

УДК 577.539:311

О.О. Моргасенко, асп., В.О. Чайка, асп.

ВМІСТ ЦИКЛІЧНИХ НУКЛЕОТИДІВ У ПАРІЄТАЛЬНИХ КЛІТИНАХ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ТА ГЛАДЕНЬКИХ МІОЦИТАХ ШЛУНКА ЩУРІВ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ СТРЕСОВОЇ МОДЕЛІ ВИРАЗКИ

Виявлено зміни у вмісті цАМФ і цГМФ у парієтальних клітинах і гладеньких міоцитах шлунка щурів за умов розвитку стресової моделі виразки. Порушення співвідношення цАМФ/цГМФ за умов розвитку виразки вказують на залучення цикло-нуклеотидних систем сигнальної трансдукції до механізмів виникнення досліджуваної патології.

In the case of stress ulcer development the changes of cAMP and cGMP amount occurred in rat gastric mucosal parietal cells and smooth myocytes. The changes of rate cAMP/cGMP lead to the role of signal transduction system in stress model of ulcerogenesis.

Вступ. Виразка шлунка – поширена патологія, якій приділяється велика увага в сучасній науці. Ще й досі залишаються нез'ясованими механізми розвитку цього захворювання. Регуляція роботи шлунка забезпечується нейрогуморальною системою, з якою і пов'язують розвиток стресової виразки. На клітинному рівні реакція на зовнішні фактори реалізується за участю вторинних посередників цАМФ і цГМФ, які є ключовими ланками аденілатциклазного й гуанілатциклазного каскадів відповідно.

Визначальним у розвитку виразкової хвороби шлунка є порушення рівноваги між факторами "агресії" і факторами "захисту" слизової оболонки [1]. Парієтальні клітини продукують соляну кислоту, яка в надлишку є основним агресивним фактором слизової оболонки. Важливим для правильного розуміння процесів шлункової секреції, а отже, і розвитку виразкової патології, є вивчення механізмів трансдукції сигналів у зазначених клітинах.

Скоротлива функція шлунка забезпечується шаром гладенької мускулатури, розташованим під слизовою оболонкою. Один з механізмів регуляції актин-міозинової взаємодії є фосфорилування регуляторного ланцюга міозину за участю кінази легкого ланцюга міозину, активність якої безпосередньо залежить від цАМФ [2]. У той же час і цАМФ, і цГМФ обумовлюють вихід іонів Ca^{2+} з міоцитів. Таким чином, ці вторинні посередники здійснюють вагомий вплив на функціонування і м'язового шару, і роботу шлунка в цілому.

Дослідження змін у процесах трансдукції сигналів є необхідним для з'ясування механізмів шлункової секреції, її впливу на патогенез виразкової хвороби, а також для вивчення зв'язку патогенезу зі змінами моторики шлунка. Тому метою нашої роботи було визначити зміну вмісту цАМФ і цГМФ у парієтальних клітинах слизової оболонки та гладеньких міоцитах шлунка щурів за умов розвитку стресової моделі виразки.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на білих щурах лінії Вістар обох статей масою 180–220 г, що утримувались на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до води. Стресову виразку викликали за методикою С.Д. Гройсмана та Т.Г. Каревіної [3]. Для визначення вмісту циклічних нуклеотидів брали шлунки, які морфологічно характеризувались ураженням лише слизової оболонки, наявністю крововиливів і відсутністю виражених виразкових утворень. Парієтальні клітини отримували за модифікованою методикою [4]. Гомогенат гладеньких міоцитів отримували після інкубації у присутності протеїнази К. Визначали вміст циклічних нуклеотидів у цитозолі, використовуючи Cyclic GMP [3H] Assay System і Cyclic GMP [3H] Assay System, code TRK500 (Amersham Biosciences), що забезпечують точне і специфічне визначення цАМФ і цГМФ.

Результати та обговорення. Відомо, що зміна співвідношення цАМФ/цГМФ указує на порушення в основних шляхах трансдукції сигналів. Так, зокрема, такі зміни у процесі виразкоутворення були показані для клітин слизової оболонки шлунка [5]. Раніше було встановлено зростання співвідношення цАМФ/цГМФ в антральних і фундальних відділах слизової оболонки у щурів. Цей феномен інтерпретували як можливу ознаку реконструктивних, антиульцерогенних процесів [6].

Отримані дані (табл. 1) указують на більш ніж дворазове зростання співвідношення цАМФ/цГМФ у парієтальних клітинах слизової оболонки шлунка щурів за умов розвитку стресової моделі виразки, що відбувається в основному завдяки підвищенню рівня цАМФ. Відомо, що активність H^+ , K^+ -АТФази опосередковується в основному аденілатциклазним каскадом. Таким чином, зростання вмісту цАМФ зумовлює посилення кислотної секреції і процесу виразкоутворення.

