

УДК 615.036.8:612

МЕДИЦИНА

В. Т. Ивашкин, Г. А. Минасян, О. Г. Агеева, Т. Л. Коничева, В. М. Арутюнян

Влияние ионов натрия, калия, кальция, магния, марганца и анионов фтора на активность гистаминчувствительной аденилатциклазы париетальных клеток желудка крысы

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР К. Г. Карагезяном 31/III 1987)

Ионы металлов являются мощными модификаторами активности мембранного фермента аденилатциклазы (АЦ), который активно участвует в регуляции желудочной секреции соляной кислоты. Это действие АЦ осуществляется посредством катализирования превращения АТФ в цАМФ; последний, влияя на ферменты-мишени внутри клетки, увеличивает продукцию ионов  $H^+$  ( $1-2$ ). Поэтому путем модулирования активности желудочной АЦ возможно регулировать такой важный процесс, как секреция HCl. Однако степень изученности гистаминчувствительной АЦ желудка и особенно влияния на нее ионов металлов недостаточна. Учитывая важность этого вопроса, нами проведено изучение влияния ионов ряда металлов ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ) и аниона фтора ( $F^-$ ) на активность гистаминчувствительной АЦ париетальных клеток желудка крысы.

Препараты, обогащенные париетальными клетками из слизистой оболочки желудка крыс, получали модифицированным методом Левина (4). 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 слизистой оболочкой наружу, вновь промывали солевым раствором, после чего полость, образованную серозной оболочкой, заполняли раствором протеолитического фермента—проназы (4 мг/мл) и тщательно перевязывали. Изолированный желудок инкубировали в солевом растворе при  $37^\circ C$  в течение 30—90 мин в термостатированном сосуде, помещенном на магнитную мешалку. После окончания инкубации отделившиеся клетки собирали и их суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр. Клетки отделяли центрифугированием (1000 об/мин. К—23), суспендировали и количество их подсчитывали в камере Горяева или на счетчике Коултера. Из одного желудка крысы получали в среднем  $6 \times 10^6$  клеток. Жизнеспособность клеток по трипановому синему составляла не менее 95—98%. Париетальные клетки идентифицировали под световым микроскопом либо непосредственно в препарате, так как они легко отличимы от других клеток.

Париетальные клетки разрушали ресуспендированием в лизирующем буфере состава трис-HCl 20мМ, рН 7,4, ДТТ 1мМ, ЭДТА 1мМ, MgCl<sub>2</sub> 3мМ с последующим многоразовым пропусканием суспензии через медицинскую иглу. Активность ферментного препарата определяли по количеству образованного цАМФ после инкубации в среде, содержащей АТФ-регенерирующую систему и ингибитор фосфодиэстераз. цАМФ определяли по методу Гильмана (5).

Добавление ионов Mg<sup>++</sup> в реакционную среду существенно увеличивало активность АЦ (на 450%), при этом полумаксимальная активация АЦ достигалась при содержании ионов магния в среде, равном 7,5 мМ, максимальная же активация АЦ наблюдалась при содержании этого катиона, равном 20 мМ (рис 1, А). Магний считается

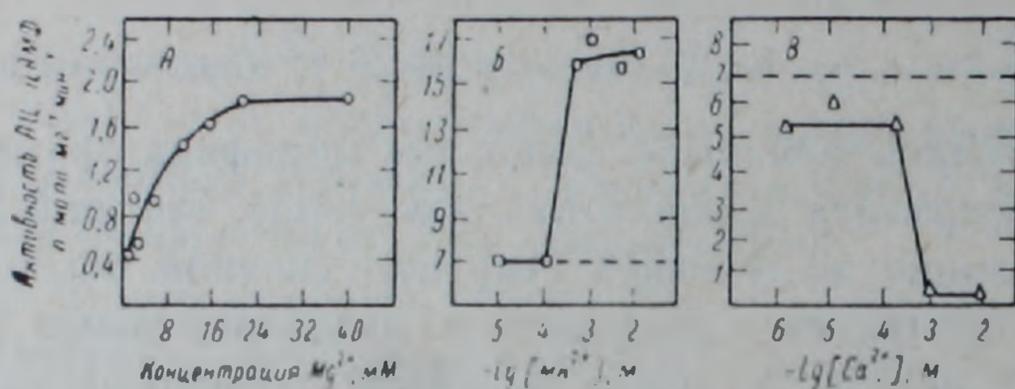


Рис. 1. Влияние ионов магния (А), марганца (Б) и кальция (В) на активность аденилатциклазы. Содержание белка в пробах 85 мкг

одним из наиболее важных ионов, поскольку входит в состав фермент-субстратного комплекса Mg—АТФ. Однако этой его ролью нельзя объяснить факт дальнейшей активации фермента после того, как АЦ оказывается полностью насыщенным ионами Mg<sup>++</sup>. Известно, что Mg<sup>++</sup> например, повышает сродство рецепторов к гормонам, катехоламинам и их агонистам, он необходим для образования тройного комплекса агонист-рецептор—N-белок.

