

Н. П. ЛИСОВСКАЯ

ФОСФОПРОТЕИНЫ И ПРОЦЕССЫ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ В МОЗГУ

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 8 II 1954)

За последние годы фосфопротеиновая фракция тканей животных привлекла внимание исследователей вследствие необычайно высокой интенсивности обмена содержащегося в ней фосфора. Есть все основания полагать, что соединения, обладающие большой подвижностью и легко вступающие в обмен, играют существенную роль в функционировании органа или ткани, поэтому интерес, проявленный в отношении фосфопротеинов, вполне закономерен. Однако в большинстве работ, посвященных изучению фосфопротеинов (ФП), авторы ограничивались констатацией факта высокой скорости обмена этой белковой фракции, не ставя перед собой задачи установить зависимость обмена ФП от тех или иных физиологических условий (¹⁻⁶).

В настоящей работе фосфопротеиновая фракция серого вещества мозга изучалась с точки зрения возможности ее участия в обменных процессах, протекающих в мозгу. Подопытными животными служили крысы; срезы серого вещества мозга инкубировались в солевом растворе Мак-Ильвейна (⁷), куда добавлялся меченый фосфат в количестве 3—4 μ С на 10 мл раствора. После инкубации срезы 6—10 раз ополаскивались охлажденным физиологическим раствором, гомогенизировались в трихлоруксусной кислоте, вслед за чем производилось фракционирование фосфорсодержащих фракций по методу Шмидта — Таннгаузера (⁸). Радиоактивность отдельных фракций определялась в магнезиальных осадках. В этих же осадках производили аналитическое определение фосфора по методу Фиске — Суббароу (⁹). Интенсивность обмена характеризовали величиной удельной радиоактивности (число импульсов в минуту на 1 γ Р). В ряде таблиц приведена величина относительной удельной радиоактивности — отношение

число имп/мин / γ Р фосфопротеинов
число имп/мин / γ неорганич. внутриклеточн. Р.

В первых опытах был произведен сравнительный анализ скорости обмена различных белковых фракций мозга, содержащих фосфор. Была подтверждена установленная рядом авторов (^{1, 10}) высокая радиоактивность ФП мозга по сравнению с радиоактивностью РНК и ДНК. В двух опытах получены следующие величины для удельной радиоактивности (в имп/мин/ γ Р): в первом ФП 284; РНК 17; ДНК 3; во втором опыте ФП 406; РНК 57; ДНК 27.

Поскольку радиоактивность ФП зависит по меньшей мере от двух факторов: 1) скорости обмена этих соединений и 2) скорости проникновения P^{32} из среды в клетки срезов, оказалось необходимым во всех опытах определять радиоактивность внутриклеточного неорганического фосфата. Это давало возможность исключить погрешность, которая могла иметь место, когда под влиянием тех или иных условий изменялась проницаемость клеточной оболочки по отношению к фосфору.

Самое прямое доказательство участия ФП в обмене дал бы опыт, в котором сравнивалась бы радиоактивность ФП, выделенных после инкубации с раствором P^{32} при физиологических условиях, с радиоактивностью этой фракции, полученной из срезов, фиксированных трихлоруксусной кислотой до добавки радиоактивного раствора. Однако такая постановка опыта оказалась невозможной, так как не удавалось отмыть добавленный к обработанным трихлоруксусной кислотой срезам раствор P^{32} . Минеральный фосфат неизменно загрязнял фосфопротеиновую фракцию и обуславливал ее высокую радиоактивность. Это чисто методическое затруднение заставило некоторых авторов усомниться в реальности самого существования ФП (3). Используя отмывку срезов холодным физиологическим раствором до фиксации их трихлоруксусной кислотой, мы получили возможность в значительной мере очистить фосфопротеиновую фракцию от загрязняющего ее минерального фосфата и установить ряд закономерностей ее обмена.

В качестве одного из способов остановки ферментативных реакций мы использовали воздействие низкой температуры. Контрольные пробы срезов хранились в солевом растворе на льду, в то время как опытные инкубировались при 37° . Обычное время инкубации составляло 60 мин. Оказалось, что при низкой температуре скорость проникновения P^{32} в клетку заметно снижается, но интенсивность обмена ФП уменьшается в

Таблица 1

Удельная радиоактивность ФП и неорганического Р клеток при инкубации срезов мозга при 0 и 37° (имп/мин/γР)

№ опыта	Неорг. Р		Р ФП		Относит. уд. радиоактивн.	
	0°	37°	0°	37°	0°	37°
1	285	676	37	390	0,13	0,58
2	368	800	42	500	0,11	0,62
3	308	618	27	123	0,09	0,20
4	290	460	40	170	0,13	0,37
5	250	410	100	210	0,40	0,50

значительно большей мере и не может полностью быть отнесена за счет снижения количества меченого минерального фосфата, поступающего в клетку (см. табл. 1).