Таблиця 1. Вміст цАМФ і цГМФ у парієтальних клітинах слизової оболонки та в гладеньких міоцитах шлунка щурів при виразці

Нуклеотид	Парієтальні клітини		Гладенькі міоцити	
	Контроль	виразка	контроль	виразка
цАМФ	3,81 ± 0,11	9,04 ± 0,37	28,98 ± 0,71	3,6 ± 0,09
цГМФ	12,38 ± 0,52	13,54 ± 0,58	1,45 ± 0,05	20,08 ± 0,66
цАМФ/цГМФ	0,308	0,668	19,986	0,179

p ≤ 0,05

Існують дані про зростання цАМФ/цГМФ-відношення в клітинах слизової оболонки при утворенні експериментальної виразки шлунка у щурів. Причиною цього значного зростання – головним чином (однак не повністю) є значне падіння рівня цГМФ [6, 7]. Це можна пояснити тим, що зазначені літературні дані були отримані на загальній фракції всіх клітин слизової, серед яких вміст досліджуваних нами парієтальних клітин становить лише 10–15 %. Оскільки при патогенезі виразкової хвороби особливу роль відіграють кислотопродукуючі паріє-

тальні клітини, дослідження змін у шляхах трансдукції саме у цих клітинах є більш коректним для розуміння розвитку патології.

Відомо, що цАМФ-залежне фосфорилування інактивує кіназу легкого ланцюга міозину, що перешкоджає актин-міозиновій взаємодії. Хоча існують дані, що цАМФ стимулює, а цГМФ гальмує скорочення гладеньких м'язів деяких тканин і серцевого м'яза, тобто в певних випадках ці вторинні посередники можна розглядати як антагоністи [8]. У даному разі можна спостерігати різке зростання

цГМФ (майже в 14 разів) і значне (у 8 разів) зменшення цАМФ у міоцитах шлунка на ранньому етапі виразки порівняно з контролем. Відповідним чином цей факт має своє відображення і на зміні співвідношення цАМФ/цГМФ у досліджуваних міоцитах. Можна припустити, що зміна вмісту циклічних нуклеотидів та їхні співвідношення призведе до відповідних порушень активності скорочення гладеньких м'язів шлунка, при цьому вона зростає порівнянно з контролем.

Раніше було показано, що механізми цАМФ і цГМФ-залежної регуляції скоротливої активності гладеньких м'язів здійснюються у тісному взаємозв'язку [9]. Співвідношення цАМФ/цГМФ також опосередковує потенціал-незалежний контроль NO механічного напруження гладеньких м'язів [8].

Отримані нами дані вказують на те, що на ранньому етапі розвитку виразки в мускулатурі шлунка включаються механізми, спрямовані на стимулювання роботи скоротливого апарату, що обов'язково позначиться на роботі шлунка.

Нами було встановлено зміни співвідношення цАМФ/цГМФ у парієтальних клітинах слизової оболонки

та гладеньких міоцитах шлунка щурів за умов розвитку стресової моделі виразки. У парієтальних клітинах відбувається зростання співвідношення цАМФ/цГМФ в основному завдяки підвищенню рівня цАМФ, а в гладеньких міоцитах спостерігається зменшення співвідношення цАМФ/цГМФ за рахунок як зростання цГМФ, так і зниження цАМФ. З'ясування механізмів встановлених змін є завданням подальшої роботи.

1. Ургин А.И., Сорокин А.В., Евдокимов В.Г. // Медицинский вестник. – 2002 – № 5. 2. Остапченко Л.І. Молекулярні механізми регуляції активності циклонуклеотид- та кальційзалежних протеїніназ лімфоїдних клітин в умовах радіаційного впливу. – К., 1999. 3. Гройсман С.Д., Каревина Т.Г. О влиянии атропина на стрессорные поражения слизистой оболочки желудка у крыс. – Рукопись деп. в ВИНТИ, № 452/79, 131 с. 4. Тауров М.М., Берсумбаев Р.И., Аргутинская С.В., Салганик Р.И. // Биохимия. – 1983. – Т. 48. – вып. 6. – С1035–1041 5. Balint G.A. // Acta physiol Hung. – 1991. – Vol. 77. – № 2. – P. 153–158. 6. Balint G.A. // Acta Physiol Hung. – 1992. – Vol. 80. – № 1. – P. 81–88. 7. Tkachenko E.V., Belostotskii N.I., Varvanina G.G. // Eksp Klin Gastroenterol. – 2002. – Vol. 55. – № 8. – P. 113. 8. Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Капилевич Л.В., Медведев М.А. // Бюл. сиб. мед. – 2004 – № 1. 9. Капилевич Л.В., Носарев А.В., Ковалев И.В. и др. // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2003. – Т. 135, № 6. – С. 714–717

Надійшла до редколегії 10.09.04.

