

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ГИСТАМИНЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ ЖЕЛУДКА

В. Г. ИВАШКИН, Г. А. МИНАСЯН, О. Г. АГБЕВА,
Т. Н. КОНИЧЕВА, В. М. АРУТЮНЯН

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Ленинград
Ерванский государственный медицинский институт,
кафедра внутренних болезней № 1

Аннотация — Сравнивались различные методики получения препаратов гистаминчувствительной аденилатциклазы. Показано, что максимальную активность аденилатциклазы обеспечивает инкубация париетальных клеток желудка в лизирующем буфере с последующим многократным пропусканием через иглу.

Անոտացիա — Համեմատված են ադենիլատցիկլազայի ակտիվությանը (արտադրված և անալիզի պարբերությամբ) հարմար թափանցիկ և կրակային Ֆրանցիաների անալիզի մի քանի մեթոդներ: Ցույց է տրված, որ ադենիլատցիկլազայի առավելագույն ակտիվությունը եկապիտում է կրակային թափանցիկությանը: Անալիզի արագացում էն այդ Ֆրանցիաների անալիզի ուղիները:

Abstract — Various ways of receiving of gastric parietal cells and membrane fractions, enriched by adenylatcyclase activity were compared. It was shown that the maximum activity of enzyme provided the using of lytic system and crossing through medical needle.

Ключевые слова: слизистая оболочка желудка, аденилатциклаза.

Изучение аденилатциклазы (АЦ), регулируемой гистамином, только началось. В литературе имеются данные о некоторых свойствах АЦ клеток слизистой желудка ряда видов млекопитающих и влиянии на активность этого фермента различных гормонов и простагландинов [1—3, 5, 7]. Однако в целом данные об этом важном ферменте характеризуются фрагментарностью и неполнотой. Между тем использование АЦ в качестве фермента-мишени для исследования влияния различных фармакологических веществ имеет большое практическое значение, поскольку позволяет резко повысить эффективность научных поисков, в частности, в гастроэнтерологии. При этом очень важен выбор метода, позволяющего получать препараты с высокой аденилатциклазной активностью.

В данном исследовании приведены результаты сравнения аденилатциклазной активности ферментных препаратов при различных способах их получения.

Материал и методика Работа выполнялась в 1984—86 гг. Препараты, обогащенные париетальными клетками из слизистой оболочки желудка крыс, получали по модифицированному методу Левина [6]. В опытах использовали беспородных крыс (150—200 г), наркотизированных перед операцией удаления желудка. Удаленный желудок освобождали от содержимого, промывали охлажденным физиологическим раствором, накладывали лигатуры по кардиальному и пилорическому сфинктерам, выворачивали слизистую оболочку наружу, вновь промывали солевым раствором, после че-

го полость, обрамленную серозной оболочкой, заполняли раствором протеолитического фермента—трипсы (4 мг/мл) и тщательно перевязывали. Изолированный желудок инкубировали в солевом растворе при 37° в течение 20 мин в термостатированном сосуде, помещенном на магнитную мешалку. После окончания инкубации клетки отделяли центрифугированием (1000 об/мин, К-23), суспендировали, подсчитывали на счетчике Коултера. Из одного желудка крысы среднего размера получали в среднем 6×10^6 клеток. Жизнеспособность клеток, определяемая по трипановому синему, составляла не менее 90—98%. Parietalные клетки идентифицировали под световым микроскопом либо непосредственно в препарате (так как они легко отличимы от других клеток), либо после гистохимического окрашивания на сукцинатдегидрогеназу.

Полученные париетальные клетки разрушали различными методами: ресуспендированием в лизирующем буфере—трис-HCl—20 mM (pH 7.4), ДТТ—1, ЭДТА—1, $MgCl_2$ —3 mM—с последующим многократным пропусканием суспензии через медицинскую иглу, замораживанием в жидком азоте с последующим оттаиванием и повторением цикла; озвучиванием на УЗДН; ручным гомогенизированием в гомогенизаторе стекло/тефлон. Активность ферментного препарата определяли по количеству образованного сАТР после инкубации в среде, содержащей АТР-регенерирующую систему и ингибитор фосфодиэстераз. сАТР определяли по методу Гильмана [1]. Поскольку в качестве критерия нативности препарата АЦ обычно используют зависимость их активности от различных стимуляторов, в качестве стимулятора использовали гистамин.

Результаты и обсуждение. Результаты оценки степени нативности АЦ в клетках, разрушенных разными способами, приведены в таблице.

Нативность гистаминзависимой аденилатциклазы в париетальных клетках желудка, разрушенных различными способами

Способ разрушения клеток	Стимуляция активности аденилатциклазы (в процентах от базальной)	
	гистамин	фтористый натрий
Озвучивание (1 с, 3 Вт)	75	1 100
Замораживание	100	1 000
Гомогенизация	135	1 300
Инкубация в лизирующем буфере и пропускание через иглу	300	1 100

Использование наиболее мягких условий разрушения клеток (инкубация в лизирующем буфере с пропусканием через иглу) обеспечивает максимальную нативность гистаминчувствительной АЦ, о чем свидетельствует относительно высокая стимуляция фермента гистамином. Другие методы разрушения клеток приводят к резкому снижению гистаминовой стимуляции. Уровень стимуляции фторидом практически не зависит от способа разрушения клеток.

Центрифугирование полученных после инкубации в лизирующем буфере клеточных гомогенатов при различных ускорениях (10, 20 и 30 тыс. g) позволяет получать мембранные фракции, по-разному обогащенные гистаминчувствительной АЦ (рис. 1).

