

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1990

Том 36 выпуск 2

Внимание! Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

Voprosy meditsinskoi khimii

ISSN 0042-8809

1990

Volume 36 issue 2

Attention! OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

А.-Т. О. Кенгсепп, Л. Я. Тяхепылд

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВ, Na, K-АТРАЗЫ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА ЧЕЛОВЕКА И КРЫСЫ

Тартуский государственный университет

В основе уникального процесса образования и секреции соляной кислоты обкладочными клетками слизистой оболочки желудка лежит трансмембранный транспорт протонов, связанный с функционированием специфического протонного насоса — Na, K-АТРАЗы [7, 17]. Этот фермент обнаружен в микросомальной фракции преимущественно обкладочных клеток слизистой оболочки желудка лягушки [6, 9], кролика [3, 6], собаки [12], свиньи [6, 18] и крысы [6, 10]. К настоящему времени Na, K-АТРаза в кристаллическом состоянии получена из слизистой оболочки свиньи и кролика [15], исследованы возможные механизмы функционирования этого фермента [7]. Относительно менее изучены распределение и функционирование Na, K-АТРАЗы в слизистой оболочке желудка человека. Установлено лишь наличие Na, K-АТРАЗы в слизистой оболочке желудка трупа человека с накоплением в тех же фракциях (при градиентном центрифугировании), как и у других животных [16]. На материале биопсии из желудка человека показано, что ингибиторы секреции (производные бензимидазолов) подавляют активность данного фермента [4]; найдена более низкая активность фермента при гипоацидном состоянии [2].

Целью настоящей работы было сравнительное изучение распределения активности Na, K-АТРАЗы в субклеточных фракциях слизистой оболочки желудка человека и крысы и изучение зависимости активности фермента от pH и концентрации активирующих ионов калия в микросомальной фракции.

Методика

Слизистая оболочка желудка человека была получена при гастрэктомии по поводу рака желудка. Транспортировку ткани в лабораторию осуществляли в ледяном физиологическом растворе. Слизистую оболочку обрабатывали по методу [8] для получения обогащенной фракции обкладочных клеток. Гомогенат (1:10) готовили в среде выделения, содержащей 20 мМ трис-HCl-буфер, pH 7,05, 0,25 М сахарозу и 1 мМ ЭДТА-трис.

Белых крыс декапитировали после 24-часового голодания, извлекали желудок и промывали холодной водой. Обработка и гомогенизирование были аналогичны описанным выше для слизистой оболочки желудка человека.

Гомогенаты центрифугировали на холоде при 1000 г в течение 10 мин для осаждения неразрушенных клеток и ядер. Митохондриальную фракцию осаждали центрифугированием полученной надосадочной жидкости при 12 000 г в течение 10 мин, микросомальную фракцию — 22 500 г в течение 90 мин.

Активность Na, K-АТРАЗы определяли в среде, содержащей 30 мМ имидазол-HCl-буфер, pH 7,4, 2 мМ MgCl₂, 2 мМ АТР-трис, 20 мМ KCl и 0,7 мл ферментного препарата (общий объем 1,5 мл). Контрольными служили пробы без KCl. Реакцию останавливали, добавляя 0,15 мл 5 % додецилсульфата натрия [20], содержание Φ_n , освобожденного в ходе реакции, определяли по методу [5], применяя в качестве восстановителя тиомочевину [1]. Активность Na, K-АТРАЗы выражали в микромолях Φ_n на 1 мг белка в минуту.

Количество белка определяли по методу [13].

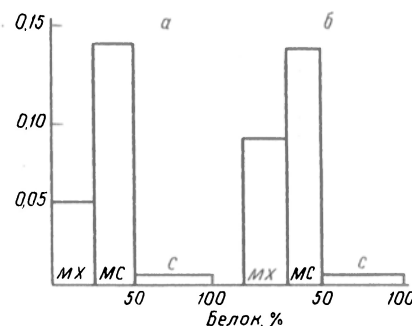


Рис. 1. Активность Na, K-АТРАЗы (в мкмоль Φ_n на 1 мг белка в минуту) в субклеточных фракциях слизистой оболочки желудка человека (а) и крысы (б) (а — средние из 7, б — из 9 опытов).

