

ОБМЕН ФОСФОРА ФОСФОЛИПИДОВ, СВЯЗАННЫХ С
ПРОТЕОЛИПИДАМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА
И СЕРДЦА КРЫСК. Г. МАНУКЯН, К. Л. ЛЕВОНЯН, А. А. СТЕПАНЯН,
Д. Л. АРУТЮНЯН, Г. А. ГЕВОРКЯН

Выявлены определенные различия между скоростью включения P^{32} в фосфолипиды общих липидных экстрактов и фосфолипиды, связанные с очищенными в разной степени от липидов протеолипидами головного мозга и сердца крыс. Показано, что обмен более прочно связанной с белком протеолипидов фракции фосфолипидов, содержащей в основном кислые фосфатиды, в мозге в 2,5, а в сердце в 1,2 раза выше, чем фосфолипидов общих липидных экстрактов, и наоборот, обмен менее прочно связанной с протеолипидами фракции фосфолипидов несколько ниже.

Ключевые слова: фосфолипиды, протеолипиды.

Исследованиями Фолча и нашими прежними работами было показано, что липидный компонент протеолипидов (ПЛ)—гидрофобных мембранных липопротеинов, растворимых в органических растворителях, состоит в основном из фосфолипидов (ФЛ), на долю которых приходится 30—50% от веса неочищенных ПЛ (НПЛ) и 25—8% от веса очищенных ПЛ (ОПЛ) в зависимости от условий очистки [3—5,8].

В связи с различной локализацией и предполагаемой ролью ПЛ в мембранных структурах разных тканей представляло интерес изучить скорость включения радиоактивного фосфора— P^{32} в ФЛ, связанные с очищенными в разной степени от липидов ПЛ двух наиболее богатых этими комплексами органов—головного мозга и сердца крыс, и сравнить со скоростью обновления фосфора ФЛ общих липидных экстрактов, что и являлось целью настоящей работы.

Материал и методика. Белым крысам массой в 160—180 г вводили подкожно P^{32} из расчета 10 мкюри на 1 г массы животного. Через 3 ч крыс декапитуировали. Мозг и сердце на холоде тщательно очищали от крови и оболочек. Кашицу сердечной мышцы промывали несколько раз охлажденным раствором 0,9%-ного NaCl.

Липидные экстракты, содержащие ПЛ, получали и отмывали по методу Фолча и др. [9]. НПЛ выделяли из промытых липидных экстрактов мозга и сердца методом эмульгирования—центрифугирования [5, 10] с той разницей, что опускали последнее центрифугирование, при 200 г. Лифилизированные осадки НПЛ мозга промывали при 23° 3 раза 200-кратным объемом смеси спирт—эфир 1:1, а сердца—2 раза 250-кратным объемом. Очищенные таким образом ПЛ (ОПЛ) растворяли в смеси хлороформ—метанол—вода 2:1:0.2. Разрушение ПЛ, экстракцию и отмывку липидного компонента производили по методике, описанной ранее [5].

Из промытых хлороформенных растворов общих липидов, а также спирт-эфирных отмывов НПЛ и экстрактов липидов, выделенных из ОПЛ нейтральной и подкисленной хлороформ-метаноловой смесью, отбирали пробы, содержащие 2—10 мкг липидного Р. После минерализации объем проб доводили бидистиллированной водой до 1 мл. Половину пробы брали на определение количества фосфора [1], вторую—на счет радиоактивности. К последним добавляли 10 мл жидкого сцинтиллятора, содержащего толуол:РРО:РОРОР—1:4:0,1. Радиоактивность измеряли в сцинтилляционном спектрометре SL-30 (фирма «Intertechnique», Франция) в канале P^{32} и выражали в имп/мин/мкг Р. О содержании и радиоактивности ФЛ НПЛ судили по сумме: ФЛ спирт-эфирных отмывов+ФЛ ОПЛ.

Определяли также содержание и радиоактивность неорганического фосфора (НФ) в исследуемых органах. НФ осаждали по Делори [7] из трихлоруксусного экстракта ткани после извлечения липидов.