Из табл. 1 видно, что в то время как радиоактивность неорганического фосфата в контроле (инкубация при 0°) приблизительно в 2 раза меньше, чем в опыте (инкубация при 37°), соответствующая разница в радиоактивности ФП значительно больше. Эта серия опытов дала убедительное доказательство

реальности существования ФП и большой скорости их обновления при физиологических условиях. В самом деле, если бы речь шла не о специфической фракции, характеризующейся высоким уровнем обменных процессов, но о наличии неотмытого минерального фосфата, то радиоактивность ФП при различных условиях должна была бы полностью совпадать с таковой неорганического фосфата или быть ей пропорциональной. В опытах же была обнаружена существенная разница между обменом ФП и клеточного неорганического фосфата. Эта разница еще более четко выявилась в тех условиях, когда инкубирование срезов производилось в присутствии различных веществ, влияющих на обменные реакции.

Известно, что нормальное функционирование мозговой ткани требует постоянного притока глюкозы — мозг чрезвычайно чувствителен к понижению содержания сахара в крови. Выключение глюкозы из среды, в которой инкубируются срезы, ведет к резкому снижению радиоактивности ФП и одновременно несколько снижает радиоактивность неорганического фосфата (см. рис. 1). Последнее обстоятельство связано с распадом органических фосфорных соединений, в результате чего содержание неорганического Р в клетках, инкубированных в безглюкозной среде, значительно возрастало, а радиоактивность его падала.

NaCN, угнетающий клеточное дыхание, затормаживает и обмен ФП

(см. рис. 2). В связи с этим следует упомянуть, что при увеличении парциального давления кислорода в газовой фазе обмен ФП усиливался, о чем свидетельствовало увеличение радиоактивности этих соединений. В то же время обмен неорганического Р не подвергался каким-либо изменениям ни в присутствии NaCN ни в атмосфере O₂.

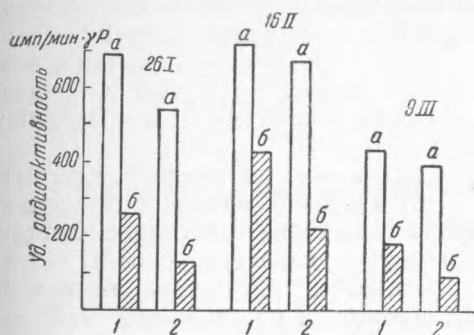


Рис. 1. Влияние добавки глюкозы на интенсивность обмена ФП. 1 — с глюкозой, 2 — без глюкозы. а — неорганический Р, б — ФП

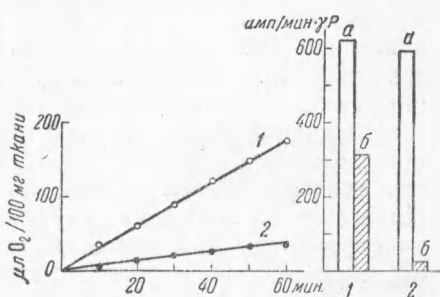


Рис. 2. Дыхание срезов мозга и обмен фосфопротеинов в присутствии 10^{-2} М NaCN. 1 — с глюкозой, 2 — с глюкозой + 10^{-2} М NaCN. а — неорганический Р, б — ФП (инкубация 30 мин.)

Следовательно, возможность и интенсивность протекания в клетке окислительных процессов определяет и обмен ФП. Это же подтвердилось в опытах с действием наркотиков — уретана и фенилуретана. В концентрациях, не действующих на дыхание клеток, они не оказывают влияния и на обмен ФП. Напротив, угнетающие дыхание концентрации этих веществ резко тормозят превращения этой фракции белков.

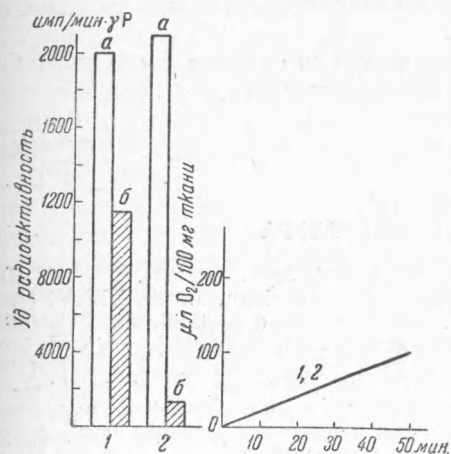


Рис. 3. Дыхание срезов мозга и обмен фосфопротеинов в присутствии 10^{-4} М ДНФ. 1 — без ДНФ, 2 — с 10^{-4} М ДНФ. а — неорганический Р, б — ФП