МХ — митохондриальная фракция; МС — микросомальная фракция; С — супернатант.

Результаты и обсуждение

Фракционирование гомогенатов слизистой оболочки желудка человека и крысы путем дифференциального центрифугирования показало (рис. 1), что активность Na, K-АТРАЗы как у человека, так и у крысы локализована преимущественно в микросомальной фракции. При этом нет существенной разницы в активности этого фермента у человека и крысы. Преимущественная локализация Na, K-АТРАЗы в микросомальной фракции слизистой оболочки желудка у крысы показана и в других исследованиях [6, 10, 19]. Активность такого же порядка обнаружена в микросомальных мембранах градиентной фракции H₂ слизистой оболочки желудка человека, полученного через 6 ч после смерти [16]. Согласно данным, представленным на рис. 1, у крыс в митохондриальной фракции также была найдена заметная Na, K-АТРазная активность, составляющая 62 % от ее активности в микросомальной фракции. Активность Na, K-АТРАЗы в митохондриальной фракции у человека составляла 35,7 % от таковой в микросомальной фракции. По данным литературы [7], значительная часть активности Na, K-АТРАЗы в митохондриальной фракции появляется при стимуляции желудочной секреции в связи с уплотнением при этом везикул. Поскольку в наших опытах как у людей, так и у крыс стимуляция секреции была исключена, относительно высокую активность Na, K-АТРАЗы в митохондриальной фракции, очевидно, можно объяснить загрязнением этой фракции микросомами в ходе выделения. Активность фермента в супернатанте

Таблица 1

Влияние ДОХ, добавленного к среде гомогенизирования, на активность Na K-АТРАЗы слизистой оболочки желудка ($M \pm m$)

Объект исследования	Активность Na, K-АТРАЗы, мкмоль Φ_n на 1 мг белка в минуту	
	без ДОХ	с 0,1 % ДОХ
Слизистая оболочка желудка:		
человека	0,159 ± 0,044 (3)	0,033 ± 0,019 (3)
крысы	0,066 ± 0,031 (3)	0,013 ± 0,009 (3)

$p < 0,05$
 $p > 0,05$

Таблица 2

Влияние убаина на активность Na, К-АТФазы слизистой оболочки желудка крысы ($M \pm m$)

Компоненты системы	Активность Na, К-АТФазы, мкмоль Φ_{II} на 1 мг белка в минуту
K^+ 20 мМ	$0,046 \pm 0,011$ (4)
K^+ 20 мМ + убаин $1,5 \cdot 10^{-3}$ М	$0,056 \pm 0,029$ (4) $p > 0,05$

как у человека, так и у крысы оказалась ничтожной, что находится в соответствии с данными работы [19], проведенной на крысах.

В ходе исследований полученных препаратов Na, К-АТФазы слизистой оболочки желудка были сделаны следующие наблюдения. Добавление 0,1 % дезоксихолата натрия (ДОХ) к среде гомогенизирования слизистой оболочки желудка, широко применяемое для выделения мембранных ферментов [11], приводило к существенному снижению удельной активности Na, К-АТФазы микросомальной фракции слизистой оболочки желудка человека (табл. 1). В слизистой оболочке желудка крысы этот эффект был менее выраженным. При сохранении микросомальной фракции слизистой оболочки человека и крысы в виде осадка при -30°C происходило снижение активности Na, К-АТФазы, которое через 2 дня хранения составляло 70 % от исходной активности. Убаин, специфический ингибитор Na, К-АТФазы, как и в работе [16], не проявил ингибирующего действия на активность Na, К-АТФазы микросомальной фракции слизистой оболочки желудка крысы (табл. 2).

