

УДК 612.8.015:547.953

ОБ ИНТЕНСИВНОСТИ ОБМЕНА ФОСФОРА ФОСФОЛИПИДОВ В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ ТКАНИ МОЗГА

РАЙЗЕ Т. Е., ШАРАГИНА Л. М., ТЮЛЬКОВА Е. И.

В настоящее время становится все более очевидным, что большинство фосфолипидов (ФЛ), являющихся обязательными компонентами любых биомембран, синтезируются в эндоплазматическом ретикулуме, а затем транспортируются к другим субцеллюлярным структурам. Это подтверждено достаточно большим количеством исследований, подавляющая часть которых выполнена на ткани печени [1—5].

Вследствие гетерогенности объекта и сложности получения чистых субклеточных структур работ по переносу ФЛ между органеллами ткани головного мозга довольно мало, но это явление продемонстрировано и на нервной ткани [6, 7]. Однако данные, полученные на субцеллюлярных образованиях ткани мозга, вызывают особый интерес, так как по метаболизму ФЛ ткани мозга и печени резко различаются. Ткань печени обеспечивает ФЛ не только свои собственные мембраны, но и является источником плазменных липопротеидов, а также секретирует ФЛ в желчь. В отличие от этого метаболические взаимоотношения субцеллюлярных структур в ткани мозга направлены исключительно на обеспечение жизнедеятельности и поддержание структурных элементов в клетках самой нервной ткани.

В работе, опубликованной ранее [8], исследовались содержание и обмен ФЛ в цитозоле и микросомной фракции ткани мозга крыс. Для выяснения метаболических взаимоотношений субцеллюлярных структур представляет интерес изучение обмена ФЛ и в других фракциях.

Одновременное исследование метаболизма ФЛ в различных по скорости их обновления структурах требует изучения динамики процесса включения меченого предшественника во времени. Нам известна лишь одна такая работа на ткани мозга [9], причем в ней были исследованы очень большие интервалы времени после введения изотопа и не все субклеточные фракции.

Задачей нашей работы явилось изучение содержания и скорости обмена фосфора ФЛ в субцеллюлярных структурах ткани больших полушарий головного мозга крыс в различные сроки после введения изотопа. Исследования проводили на взрослых белых крысах-самках линии Вистар. За меру интенсивности обмена ФЛ принимали скорость

включения ^{32}P -ортофосфата, который вводили внутривенно за 0,5, 1, 2, 3, 6 и 12 ч до декапитации. После чего извлекали большие полушария головного мозга, тщательно отмывали их от крови, очищали от сосудистых сплетений и оболочек. Все операции проводили на льду. Ткань взвешивали, гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Готовили 10% тканевой гомогенат в 0,32 М растворе сахарозы на 0,01 М трис-буфере, pH 7,4. Субклеточные фракции получали по общепринятым методам [10, 11]. Исследовали митохондрии, синапсомы и миелин, получаемые при центрифугировании общей митохондриальной фракции в градиенте плотности сахарозы (2 ч, 53 700 g), микросомную фракцию (1 ч, 100 000 g) и надосадочную (цитозоль). Экстракцию липидов из гомогената ткани и отдельных субклеточных фракций, отмывку их от P_i и других нелипидных примесей проводили по методу Bligh, Dyer [12]. Верхнюю водно-метаноловую фазу после первой отмывки брали на определение содержания и радиоактивности P_i . В отмытом липидном экстракте определяли (после минерализации) количество липидного фосфора по методу Bartlett, [13], его радиоактивность (сцинтилляционный счетчик «Изокап-300») и вычисляли удельную радиоактивность (УР) липидного фосфора. Мерой интенсивности обмена фосфора ФЛ (или, точнее, мерой скорости их синтеза) являлась величина относительной удельной радиоактивности (ОУР), которую вычисляли как отношение УР фосфора ФЛ к УР P_i гомогената, умноженное на 100. Белок определяли по методу Lowry и соавт. [14].

Таблица

Содержание и ОУР фосфора фосфолипидов субцеллюлярных структур ткани мозга крыс (через 2 ч после введения ^{32}P -ортофосфата)

Тканевой препарат	Содержание фосфора ФЛ, мкг	Содержание ФЛ, мг	О У Р
	мг белка	мг белка	
Гомогенат	$18,6 \pm 0,9$ (17)	$0,46 \pm 0,02$ (17)	$2,26 \pm 0,10$ (15)
Микросомы	$28,6 \pm 1,1$ (11)	$0,71 \pm 0,03$ (11)	$2,44 \pm 0,17$ (9)
Цитозоль	$3,64 \pm 0,51$ (10)	$0,09 \pm 0,01$ (10)	$4,18 \pm 0,34$ (8)
Миелин	$49,7 \pm 1,6$ (11)	$1,24 \pm 0,04$ (11)	$0,99 \pm 0,10$ (8)
Синапсомы	$18,8 \pm 0,7$ (10)	$0,47 \pm 0,02$ (10)	$1,93 \pm 0,17$ (6)
Митохондрии	$15,8 \pm 0,8$ (11)	$0,40 \pm 0,02$ (11)	$4,28 \pm 0,42$ (8)

