

ВКЛЮЧЕНИЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МЕЧЕНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ФОСФОЛИПИДОВ В МЕМБРАНАХ ИНТАКТНЫХ ЛИМФОЦИТОВ

Ю. В. ТАДЕВОСЯН, Л. Ю. ИСАТЯН, К. Г. КАРАГЕЗЯН

Институт молекулярной биологии НАН Армении, Ереван

Выявлена относительная стабильность зрелых лимфоцитов периферической крови человека по отношению к регулируемой модификации жирнокислотного состава мембранных фосфолипидов по сравнению с тимокитами крыс. Изменения в содержании включенных меченных жирных кислот в мембранных липидах лимфоцитов крови под действием митогенного лектина конканавалина А свидетельствуют о специфичной направленности функционирования ферментной системы деацилирования—реацилирования для отдельных фракций фосфолипидов.

Ուսումնասիրվել է լիմֆոցիտների թաղանթների ֆոսֆոլիպիդների մեջ նշանիր ինդիկատոր և ճարպաթթուների ներմուծումն ու բաշխումը: Մարդու արյան հասուն լիմֆոցիտները իրենց թաղանթների ֆոսֆոլիպիդների ճարպաթթվային կազմի մոդիֆիկացիայի նկատմամբ դրսևորում են հարաբերական կայունություն ի տարբերություն առնչաբ իմոցիտների: Արյան լիմֆոցիտների թաղանթային լիպիդներում ներմուծված տարրեր նշանիր ճարպաթթուների քանակական փոփոխությունները վիճարկում են տարրեր ֆոսֆոլիպիդային բաղադրամասերի ապառաջիացման գերազանցվածքը: Ֆերմենտային համակարգի աշխատանքի յուրահատուկ ուղղվածության մասին:

The incorporation and distribution of labelled inositol, fatty acids in the lymphocyte membrane phospholipids were investigated. The experiments revealed relative stability of human peripheral blood mature lymphocytes towards the membrane phospholipid fatty acid composition regulatory modification as with rat thymocytes. Mitogenic lectin concanavalin A-induced changes in content of different labelled fatty acids, incorporated into lymphocyte phospholipids suggest about specificity of individual phospholipid deacylation-reacylation enzyme system functioning.

Лимфоциты: мембраны—фосфолипиды—включение жирных кислот.

Одним из наиболее широко применяемых методов изучения роли липидов в транслокации внешних сигналов является предварительное

Сокращения: (АК)—архидионовая кислота, (ДТТ)—динотрентол, (ДФГ)—дифосфатидилиглицерин, (ЖК)—жирные кислоты, (КонА)—конканавалин А, (ЛПКЧ)—лимфоциты периферической крови человека, (ОК)—олеиновая кислота, (ПК)—пальмитиновая кислота, (СФМ)—сфингомиелин, (ТСХ)—тонкослойная хроматография, (ФИ)—фосфатидилинозит, (ФИФ)—фосфатидилинозитфосфат, (ФИФ₂)—фосфатидилинозитдифосфат, (ФС)—фосфатидилсерин, (ФХ)—фосфатидилхолин, (ФЭ)—фосфатидэтанолламин, (ФК)—фосфатидная кислота, (ФЛ)—фосфолипиды.

включение в плазматические мембраны клеток радиоизотопных зондов в виде предшественников липидных молекул.

Подробный анализ по возможности полной картины дальнейших превращений структурированных меченых ФЛ фракций и их метаболитов по различным, строго контролируемым, взаимозависимым обменным направлениям и сопоставление данных об интенсивности протекания отдельных их звеньев могут служить достоверным источником информации как для идентификации и количественной оценки индивидуальных ферментативных активностей липидного метаболизма, так и для выявления общих закономерностей возможного включения отмеченных соединений в динамический процесс активации клеток и формирования клеточных ответов.

Отмеченные метаболические превращения липидных молекул, связанные с активацией клеток внешними сигналами, могут быть выявлены, охарактеризованы и корректно интерпретированы только при наличии данных о полной исходной картине (в состоянии покоя клеток) включения, топографии и количественного распределения радиоактивности в отдельных липидных фракциях плазматических мембран интактных клеток.