Опыты по выяснению pH-оптимума Na, К-АТФазы показали (рис. 2), что он в некоторой степени зависит от состава буферной среды. Так, при использовании 40 мМ трис-HCl-буфера pH-оптимум Na, К-АТФазы слизистой оболочки желудка человека и крысы лежит в области 7,1—7,2, а при использовании 30 мМ имидазол-HCl-буфера — в области 7,2—7,4. Из данных литературы известно, что pH-оптимум Na, К-АТФазы слизистой оболочки желудка лягушки, свиньи и собаки находится в области 7,4 [1, 5] и не отмечено зависимости от состава буферной среды. В отличие от этого показано, что pH-оптимум Na, К-АТФазы слизистой оболочки желудка свиней находится на уровне 7,0 при использовании 30 мМ имидазол-HCl-буфера [18].

Исследование активирующего влияния ионов

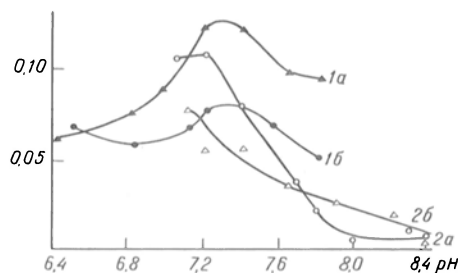


Рис. 2. Зависимость активности Na, К-АТФазы (в мкмоль Φ_{II} на 1 мг белка в минуту) слизистой оболочки желудка человека (а) и крысы (б) от pH среды при использовании 30 мМ имидазол-HCl-буфера (1) и 40 мМ трис-HCl-буфера (2).

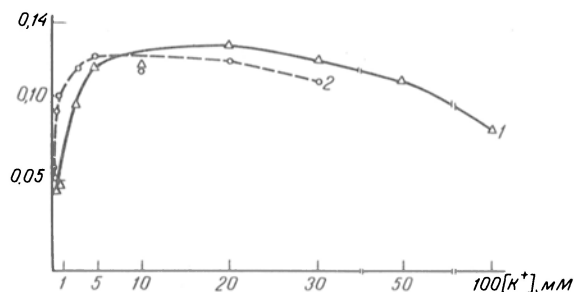


Рис. 3. Зависимость активности Na, К-АТФазы (в мкмоль Φ_{II} на 1 мг белка в минуту) слизистой оболочки желудка человека (1) и крысы (2) от концентрации ионов калия.

калия (рис. 3) на Na, К-АТФазу слизистой оболочки желудка человека показало, что оптимальной концентрацией является 20 мМ, а для фермента крысы — 5 мМ. Дальнейшее повышение концентрации ионов калия сопровождалось снижением активности фермента. По данным ряда авторов [6, 14], наиболее высокая Na, К-АТФазная активность у кролика, свиньи и крысы отмечается при 20 мМ KCl.

Изучено также влияние соотношения АТФ и ионов магния на активность Na, К-АТФазы (рис. 4), при этом установлено оптимальное соотношение 1:1 при концентрации 2 мМ, что совпадает с данными литературы [7]. При таком же соотношении АТФ и ионов магния, но в более высоких концентрациях (3, 4, 5 мМ) активность Na, К-АТФазы оказалась ниже, чем при концентрации 2 мМ.

Таким образом, активность Na, К-АТФазы в слизистой оболочке желудка у человека несколько выше, чем у крысы. В то же время по изученным параметрам (распределение по субклеточным фракциям, pH-оптимум, оптимальные концентрации ионов калия) Na, К-АТФазы слизистой оболочки желудка у человека и крысы существенно не различаются.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мартинсон Э. Э., Виллако Л. А. // Лаб. дело. — 1961. — № 12. — С. 30—32.
2. Храмцова Т. К., Ефимов В. В., Храмцов А. В. // Труды Моск. обл. науч.-исслед. клинич. ин-та. — 1981. — Т. 32, вып. 2. — С. 70—71.
3. Храмцов А. В., Оттесен Б. В. // Биохимия. — 1979. — Т. 44, № 5. — С. 781—787.
4. Fellenius E., Berglinde T., Sachs G. et al. // Nature. — 1981. — Vol. 290. — P. 159—161.
5. Fiske G. H., Subbarow Y. J. // J. biol. Chem. — 1925. — Vol. 66. — P. 375—400.
6. Forte J. G., Ganzer A. L., Ray T. K. // Gastric Hydrogen Ion Secretion / Eds D. K. Kasbekar et al. — New York, 1976. — P. 302—330.