Как видно из таблицы, самой богатой по содержанию ФЛ на единицу белка субклеточной фракцией являлся миелин, в котором отношение ФЛ/белок составляло приблизительно 1,24. В микросомах это отношение равно 0,71, во фракциях митохондрий и синапсом составляло соответственно 0,40 и 0,47. Надосадочная фракция—самая бедная по относительному содержанию ФЛ, в ней отношение ФЛ/белок равно 0,09.

Кривые нарастания ОУР фосфора ФЛ во времени в течение 12 ч после введения изотопа (рис.) носили сходный характер во всех исследованных фракциях. В течение первых 2 ч после введения изотопа происходило прямолинейное нарастание ОУР фосфора ФЛ, свидетельствующее о том, что 2-часовой интервал времени, при котором и были проведены, в основном, наши эксперименты, является вполне удовлетворительным при изучении метаболизма ФЛ одновременно во всех исследованных субклеточных фракциях. После 2 ч во всех из них (кроме миеллина) наблюдали некоторое снижение интенсивности включения меченого ^{32}P -ортофосфата в ФЛ, однако соотношение ОУР ФЛ различных фракций оставалось постоянным при всех изученных временных интервалах. По интенсивности обмена субклеточные фракции всегда располагались в следующем порядке: миеллин, синапсомы, микросомы, митохондрии; надосадочная фракция.

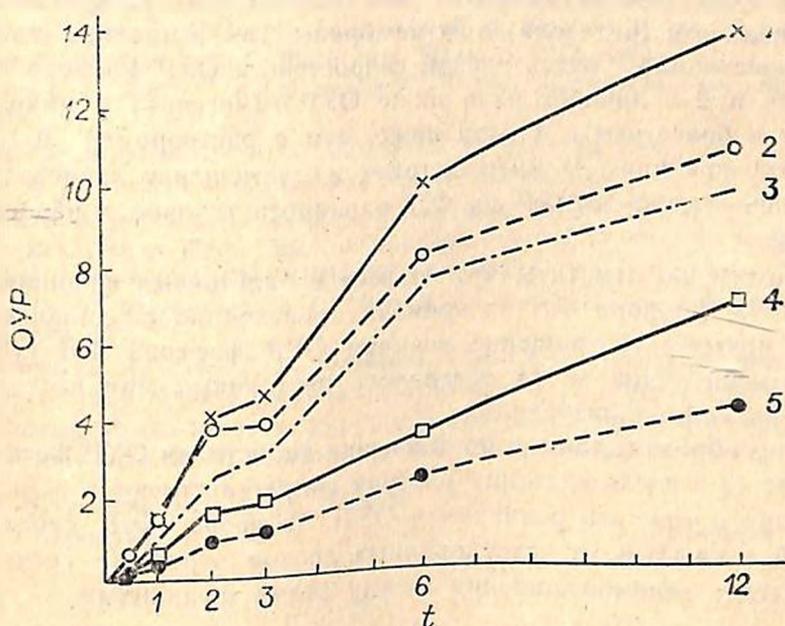


Рис. Динамика нарастания ОУР фосфора ФЛ субклеточных структур тканей мозга крысы во времени: 1—цитозоль, 2—митохондрии, 3—микросомы, 4—синапсомы, 5—миелин

Через 2 ч после введения изотопа (табл.) ОУР ФЛ в миелине была в 2 с лишним раза ниже, чем в гомогенате и микросомной фракции. ОУР ФЛ цитозоля и митохондриальной фракции в 1,7 раза выше, чем ОУР ФЛ гомогената и микросом.

Указанные различия в величинах ОУР определяемых суммарных ФЛ субклеточных фракций можно было бы объяснить разным набором индивидуальных ФЛ в них. Однако было показано [8, 15], что распределение отдельных ФЛ и соотношение величин их ОУР в гомогенате и исследованных субклеточных фракциях было приблизительно одинаково, что соответствует имеющимся литературным данным [10, 16].

Таким образом, различия в ОУР ФЛ субклеточных фракций не могут быть объяснены разным набором индивидуальных ФЛ в них.