О скорости обмена ФЛ судили по относительной удельной радиоактивности (ОУР), представляющей выраженное в процентах отношение удельной радиоактивности (УР)—имп/мин/мкг Р исследуемых ФЛ к УР НФ ткани [6].

Результаты и обсуждение. Исследования показали, что ФЛ НПЛ, выделенных из мозга, составляют 21,1% всех ФЛ общего липидного экстракта, а ОПЛ—2,3, из коих 1,8% приходится на долю ФЛ, извлеченных нейтральной и лишь 0,45%—на долю ФЛ, извлеченных подкисленной хлороформ-метаноловой смесью (табл. 1). В сердце с НПЛ связано 12,2% всех ФЛ общего липидного экстракта, а с ОПЛ—2,2%.

Таблица 1
Содержание фосфора ФЛ общего липидного экстракта и ФЛ, связанных с НПЛ и ОПЛ из головного мозга и сердца крыс

Фракции	Мозг		Сердце	
	мкг Р/г влажного веса	% от ФЛ общего ли- пидного экстракта	мкг Р/г влажного веса	% от ФЛ общего ли- пидного экстракта
Общий липидный экстракт ткани	1946,78±37,97 (9)	100,00	959,79±33,58 (9)	100,00
НПЛ	411,44±38,84 (9)	21,13	117,36±7,99 (8)	12,23
Спирт-эфирные отмывы НПЛ	367,25±37,30 (9)	18,86	97,71±5,84 (9)	10,18
ОПЛ	44,19±2,00 (9)	2,27	21,36±2,63 (8)	2,23
а) ФЛ, извлеченные нейтральной хлороформ-метаноловой смесью	35,43±3,03 (9)	1,82	20,03±2,43 (8)	2,09
б) ФЛ, извлеченные подкисленной НСІ до 0,04 N хлороформ-метаноловой смесью	8,76±1,22 (9)	0,45	1,33±0,26 (8)	0,14
ФЛ общего липидного экстракта без ФЛ НПЛ	1535,34	78,87	842,43	87,77
ФЛ общего липидного экстракта без ФЛ ОПЛ	1902,59	97,73	97,77	938,43

Скорость включения фосфора в ФЛ общих липидных экстрактов и ПЛ, выделенных из мозга и сердца крыс, приведена в табл. 2. Из таблицы видно, что в мозге ОУР ФЛ, связанных с НПЛ, несколько выше, чем ОУР ФЛ общего липидного экстракта (на 10%). При этом

ОУР ФЛ общего липидного экстракта и ФЛ, связанных с НПЛ и ОПЛ, выделенными из головного мозга и сердца крысы

$$\left(\text{ОУР} = \frac{\text{УР фосфора ФЛ}}{\text{УР НФ ткани}} \times 110 \right)$$

Фракции	Мозг			Сердце		
	ОУР	ОУР ФЛ каждой фракции, % от ОУР ФЛ общего липидного экстракта	разница	ОУР	ОУР ФЛ каждой фракции, % от ОУР ФЛ общего липидного экстракта	разница
Общий липидный экстракт ткани	3,31±0,07 (7)	100,00	0	2,60±0,10 (9)	100,00	0
НПЛ	3,65±0,12 (7)	110,27	+10,27 P<0,05	2,29±0,06 (7)	88,08	-11,92 P<0,02
Спирт-эфирные отмывы	2,95±0,08 (7)	89,12	-10,88 P<0,01	2,21±0,06 (9)	85,00	-15,00 P<0,01
НПЛ	8,33±0,57 (7)	251,66	+151,66 P<0,001	3,16±0,16 (6)	121,54	+21,54 P<0,05
ОПЛ						
а) ФЛ, извлеченные нейтральной хлороформ-метаноловой смесью	7,33±0,69 (7)	221,45	+121,45 P<0,001	3,07±0,14 (5)	118,08	+18,08 P<0,02
б) ФЛ, извлеченные подкисленной НС1 до 0,04 N хлороформ-метаноловой смесью	11,60±1,85 (6)	350,45	+250,45 P<0,001	8,71±0,50 (7)	335,00	+235,00 P<0,001
ФЛ общего липидного экстракта без ФЛ НПЛ	3,21±0,80 (7)	96,98	-3,02 P>0,2	2,62±0,14 (7)	100,77	+0,77 P>0,5
ФЛ общего липидного экстракта без ФЛ ОПЛ	3,17±0,05 (7)	95,77	-4,23 P>0,1	2,54±0,50 (7)	97,69	-2,31 P>0,5