УДК 577.34(35)

К.І. Богуцька, канд. біол. наук

АТФаза АКТИВНІСТЬ АКТОМІОЗИНУ Й МІОЗИНУ ЗА РІЗНИХ УМОВ ЗБЕРІГАННЯ ЇХНІХ ПРЕПАРАТІВ

Проведено визначення середовища, яке сприяє оптимальному зберіганню препаратів скоротливих білків з відновленням ними функціональних властивостей після розморожування. Показано, що при зберіганні препаратів з додаванням гліцеролу залишається контрольний рівень АТФазної активності. Без додавання гліцеролу АТФаза активність міозину та актоміозину після розморожування є нижчою за контрольні значення.

Determination of the condition of medium for optimal storage of the contractile proteins with recovery their functional properties after unfreezing was carried out. It was shown that the ATPase activity does not change under the storage of the contractile proteins with glycerol. On the contrary the ATPase activity of the myosin and actomyosin after unfreezing without glycerol was lower its control level.

Вступ. Серед проблем, якими займається сучасна кріобіологія, одне з центральних місць належить кріостійкості й кріолабільності білкових структур, зокрема ферментів і ферментних систем. Установлено, що за присутності кріопротекторів, наприклад гліцеролу, значних змін в активності ферментів не відбувається. Гліцерол має здатність утворювати оборотні комплекси з водою, іонами й макромолекулами. Якщо проводити процес заморожування тканин у середовищі без гліцеролу, то під час поступового вимержання води відбувається дегідратація. У разі значного зневоднення підвищена концентрація осмотично активних речовин, що виникає внаслідок кристалізації води, може призвести до денатурації білків. Гліцерол зв'язує значну кількість води й, утримуючи її, запобігає підвищенню концентрації солей до критичного рівня, попереджаючи тим самим денатурацію білкових комплексів; своєрідна осмотична дія гліцеролу проявляється й за відтаювання.

Об'єкт і методи досліджень. Досліджували актоміозин і міозин, які було отримано з лівого шлуночка серця бика за загальноприйнятною методикою [1]. Виділення актоміозину здійснювали екстракцією за умов високої іонної сили середовища, міозин очищали із застосуванням хроматографічної колонки, чистоту та якісний склад препаратів контролювали методом електрофорезу. Препарати зберігали у присутності гліцеролу під час заморожування в рідкому азоті, гліцерол видаляли методом діалізу. Метою роботи було визначення середовища, яке сприяє кращому зберіганню препаратів з відновлення ними функціональних властивостей після розмо-

рожування. Для цього визначали АТФазну активність актоміозину та міозину в препаратах у процесі виділення та після розморожування їх у разі тривалого зберігання. Препарати білків зберігали в 0,6 моль/л KCl та 0,6 моль/л KCl з додаванням гліцеролу або в середовищі BW (40 ммоль/л KCl; 20 ммоль/л імідазол; pH 6.6; 2 ммоль/л MgCl₂; 1 ммоль/л азид натрію; 1 ммоль/л меркаптоетанол) і BW з додаванням гліцеролу. Статистичну обробку даних проводили методами варіаційної статистики за допомогою програми "Origin 5.0", результати досліджень представляли у вигляді різниці середніх значень та помилок середнього ($M \pm m$), вірогідними вважали результати при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. На величину АТФазної активності можуть впливати тонкі зміни в структурі молекули білка, які залежать від чистоти реактивів, домішок двовалентних іонів, умов зберігання та ін. [2, 3]. Препарати міозину й актоміозину залежно від методики виділення можуть відрізнятися за значеннями АТФазної активності. При дослідженні їхніх властивостей і порівнянні результатів виникають певні складності, тому бажано проводити окремі експерименти або серію експериментів на одному препараті. Це можна виконати за умов тривалого зберігання препаратів при заморожуванні. Також вивчали вплив солей у високих концентраціях у середовищі заморожування як однієї з можливих причин пошкодження при заморожуванні/відтаюванні ферментів.

Для того щоб з'ясувати, яке середовище сприяє кращому зберіганню препаратів без втрати ними функціональних властивостей після розморожування, визначали АТФазну активність актоміозину та міозину