Как было указано, основным местом синтеза ФЛ в клетках является эндоплазматический ретикулум. В этом отношении интересным может показаться тот факт, что ОУР ФЛ микросомной фракции значительно ниже, чем цитозоля. Можно предположить, что одной из причин этих различий является в основном то, что в эндоплазматическом ретикулуме синтезируются два пула ФЛ: один с более низкой ОУР— для обновления собственно мембран эндоплазматического ретикулума; другой—с более высокой ОУР фосфора ФЛ. Эти быстро метаболизирующие ФЛ транспортируются затем к другим мембранным структурам через цитозоль. Различия в ОУР фосфора ФЛ в митохондриях, синалтосомах и миелине можно, с этой точки зрения, трактовать как различия в скорости встраивания уже готовых молекул ФЛ из надссадочной жидкости (цитозоля) в их мембраны. Так, в миелине это встраивание происходило с очень низкой скоростью, и ОУР фосфора ФЛ там оказалось в 2 с лишним раза ниже ОУР гомогената и микросомной фракции и более чем в 4 раза ниже, чем в растворимой и митохондриальной фракциях. В митохондриях же замещение происходило относительно быстро, и ОУР их ФЛ равнялось таковой в надссадочной фракции.

Существенно отметить, что во всех субклеточных фракциях нарастание ОУР фосфора ФЛ во времени происходило с одинаковой скоростью, поэтому соотношение величин ОУР фосфора ФЛ субклеточных фракций ткани мозга оставалось постоянным при всех исследованных временных интервалах.

Таким образом, данные по динамике нарастания ОУР фосфора ФЛ в течение 12 ч после введения изотопа свидетельствуют в пользу предположения о том, что различия в ОУР фосфора ФЛ субклеточных фракций в каждый из исследованных сроков отражали истинные метаболические взаимоотношения между этими фракциями.

ON THE INTENSIVITY OF THE PHOSPHOLIPIDS PHOSPHOROUS METABOLISM IN BRAIN TISSUE SUBCELLULAR FRACTIONS

RAIZE T. E., SHARAGINA L. M., TUILKOVA E. I.

I. P. Pavlov Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad

The content $\left(\frac{\mu\text{g P PhL}}{\text{mg protein}} \text{ or } \frac{\text{mg PhL}}{\text{mg protein}} \right)$ and turnover rate (relative specific activity, RSA) of phosphorus in phospholipids (PhL) have been studied in mitochondria, synaptosomes, myelin, microsomes and cytosol of rat brain hemispheres. The analyses were carried out at different time intervals after administration of ^{32}P -orthophosphate.

The data on RSA of PhL in subcellular fractions studied indicate that 2 pools of PhL are synthesized in endoplasmic reticulum of central

nervous system cells: one, with lower RSA, for the renewal of its own membranes, another, with higher RSA, transported through cytosol, for the renewal of membranes of other subcellular fractions. Data on the time course of RSA of PhL after ^{32}P injection indicate that the differences detected in RSA of PhL of subcellular fractions at each time interval reflect the metabolic relationship between the subcellular fractions tested.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Дятловицкая Э. В., Тимофеева И. Г., Горькова Н. П., Бергельсон Л. Д. Биохимия, 41, 1235—1240, 1976.
2. Тимофеева И. Г., Сорокина И. Б., Дятловицкая Э. В. Биохимия, 46, 11—15, 1981.
3. Mc Murray W. C., Dawson R. M. C. Biochem. J., 112, 91—108, 1969.
4. Wirtz K. W. A. Biochim. Biophys. Acta, 344, 95—117, 1974.
5. Stuhne-Sekalec L., Stanacev N. Z. Can. J. Biochem., 58, 1082—1090, 1980.
6. Dawson R. M. C., Miller E., Jungalwala F. B. Biochem. J., 128, 18, 1972.
7. Carey E. M., Foster P. C. Bioch. Soc. Trans., 5, 1412—1414, 1977.
8. Гасцева С. В., Райзе Т. Е., Шарагина Л. М. Бюл. exper. биол. мед., 86, 533—535, 1978.
9. Mandel P., Nussbaum J. L. J. Neurochem., 13, 629—642, 1966.
10. Кренис Е. М. Липиды клеточных мембран, Л., Наука, 1981.
11. Wuttaker V. P. Progress. Biophys. Mol. Biol., 15, 39—96, 1965.
12. Bligh E. G., Dyer W. J. Canad. J. Biochem. Physiol., 37, 911—917, 1959.
13. Bartlett G. R. J. Biol. Chem., 234, 466—468, 1959.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. F., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1951.
15. Четвериков Д. А., Райзе Т. Е., Шарагина Л. М.—В кн.: Биохимия липидов и их роль в обмене веществ (под ред. С. Е. Северина), М., Наука, с. 155—166, 1981.
16. Mc Murray W. C.—In: Form and function of phospholipids, (eds: G. V. Ansell, J. N. Hawthorn, R. M. C. Dawson). BBA Library, 3, 205—251, 1973.

Институт физиологии им. И. П. Павлова
АН СССР, Ленинград

Поступила 16. I 1982