Установлено, что только в грубой мембранной фракции уровень базальной и гистаминстимулированной активности достаточно высок. Во фракциях, полученных при ускорениях 20 000 и 30 000 g, активность фермента низка. Относительно высокий уровень фторидной стимуляции, характерный для фракции, полученной при 30 000 g, указывает на ча-

стичное разобшение компонентов аденилатциклазной системы в этом препарате.

На рис. 2 представлены данные, свидетельствующие об активности клеточного гомогената, полученного путем мягкого лизиса париетальных клеток и грубой мембранной фракции, осаждаемой при 10 000 г. Фактически по своим свойствам эти препараты весьма близки. Уровень

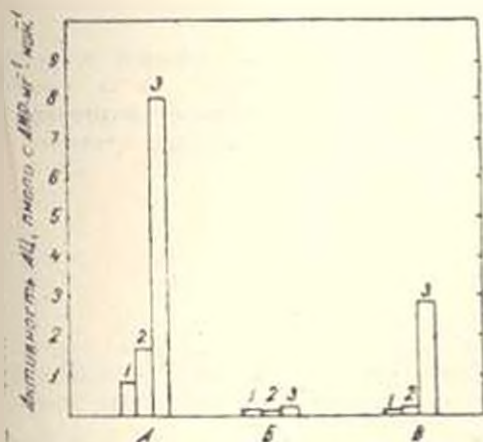


Рис. 1.

Рис. 1. Влияние гистамина (2) и ионов фтора (3) на стимуляцию базальной активности (1) аденилатциклазы, содержащейся в мембранных фракциях, полученных после центрифугирования клеточного гомогената при 10 000 (А), 20 000 (Б) и 30 000 г (В). Содержание белка в пробах—60, 55 и 50 мкг соответственно.

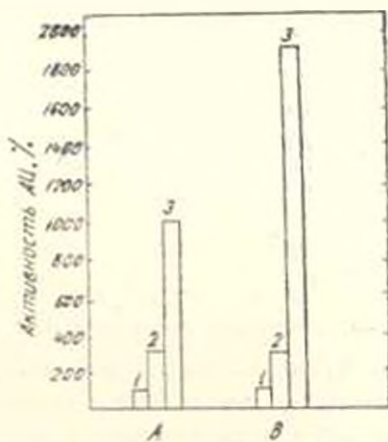


Рис. 2.

Рис. 2. Сравнение аденилатциклазной активности клеточного гомогената (А) и грубой мембранной фракции (Б) в отсутствие эффектора (1), в присутствии гистамина (2) и фторидов (3). Содержание белка в пробе—80 (А) и 70 мкг (Б).

гистаминовой стимуляции в них достаточно высок, что свидетельствует о сохранении способности фермента реагировать повышением активности на введение гормона. Однако более высокий эффект фторидных ионов при воздействии на грубые мембранные фракции указывает на определенное денатурирующее влияние процедуры очистки фермента.

Как известно, основным условием корректного определения активности фермента является знание характера зависимости его активности от содержания белка. Зависимость активности АЦ от содержания белка в пробе представлена на рис. 3, данные которого свидетельствуют о существовании линейной зависимости «активность—белок» при количестве белка в пробе в пределах 50—180 мкг.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать следующие выводы.

Максимальную нативность гистаминчувствительной АЦ в препарате обеспечивает инкубация париетальных клеток желудка в лизирующем буфере с последующим многократным пропусканием через иглу, в то время как другие способы разрушения (замораживание—оттаивание в жидком азоте, ручное гомогенизирование, озвучивание) приводят к значительной инактивации фермента.

Уровень базальной и гистаминстимулированной активности АЦ наиболее высок в грубых мембранных фракциях клеток, полученных при центрифугировании клеточных гомогенатов при ускорении 10 тыс. g.

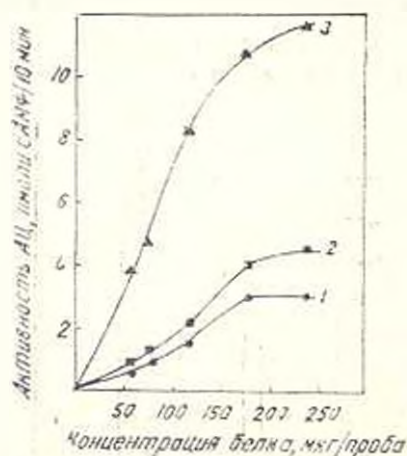


Рис. 3 Зависимость активности аденилатциклазы от содержания белка в пробе (1—базальная, 2—гистаминстимулированная, 3—фторидстимулированная активность).

При более высоких скоростях центрифугирования (20 и 30 тыс. g), активность фермента резко падает из-за разобшения в препарате компонентов аденилатциклазной системы.

При содержании белка в пробе в пределах 50—180 мкг существует линейная зависимость между активностью АЦ и содержанием белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаиров М. М. и соавт. Биохимия, 6, 1035—1041, 1983.
2. Dosua T. P. Gastroenterology, 71, 904—912, 1979.
3. Gespach C. et al. Biochem. Biophys. Acta, 729, 7—12, 1982.
4. Gittman A. G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 67, 305—31, 1970.
5. Leulitzki A. J. Receptor Res., 4, 399—403, 1984.
6. Lewin et al. Biol. Gastroenterol., 7, 139—144, 1971.
7. Thompson W. J. et al. Amer. J. Physiol., 1, 76—84, 1981.

Поступило 21.1.1987 г.