Активирующий эффект марганца проявлялся в диапазоне более низких концентраций (10<sup>-4</sup> — 10<sup>-3</sup> М, рис. 1, Б). Марганец, как и магний, активировал АЦ в концентрациях, соизмеримых с концентрацией энергетического субстрата—АТФ.

В отличие от ионов магния и марганца, ионы кальция оказывали ингибирующий эффект на активность фермента (рис. 1, В). Влияние Ca<sup>++</sup> на АЦ оказалось двойным: в высоких концентрациях кальций—мощный ингибитор фермента, а в низких—активатор кальций-калмодулинзависимой АЦ. Предполагается, что ингибирование АЦ ионами кальция реализуется через особые кальцийсвязывающие сайты, расположенные в районе N-белка и (или) каталитической субъединицы. В наших опытах Ca<sup>++</sup> в концентрации 1 мМ полностью ингибировал фермент, а полумаксимальное подавление активности наблюдалось при концентрации 3×10<sup>-4</sup> М.

Исследование фермент-субстратных взаимоотношений позволило определить K<sub>м</sub> для АТФ—Mg<sup>++</sup> изучить кооперативность реакции и выяснить, как на процесс каталитического превращения АТФ в цАМФ влияет добавление ионов фтора (рис. 2). Величина K<sub>м</sub>, характеризующая сродство фермента к субстрату, составляла 1,7×10<sup>-4</sup>М, а взаимо-

действие фермента с АТФ— $Mg^{++}$ -комплексом носило характер отрицательной кооперативности ( $n < 1$ ). Добавление ионов фтора не влияло на величину коэффициента, но существенно увеличивало  $V_{\max}$  данной ферментативной реакции.

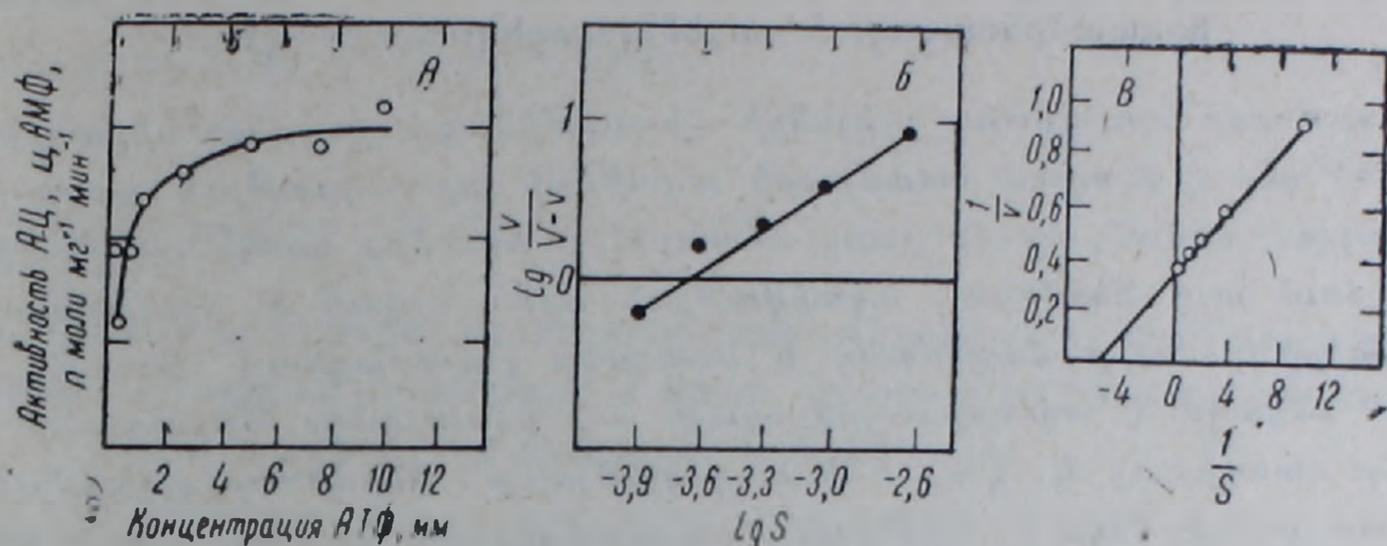


Рис. 2. График Лайнуивера—Берка для определения сродства гистамин-зависимой АЦ к субстрату АТФ (А, В) и определение коэффициента Хилла для этой реакции (Б). Содержание белка 110 мкг в пробе

Ионы одновалентных металлов,  $K^+$  и  $Na^+$ , существенные для взаимодействия гистамина с рецепторами, в высоких концентрациях по-разному влияли на активность АЦ. Если ионы  $Na^+$  при переходе от концентрации 100 мМ к концентрации 200 мМ вызывали некоторое повышение активности АЦ, то такое же увеличение содержания ионов  $K^+$  не приводило к активации фермента (рис. 3, А).