В данной работе представлены результаты изучения закономерностей включения и распределения радиоактивных инозита, свободной АК и КоА-эфиров ОК и ПК в различных липидных фракциях мембран тимоцитов крыс и ЛПКЧ, инкубированных в средах с различным составом.

Материал и методика. В работе использованы радиоактивные $[2-^3\text{H}]$ -инозит (сп. актив. 22,8 Кб/ммоль), $[1-^{14}\text{C}]$ -АК (сп. актив. 56,6 мКи/ммоль), $[1-^{14}\text{C}]$ -олеоил-КоА (сп. актив. 52 мКи/ммоль), $[1-^{14}\text{C}]$ -пальмитоил-КоА (сп. актив. 54 мКи/ммоль) фирмы «Amersham», Англия.

ЛПКЧ получали по стандартной процедуре в градиенте фикола-цетрографа ($d=1,076-1,077$) [6]. Гимастеты выделяли из яичниковой железы 8-10-недельных крыс. Очищенные от эпителиальной ткани тимусы мелко нарезали, гомогенизировали вручную в фосфатном буфере Кребса-Рингера или RPMI 1640 (pH 7,4) и отфильтровывали. Клетки осаждали центрифугированием при 650 g 15-20 мин. Интактность клеток, определяемая окрашиванием трипановым синим, составляла более 90%.

Для включения $[2-^3\text{H}]$ -инозита в ФЛ мембран интактных тимоцитов суспензию клеток (10^7-10^8 клеток в мл) инкубировали с 20 мКи длиной метки в среде выделения, содержащей 0,5% яичного альбумина, в течение 3 ч при 37°, в атмосфере O_2 - CO_2 (95:5).

Введение $[1-^{14}\text{C}]$ -АК (1 мКи) в ФЛ мембран ЛПКЧ и тимоцитов крыс проводили в 5 мл инкубационной среды, содержащей MgCl_2 —50 мкмоль, АТФ—12,5 мкмоль, КоА—1 мкмоль, ДТТ—1 мкмоль, а также липо-ФХ—70 мкМ или липо-ФИ—30 мкМ, в течение 1 ч при 37°, с использованием культуральных сред RPMI 1640 и Игла (pH 7,4). Остатки свободной $[1-^{14}\text{C}]$ -АК вымывали 0,2%-ным раствором альбумина. Мечение ЛПКЧ $[1-^{14}\text{C}]$ -олеоил-КоА и $[1-^{14}\text{C}]$ -пальмитоил-КоА (по 1 мКи) проводили в аэробных условиях, однако без добавления в инкубационную среду АТФ, КоА, ДТТ.

Мечение лимфоцитов указанными радиоактивными ЖК и их КоА-эфирами проводили также в присутствии митогенного дектина КоА (2 мКи/мл).

ФЛ мембран экстрагировали по методу Блай и Дайера [1] с последующим фракционированием водной фазы ТСХ в системах растворителей хлороформ-метанол.

метанол-уксусная кислота-вода (6:8:2:2:1) и хлороформ-метанол-уксусная кислота-вода (25:15:4:2). Фосфоинозитиды экстрагировали согласно Фюз и Тан [5] и фракционировали на пластинках, импрегнированных 1%-ным К-оксалатом в системе растворителей хлороформ-метанол-аммиак (13:48:12).

Степень радиоактивности идентифицированных в парах под ФЛ фракций на пластинках ТСХ определяли как сканированием с помощью радиосканирующего прибора фирмы «Berthold», так и на сцинтилляционном спектрофотометре («Roche-Внеле-гипиет», модель SI-4221, Франция).

Данные подвергнуты статистической обработке по методу Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Инкубация суспензии тимоцитов крыс с $[2-^3\text{H}]$ -инозитом показала включение метки во фракции ФИ, ФИФ, ФИФ₂ и лизо-ФИ, составляющее соответственно 87,7; 4,7; 5,4 и 2,2% от суммы радиоактивности. Полученные нами результаты соответствуют литературным данным о количественном соотношении фосфоинозитидов в плазматических мембранах клеток. Так, по данным Маджеруса и сотр. [7], полифосфоинозитиды, ФИФ и ФИФ₂ составляют 10–20% от суммы фракций фосфоинозитидов, из коих от 1 до 10% приходится на долю ФИФ₂. Применение в данном исследовании 3-часовой инкубации (в отличие от принятой длительной, в течение 24 или 72 ч) для введения $[2-^3\text{H}]$ -инозита в мембранные фосфоинозитиды обеспечивает не только включение необходимого для достоверной регистрации количества радиоактивной метки во фракциях ФИФ₂ и ФИФ, но и сохранение высокого процента жизнеспособных клеток в суспензии.