скорость обновления менее прочно связанных с НПЛ ФЛ, которые извлекаются спирт-эфирной смесью и составляют 89,3% всех связанных с НПЛ ФЛ, на 11% ниже, а более прочно связанных с белком ПЛ ФЛ (ФЛ ОПЛ), наоборот, в 2,5 раза выше, чем ФЛ общего липидного экстракта. Из этих более прочно связанных с ПЛ ФЛ быстрее обменивается та небольшая часть, которая извлекается из ОПЛ подкисленной хлороформ-метаноловой смесью. Обмен ФЛ, извлеченных из ОПЛ нейтральной хлороформ-метаноловой смесью и подкисленной смесью, в 2,2 и 3,5 раз соответственно выше, чем ФЛ общего липидного экстракта.

В сердце картина несколько иная. Скорость включения фосфора в ФЛ НПЛ и менее прочно связанной с ними фракции липидов, извле-

каемой спирт-эфирной смесью, на 12—15% ниже, чем в ФЛ общего липидного экстракта. Обмен же более прочно связанной фракции ФЛ, остающийся в составе ОПЛ, в отличие от мозга, выше лишь в 1,2 раза. Как и в мозге, в сердце быстрее обновляется та, совсем небольшая здесь часть ФЛ, которая извлекается из ОПЛ подкисленной хлороформ-метаноловой смесью. Обмен фосфора этих ФЛ в 3,4 раза, а ФЛ, извлеченных нейтральной смесью, всего в 1,18 раз выше, чем ФЛ общего липидного экстракта.

Результаты проведенных исследований показывают, что имеются определенные различия между скоростью обновления ФЛ общих липидных экстрактов и ФЛ, связанных с очищенными в разной степени ПЛ сердца и особенно мозга белых крыс.

Обмен менее прочно связанной с белком ПЛ фракции ФЛ, извлекаемой из НПЛ спирт-эфирной смесью, как в мозге, так и в сердце несколько ниже (на 11—15%), чем ФЛ общих липидных экстрактов. Нашими прежними исследованиями было показано, что менее прочно связаны с белком ПЛ нейтральные ФЛ-лецитин, сфингомиелин, а также этаноламинфосфатид, которые почти полностью удаляются из НПЛ при отмывке спирт-эфирной смесью (23°) [3, 4]. Преобладающими ФЛ спирт-эфирных отмывов как мозга, так и сердца являются лецитин и этаноламинфосфатид.

Скорость обновления более прочно связанной с белком ПЛ фракции ФЛ, которая не извлекается при отмывке спирт-эфирной смесью и остается в составе ОПЛ, в мозге выше (в 2,5 раза), чем общих липидных экстрактов. В сердце эта разница гораздо менее выражена. Более прочно с белком ПЛ как мозга, так и сердца связаны кислые ФЛ. Основными ФЛ ОПЛ мозга являются серинфосфатид и полиглицерофосфатид, составляющие соответственно 35—45 и 25—35% от суммы всех связанных ФЛ, затем монофосфоинозитид (12—13%). В ОПЛ из сердца в наибольших количествах содержится полиглицерофосфатид (50—70% от суммы ФЛ), затем серинфосфатид и монофосфоинозитид— (11—13%) [2, 3].

Дальнейшие исследования покажут, обменом каких именно ФЛ обусловлены выявленные различия. Однако сам по себе обнаруженный нами факт отличной от общих липидных экстрактов скорости включения фосфора во фракцию ФЛ, прочно связанных с гидрофобными мембранными белками мозга и сердца, представляет несомненный интерес и нуждается в более детальном изучении. В последние годы в литературе накапливается все больше данных, свидетельствующих о существовании более и менее активных пулов одних и тех же ФЛ в зависимости от их локализации в структурах, обладающих различной функцией [11, 12].