Изучение влияния ионов фтора продемонстрировало его мощное активирующее действие на фермент (рис. 3, Б). Увеличение содержа-

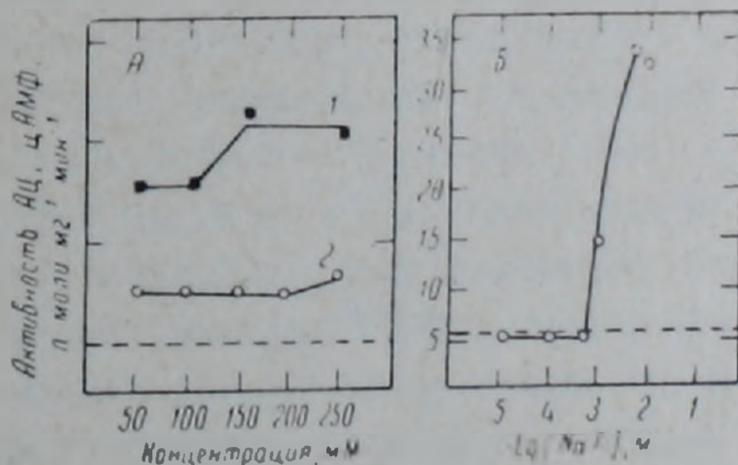


Рис. 3. Влияние ионов натрия (А, 1), кальция (А, 2) и фтора (Б) на активность аденилатциклазы

ния этих ионов в среде в диапазоне концентраций 1—10 мМ приводило к резкой активации фермента, причем полумаксимальная стимуляция активности достигалась при концентрации  $F^-$  в среде, равной 1,5 мМ. Дальнейшее повышение содержания ионов фтора в среде приводило к некоторому ингибированию АЦ.

Таким образом, ионы двухвалентных металлов выступают в роли активаторов ( $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ) или ингибиторов ( $Ca^{++}$ ) активности АЦ. Влияние ионов одновалентных металлов ( $Na^+$ ,  $K^+$ ) на активность АЦ менее значительно. В то же время ионы фтора оказывают на АЦ мощное активирующее действие.

Ереванский государственный медицинский институт  
Военно-медицинская Ордена Ленина Краснознаменная академия  
им. С. М. Кирова

Նատրիումի, կալիումի, կալցիումի, մագնիումի, մանգանի իոնների և ֆտորի անիոնի ազդեցությունն առնետի ստամոքսի պարիետալ բջիջների հիստամինազգայուն ադենիլատցիկլազայի վրա

Ստամոքսի պարիետալ բջիջների հիստամինազգայուն ադենիլատցիկլազան մեծ դեր է խաղում ստամաքսի աղաթթվի արտադրության պրոցեսում:

Ցույց է տրված, որ մի շարք մետաղների իոնները զգալի ազդեցություն են գործում այդ ֆերմենտի ակտիվության վրա: Նշվում է, որ երկվալենտ մետաղների իոնների մագնիումը և մանգանը բարձրացնում են իսկ կալցիումը՝ ընկճում է ադենիլատցիկլազայի ակտիվությունը: Միավալենտ մետաղներ նատրիումի և կալիումի ազդեցությունը ֆերմենտի ակտիվության վրա շատ ավելի մեղմ է: Միևնույն ժամանակ ֆտորի անիոնը հզոր խթանիչ ներգործություն ունի ադենիլատցիկլազայի ակտիվության վրա:

#### ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- <sup>1</sup> F. Brennan e. a., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., v. 3, p. 725—730 (1975). <sup>2</sup> J. B. Harris, D. Alonso, Fed. Proc., v. 24, p. 1368—1376 (1965). <sup>3</sup> M. Rodbell e. a., in: Advances in cyclic nucleotide research, New York, Raven Press, v. 5, p. 3—29 (1975). <sup>4</sup> A. Lewin e. a., Biol. Gastroenterol. (Paris), v. 7, p. 139—144 (1974). <sup>5</sup> A. G. Gilman, Proceed. Nat. Acad. Sci. USA, v. 67, p. 305—313 (1970).