Для исследования метаболических превращений мембранных ФЛ-глицеридов при активации клеток весьма информативным является предварительное введение в эти соединения различных меченых насыщенных и ненасыщенных ЖК, специфически распределяющихся соответственно у 1- и 2-углеродных атомов их глицеринового остова. По своей функциональной значимости и жизнедеятельности клеток особое место занимает метаболизм АК, что и обусловило более детальное исследование особенностей ее включения и распределения в мембранных липидах.

Количественный анализ ФЛ состава $[1-^{14}\text{C}]$ -арахидонат-меченых тимоцитов крыс, инкубированных в средах RPMI и Игла, показал возможность избирательного включения метки преимущественно в отдельные фракции указанных соединений. В зависимости от наличия в инкубационной среде акценторов свободных ЖК для липидотрансферных реакций лизо-ФИ или лизо-ФХ более 80% общей радиоактивности включенной АК было обнаружено соответственно во фракциях ФИ и ФХ. Такая закономерность избирательного включения $[1-^{14}\text{C}]$ -АК в мембранные ФЛ ранее была обнаружена [2] в синапсоммах коры мозга крыс.

Исследование распределения $[1-^{14}\text{C}]$ -АК в ФЛ мембран ЛПКЧ показало (табл. 1) включение метки главным образом в количественно преобладающую во липидном монослое фракцию ФХ, независимо от наличия в инкубационной среде лизо-ФЛ. Если добавление в среду лизо-ФИ не приводило к существенным сдвигам в распре-

делении метки, то в присутствии лизо-ФХ наблюдалось двухкратное увеличение включения меченой АК во фракцию ФХ на фоне уменьшения радиоактивности почти во всех остальных фракциях

Таблица 1. Включение $[1-^{14}\text{C}]$ -АК в мембранные ФЛ ЛПКЧ, инкубированных в среде без лизо-ФЛ (1), с лизо-ФИ (2), с лизо-ФХ (3), в % от суммы включенной радиоактивности.

Фракция	1	2	3
ЛФХ	7.16 ± 0.05	7.6 ± 0.15	3.1 ± 0.67
СФМ	4.8 ± 0.54	4.4 ± 0.29	0.4 ± 0.3
ФХ	28.6 ± 2.3	33.0 ± 4.3	57.7 ± 5.1
ФИ	6.1 ± 0.4	11.0 ± 1.2	7.3 ± 0.2
ФС	6.6 ± 0.62	6.6 ± 0.6	2.8 ± 0.43
ФЭ	8.4 ± 1.9	7.3 ± 1.0	4.8 ± 0.25
ФК	15.2 ± 0.38	4.2 ± 0.15	7.6 ± 1.4
ДФГ	25.0 ± 0.58	22.0 ± 3.25	4.7 ± 0.5

Доминирование включения метки в ФХ фракцию лимфоцитарных мембран наблюдалось и при использовании для предварительного мечення клеток КоА-эфироп ОК и ПК (табл. 2). В случае использования $[1-^{14}\text{C}]$ -пальмитоил-КоА примечательно наличие 15% метки во фракции ФС.

Таблица 2. Включение ОК (1) и ПК (2) в ФЛ мембран ЛПКЧ, в % от суммы включенной радиоактивности.