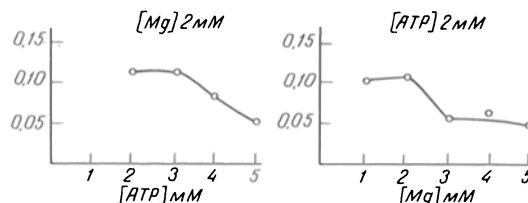


Рис. 4. Зависимость активности Na, К-АТФазы (в мкмоль Φ_{II} на 1 мг белка в минуту) слизистой оболочки желудка крысы от концентрации ионов магния и АТФ.

7. Forte J. G., Machen T. E. // Physiology of Membrane Disorders / Eds T. E. Andreoli et al.— New York, 1986.— P. 535—558.
8. Forte J. G., Ray T. K., Pouller J. L. // J. appl. Physiol.— 1972.— Vol. 32.— P. 714—717.
9. Ganzer A. L., Forte J. G. // Biochim. biophys. Acta.— 1973.— Vol. 307.— P. 169—180.
10. Im W. B., Sih J. C., Blakeman D. P., McGrath J. P. // J. biol. Chem.— 1985.— Vol. 260.— P. 4591—4597.
11. Jørgensen P. L. // Biochim. biophys. Acta.— 1982.— Vol. 694.— P. 27—68.
12. Lee D. J., Forte J. G. // Ibid.— 1978.— Vol. 508.— P. 339—356.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem.— 1951.— Vol. 193.— P. 265—275.
14. Michelangeli F., Proverbio F. // Acta physiol. scand.— 1978.— Suppl. 103.— P. 399—407.
15. Rabon E., Wilke M., Sachs G., Zampighi G. // J. biol. Chem.— 1986.— Vol. 261.— P. 1434—1439.
16. Saccomani G., Chang H. H., Mihos A. A. et al. // J. clin. Invest.— 1979.— Vol. 64.— P. 627—635.
17. Sachs G., Berglinde T. // Physiology of the Gastrointestinal Tract / Ed. L. R. Johnson.— New York, 1981.— P. 567—602.
18. Schrijen J. J., Luyben W. A. H. M., De Pont J. J. H. H. M., Bonting S. L. // Biochim. biophys. Acta.— 1980.— Vol. 597.— P. 331—344.
19. Shultz L. J., Boots C., Reimann E. M. // Ibid.— 1981.— Vol. 673.— P. 539—551.
20. Tashima Y. // Analyt. Biochem.— 1975.— Vol. 69.— P. 410—414.

Поступила 22.11.88

DISTRIBUTION AND SOME PROPERTIES OF Na⁺, K⁺-ATPASE IN HUMAN AND RAT GASTRIC MUCOSAL MEMBRANE

A.-T. O. Kengsepp, L. J. Tyakhepyld

State University, Tartu.

Subcellular fractions were isolated from homogenates of human and rat gastric mucosal membranes by means of differential centrifugation; the highest Na⁺, K⁺-ATPase activity was detected in microsomal fraction. The enzymatic activity was higher in human gastric mucosal membrane as compared with the rat tissue. Na⁺, K⁺-ATPase activity was inhibited by 0.1 % SDS added into the homogenization mixture. Oubain 1.5·10⁻³ M did not affect the enzymatic activity. The enzyme had a pH optimum in both these tissues at pH 7.2—7.4 in 30 mM imidazol-HCl buffer and at pH 7.1—7.2 in 40 mM Tris-HCl buffer. K⁺ exhibited maximal activating effect at 20 mM concentration in human gastric mucosal membrane and at 5 mM concentration in rat tissue. The ratio ATP/Mg²⁺ as 1:1 proved to be optimal at 2 mM concentration.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616-001.17-053.2-092.9-07.1616.154:577.175.624