ԱՌՆԵՏԻ ԳԼԽՈՒՂԵՂԻ ԵՎ ՍՐՏԻ ՊՐՈՏԵՈԼԻՊԻԴՆԵՐԻ ՀԵՏ ԿԱՊԿԱՍ
ՖՈՍՖՈԼԻՊԻԴՆԵՐԻ ՖՈՍՖՈՐԻ ՓՈՆԱՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆԸ

Կ. Հ. ՄԱՆՈՒԿՅԱՆ, Կ. Լ. ԼԵՎՈՆՅԱՆ, Հ. Ա. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ,
Գ. Լ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Գ. Ա. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ

Պարզվել է, որ առնետի գլխուղեղի և սրտի պրոտեոլիպիդների հետ կապված ֆոսֆոլիպիդները ^{32}P -ի ներգրավման արագությամբ տարբերվում են ընդհանուր լիպիդային էքստրակտի ֆոսֆոլիպիդներից: Պրոտեոլիպիդների սպիտակուցի հետ ավելի ամուր կապված, հիմնականում թթու ֆոսֆատիդներ պարունակող ֆոսֆոլիպիդների ֆրակցիաների փոխանակությունը գլխուղեղում 2,5 անգամ, իսկ սրտում 1,2 անգամ ավելի բարձր է, քան ընդհանուր լիպիդային էքստրակտի ֆոսֆոլիպիդներինը: Պրոտեոլիպիդների հետ ավելի թույլ կապված ֆոսֆոլիպիդների ֆրակցիաների փոխանակությունը, ինչպես ուղեղում, այնպես էլ սրտում, փոքր ինչ ցածր է, քան ընդհանուր ֆոսֆոլիպիդներինը:

EXCHANGE OF PHOSPHORUS OF PHOSPHOLIPIDS BOUND
WITH PROTEOLIPIDS OF RAT BRAIN AND HEART

K. H. MAHUKIAN, K. L. LEVONIAN, H. A. STEPANIAN,
D. L. HARUTJUNIAN, G. A. GEVORKIAN

Certain differences between the rate of incorporation of ^{32}P into the phospholipids of total lipid extracts and phospholipids bound with crude and purified proteolipids of rat brain and heart have been revealed. It is shown that the exchange of phospholipid fraction which is more tightly bound with proteolipid protein and contains mainly acidic phosphatides is 2,5 times in brain and 1,2 times in heart more than that of phospholipids of total lipid extracts. On the contrary, in brain as well as in heart, the exchange of phospholipids, less firmly bound with proteolipids is lower than that of total phospholipids.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Венкстерн Т. В. и Баев А. А. Биохимия, 22, 1043, 1957.
2. Левонян К. Л. и Манукян К. Г. Тез. докл. III Всесоюзн. симпоз. Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животного и человека, 123, Л., 1978.
3. Манукян К. Г. Вопросы биохимии мозга, 13, 86, Ереван, 1979.
4. Манукян К. Г. и Бунятян Г. Х. Вопросы биохимии мозга, 9, 87, Ереван, 1974.
5. Манукян К. Г., Киракосян Л. Г., Левонян К. Л. Вопросы биохимии мозга, 7, 140, Ереван, 1972.
6. Манукян К. Г., Смирнов А. А., Чирковская Е. В. Биохимия, 28, 246, 1963.
7. Delory G. B. Biochem. J., 32, 1161, 1938.
8. Folch-Pi J. In: Brain Lipids and Lipoproteins and the Leucodystrophies, Amsterdam, Elsevier, 18, 1963.
9. Folch J., Lees M. B. and Stoane-Stanley G. H. J. Biol. Chem., 226, 497, 1957.
10. Folch J., Webster G. R. and Lees M. Feder. Proc., 18, 228, 1959.
11. Horrocks L. A., Toews A. D., Thompson D. K. and Chin J. Y. In: Function and metabolism of phospholipids, New York and London, 37, 1976.
12. Pasquini J. M., Krawiec L. and Soto E. F. J. Neurochem., 21, 647, 1973.