Фракция	1	2
ЛФХ	5.35 ± 0.04	2.95 ± 0.85
СФМ	2.35 ± 0.18	3.6
ФХ	49.6 ± 0.14	53.4 ± 3.6
ФИ	10.4 ± 0.23	6.35 ± 0.45
ФС	12.0 ± 0.65	15.5 ± 1.2
ФЭ	7.8	4.41
ФК	8.9 ± 0.3	6.85 ± 0.65
ДФГ	2.7 ± 0.13	7.05 ± 0.45

Обнаруженные закономерности включения и процентного распределения в ФЛ отдельных меченых ЖК после инкубации в течение 1 ч не претерпевали существенных изменений вследствие применения различных инкубационных сред. Добавление в последние строго контролируемых, одинаковых количества липидных метаболитов в течение определенного периода инкубации приводило к установлению практически идентичных (по показателю процентного соотношения липидов) стационарных состояний в метаболическом статусе плазматических мембран отдельных клеточных популяций.

Исходя из специфичности как асимметричного распределения различных ФЛ фракций в бислой мембраны, так и процессов эстерификации насыщенными и ненасыщенными ЖК этих фракций, в литературе обсуждается [9] возможность существования в монослоях биомембран отдельных, морфофункциональных доменов со специфическим, относительно постоянным качественно-количественным составом. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что указанное постоянство доменов более жестко контролируется в находящихся в покое дифференцированных клеточных популяциях, что объясняет обнаруженное свойство большей стабильности и консервативности зрелых ЛПКЧ по отношению к регулируемой модификации ЖК состава мембранных ФЛ по сравнению с гетерогенной фракцией тимцитов крысы с высоким содержанием бластных клеток.

Таким образом, можно предположить, что любое внешнее воздействие на клетку в первую очередь модулируется через быстрые и обратимые модификационные изменения доменов (в целом или отдельных ФЛ фракций) с локальными сдвигами в их физико-химических свойствах, обеспечивающих нормальное протекание тех или иных функциональных процессов. Это послужило основанием для проведения исследований по изучению изменений закономерностей включения и распределения использованных нами меченых ЖК в ЛПКЧ при добавлении в инкубационную среду митогенного лектина КонА. Результаты экспериментов выявили изменения метаболического статуса ФЛ компонента мембран. Так, присутствие в инкубационной среде КонА приводило к понижению уровня АК почти во всех фракциях мембранных ФЛ, с более выраженным эффектом в основном во фракции ФХ. Доминирование процессов катаболизма данной фракции под действием КонА при 1-часовой инкубации наблюдалось и в случае премещения ФЛ ПК. Однако при этом обнаруживалось значительное увеличение включения метки в ФС фракцию. В случае же премещения ЛПКЧ ОК наблюдалось превалирование процессов ацилирования всех исследуемых ФЛ фракций. При этом обнаруживалось многократное увеличение количества радиоактивной метки в ФЭ фракции.

Таким образом, сопоставление полученных нами экспериментальных данных с литературными позволило сделать вывод о возможном вовлечении в первичные модификационные процессы биомембран при воздействии на клетку митогенного внешнего сигнала наряду с ФЛ и ФХ, также ФЭ и ФС фракций. В качестве необходимого исполнительного звена при осуществлении отмеченных процессов должны выступать, в частности, ферментные системы деацилирования-реацилирования мембранных ФЛ, затрагивающие обе позиции эстерификации молекулы глицерина этих соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бужурина Н. М., Палон М. А. ВИННИТ, ИНТ 3, 1-260, 1986.
2. Тадевосян Ю. В., Кирыгезян К. Г., Батикян Т. Б. ДАН СССР, 1987, 5, 1254-1257, 1987.

3. Berridge A. M., *Endocrinol.*, 251, 315—361, 1974.
4. Bligh E. G., Dyer W. J. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 37, 8, 911—917, 1959.
5. Fuse I. and Tai H.-H., *BBRC*, 146, 2, 659—665, 1987.
6. Innes J., Runtz M. A., Kim Y. T. and Weksler A. E. *J. Clin. Invest.*, 64, 6, 1608, 1613, 1979.
7. Majerus P. W., Connolly T. A., Deckmyn H., Ross T. S., Bross T. E., Ishi H., Bansal V. S., Wilson D. B. *Science*, 234, T37—T44, 1986.
8. Nishizuka Y. *Nature (Lond.)*, 308, 693—698, 1984.
9. Natsawa Y., Nakashima S. and Nagata K. *ichi BBA*, 1082, 214—239, 1991.

Поступило 8. VIII. 1990 г.