujących w warunkach organizmu żywego. Przyjęty w doświadczeniu model oraz zakres przeprowadzonych badań nie pozwalają stwierdzić jaki jest mechanizm interakcji leków z pepsyną. Być może cząsteczki analizowanych leków wiążą się bezpośrednio z białkiem enzymu lub substratem, albo z obydwoma tymi reagentami równocześnie, tworząc aktywne komponenty, które następnie ulegają łatwiejszemu rozpadowi. Poza tym kwaśne środowisko może prowadzić do zmiany rozkładu ładunków w cząsteczkach leku, co z kolei może poprzez jakiś nieznany mechanizm zwiększyć wydajność tworzenia się kompleksów enzym-substrat, a poprzez to zwiększyć wydajność proteolityczną pepsyny.

Z obserwacji działań niepożądanych analizowanych leków hipotensyjnych wynika, że tylko niewielki odsetek stosujących je pacjentów zgłasza problemy związane z układem pokarmowym. U niewielkiego odsetka pacjentów stosujących indapamid obserwowano występowanie biegunek, zapań, bólów żołądka [1]. Stwierdzone działania niepożądane amlodypiny były niewielkie i w obrębie układu pokarmowego obejmowały zapańca i nudności [7,8]. Objawy niepożądane

perindoprilu ze strony przewodu pokarmowego nie były zbyt częste. Najczęściej są to niegroźne nudności, wymioty, biegunka lub zaparcia [9,10].

W badaniach innych Autorów stwierdzono wpływ perindoprilu na wzrost aktywności enzymów komórkowych [11]. Perindopril uważany jest za lek bezpieczny, nie wpływający na profil lipidowy i poziom glukozy we krwi [12]. Niniejsze badanie wydaje się jednym z nielicznych, w którym analizowano wpływ tego leku na procesy trawienia. Biorąc pod uwagę problematykę badań dotyczących oddziaływania leków hipotensyjnych na układ pokarmowy należy jeszcze wymienić badania Iakubowa i Usmanowej [13]. Wspomniani Autorzy wykazali, że inhibitory konwertazy angiotensyny mogą chronić błonę śluzową żołądka przed szkodliwym działaniem niesteroidowych leków przeciwnzapalnych.

W związku z tym, że w niniejszym badaniu wpływu leków hipotensyjnych na aktywność enzymów trawiennych otrzymano interesujące wyniki, których nie można jednak przedyskutować z innymi pracami, planuje się poszerzyć skalę badania o większą grupę

leków oraz enzymów trawiennych. W celu potwierdzenia uzyskanych wyników *in vitro* Autorzy planują również przeprowadzenie badań doświadczalnych *in vivo*.

Wnioski

1. Perindopril, indapamid oraz amlodipina w badanym zakresie stężeń powodują wzrost aktywności pepsyny w warunkach *in vitro*.
2. Przypuszcza się, że analizowane leki hipotensyjne mogą wpływać na procesy trawienne w organizmie.

Adres do korespondencji:

Joanna Suliburska
Katedra Higieny Żywności Człowieka
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 31; 60-624 Poznań
Tel.: (+48 61) 8487334
E-mail: jsulibur@up.poznan.pl

Piśmiennictwo

1. Jerzy Głuszek (red.). Współczesna terapia nadciśnienia tętniczego. Poznań: Termedia Wydawnictwo Medyczne; 2008.
2. Derwińska M. Indapamid w walce z nadciśnieniem. *Farmacja Praktyczna* 2009; 6:28-30.
3. Panaszek B. Leki blokujące enzym konwertujący angiotensynę (inhibitory ACE) jako przyczyna obrzęku naczynioruchowego. *Terapia* 2006;2:6-7.
4. Klocek M. Amlodipina i werapamil — wpływ na występowanie działań niepożądanych oraz samopoczucie pacjentów z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym. *Nadciśnienie Tętnicze* 2002; 6:83-90.
5. Rekś L, Kozłowska M, Kozłowski D. Połączenie perindopril-indapamid w terapii hipotensyjnej w świetle aktualnych danych z prób klinicznych. *Geriatrics* 2008;2:267-75.
6. Krejpcio Z, Wójciak RW. The influence of Al ions on pepsin and trypsin activity *in vitro*. *Pol J Environ Stud* 2002;11:251-4.
7. Bichan NA, Teplakov AT. Effectiveness and safety of amlodipine in secondary prevention in patients with myocardial infarction. *Klin Med* 2002;80:28-31.
8. Terrachini V, Canale C, Lonati A i wsp. A comparison between amlodipine and nifedipine retard in patients with essential arterial hypertension. *Clin Ter* 1992;140:383-9.
9. Konieczny G, Posadzy-Małaczynska A, Tykarski A. Działania niepożądane inhibitorów konwertazy angiotensyny. *Choroby Serca i Naczyń* 2006;3:140-8.
10. Ol'binskaia LI, Zheleznykh EA. Effects of perindopril and its combination with indapamide on risk stratification in patients with hypertension *Ter Arkh* 2001;73:22-4.
11. Jiang QJ, Xu G, Mao FF, Zhu YF. Effects of combination of irbesartan and perindopril on calcineurin expression and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity in rat cardiac pressure-overload hypertrophy. *J Zhejiang Univ Sci B* 2006;7:228-34.
12. Clark LT. Safety profile of perindopril. *Am J Cardiol* 2001;88: 36i-40i.
13. Iakubov AV, Usmanova ShE. Prophylactic use of angiotensin-converting enzyme inhibitors in indomethacin-induced ulcer and erosion lesions of the stomach. *Lik Sprava* 2004;2:47-9.