Э. Г. Давлетов, С. А. Ельчанинова, В. Б. Розен, О. В. Смирнова

ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ТЕСТОСТЕРОНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И РЕЦЕПТОРОВ АНДРОГЕНОВ В ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОЖГОВОЙ БОЛЕЗНИ У НЕПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС

Кафедра биохимии Башкирского медицинского института, лаборатория эндокринологии биологического факультета Московского университета им. М. В. Ломоносова

Характерной особенностью патохимии термических поражений являются превалирование процессов катаболизма белков над процессами их биосинтеза и относительная недостаточность белково-анаболических процессов [5, 6, 8, 11, 13]. Принципиальную значимость эта проблема имеет

при ожоговой болезни в детском возрасте, так как рост и развитие детского организма тесно сопряжены с процессами белкового анаболизма. В связи с этим важным является вопрос о состоянии гормональной регуляции белкового обмена при термической травме.

В настоящей работе исследованы изменения концентрации в крови тестостерона — одного из важнейших анаболических гормонов и содержания рецепторов андрогенов (РА) в печени при термической травме у животных допубертатного возраста как экспериментальной модели ожоговой болезни у детей.

Методика

Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах месячного возраста массой 50—70 г, у которых под эфирным рауш-паркозом вызывали термический ожог кожи IIIa—IIIb степени площадью 23—25 % поверхности тела по методике, описанной ранее [7].

Животных забивали декапитацией в различные сроки после термической травмы. Сыворотку крови получали обычным способом. Концентрацию тестостерона определяли радиоиммунологическим методом с использованием стандартных тест-наборов фирмы «Вук-Mallinckrodt» (ФРГ). Радиоактивность проб измеряли на автоматическом смеснике проб NZ-322 фирмы «Гамма» (ВНР).

Цитозоль печени получали, как описано ранее [4], используя для гомогенизации 0,02 М трис-HCl-буфер (рН 7,8), содержащий 0,5 мМ ЭДТА, 20 мМ молибдата натрия, 0,1 мМ фенолметилсульфоилфторида, 6 мМ дитиотрептола и 0,25 М сахарозы. Конечная концентрация белка в цитозоле печени составляла 5—15 мг на 1 мл.

Содержание РА в цитозоле печени определяли, используя специфический андрогенный лиганд ³H-17-оксиметил-4,9,11-триеп-3-он (³H-R1881) фирмы «New England Nuclear» (США) с удельной радиоактивностью 3191 ГБк/ммоль и инкубируя все пробы на фоне избытка (2 мкМ) триамцинолонацетонида [4].

Количественную оценку концентрации РА цитозоля печени проводили по уровню специфического связывания при насыщающей добавке ³H-R1881 [9].

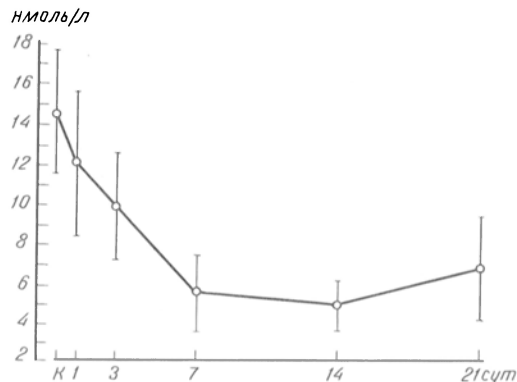
Разделение свободной и связанной форм гормона осуществляли при инкубации проб в течение 5 мин при 0—4 °С со 100 мкл 2 % угля, покрытого декстраном (0,4 %).

Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике «Mark-III» фирмы «Трасог» (США) с использованием диоксанового сцинтиллятора Брэя [10].

Содержание белка определяли методом Лоури [12].

Результаты и обсуждение

Как показали наши исследования, уровень тестостерона в сыворотке крови подопытных животных был резко снижен на протяжении всего периода исследования после термического ожога (см. рисунок), причем отчетливую статистическую



Динамика уровня тестостерона в сыворотке крови крыс после термического ожога. К — контроль.