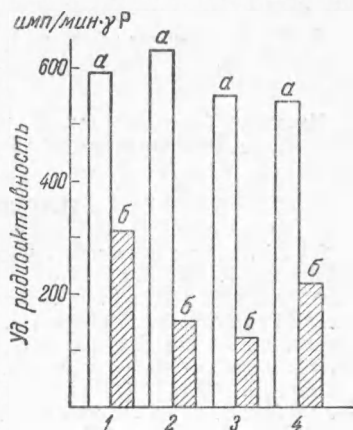


Рис. 4. Влияние глутаминовой кислоты на обмен фосфопротеинов. 1 — с глюкозой, 2 — без глюкозы, 3 — с глутаминовой кислотой, 4 — с глюкозой + глутаминовой кислотой. а — неорганический Р, б — ФП

Представляло интерес установить, какой именно вид окислительных процессов необходим для поддержания нормального уровня обмена ФП; установить, всякое ли окисление, протекающее в клетке, является в этом смысле эффективным. Использование вещества, разрывающего связь между окислением и фосфорилированием, — парадитрофенола (ДНФ)

убедительно показало наличие тесной обусловленности обмена ФП сохранным механизмом окислительного фосфорилирования (см. рис. 3).

При сохранении интенсивного дыхания в присутствии ДНФ обмен ФП оказался резко сниженным. Естественно было сделать заключение, что обмен ФП связан не со всякими окислительными превращениями, но лишь с теми, которые вызывают эстерификацию неорганического фосфата и накопление макроэргических фосфорных соединений. Косвенное свидетельство в пользу этого предположения было получено в опытах с воздействием NaF. Согласно данным Балажа и Штрауба (¹¹), NaF в концентрации 0,01 M полностью угнетает синтез АТФ срезами мозга. В наших опытах та же концентрация тормозит и обмен ФП.

Последний раздел работы был посвящен исследованию роли глутаминовой кислоты в обмене ФП. Известно, что глутаминовая кислота — единственная аминокислота, подвергающаяся окислению в нервных клетках. Полагают, что окисление глутаминовой кислоты является одним из источников энергии для мозговой ткани. Дыхание в присутствии этого субстрата идет даже с большей интенсивностью, чем на глюкозе (¹²). В наших опытах глутаминовая кислота не только не стимулировала обмен ФП, но несколько замедляла его (см. рис. 4).

На основании проведенного исследования можно утверждать, что:

1. ФП представляют собой реально существующую фракцию белковых веществ, характеризующуюся определенными закономерностями обмена.

2. Скорость превращений ФП превосходит таковую других белково-фосфорных соединений, в частности нуклеиновых кислот.

3. Обмен ФП зависит от протекающих в клетке окислительных процессов. Все воздействия, нарушающие нормальное дыхание (NaCN, наркотики), задерживают обмен ФП.

4. Интенсивность обмена ФП в первую очередь связана с механизмом окислительного фосфорилирования. В присутствии яда окислительного фосфорилирования (ДНФ), несмотря на сохранение уровня дыхания, обмен ФП резко снижается.

5. В качестве субстрата, окисление которого связано с обменом ФП, может служить глюкоза, но не глутаминовая кислота.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
27 I 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Г. Е. Владимиров, Физиол. журн. СССР, **39**, № 1, 1 (1953). ² J. N. Davidson, W. M. McIndoe, R. M. Smellie, Biochem. J., **49**, XXXVI (1951). ³ J. N. Davidson, S. C. Frazer, W. C. Hutchison, *ibid.*, **49**, 311 (1951). ⁴ A. Marshak, F. Calvet, J. Cell. Comp. Physiol., **34**, 451 (1949). ⁵ R. J. Rossister, H. A. De Luca, K. P. Strickland, Feder. Proc., **11**, 277 (1952). ⁶ R. M. Johnson, S. Albert, J. Biol. Chem., **200**, 335 (1953). ⁷ H. McIlwain, Biochem. J., **49**, 382 (1951). ⁸ G. Schmidt, S. Thannhauser, J. Biol. Chem., **161**, 83 (1945). ⁹ C. Fiske, V. Subbarow, *ibid.*, **66**, 375 (1925). ¹⁰ A. J. Samuels, L. L. Boyarsky, et al., Am. J. Physiol., **164**, 1 (1951). ¹¹ Г. А. П. Балаж, Ф. Б. Штрауб, Укр. биох. журн., **25**, 17 (1953). ¹² H. Harris, E. M. Taubner, M. Messer, Nature, **168**, No. 4282, 214 (1951). ¹³ W. H. Elliott, *ibid.*, **161**, No. 4082, 128 (1948).