

УДК 543.545.08+577.12+577.11+587.088

БИОХИМИЯ

И. И. ДОВГАЛЕВИЧ

**СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ ТКАНЕЙ.
ВЫДЕЛЕНИЕ И МОРФОБИОХИМИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА***(Представлено академиком Е. М. Крепом 11 IV 1975)*

Бурный рост исследований молекулярных основ мембранологии привел к созданию центрифуг различных моделей и конструкций ⁽¹⁾. Техника получения субцеллюлярных элементов клетки не может считаться достаточно совершенной, базируется на дифференциальном, изоплотностном и зональном центрифугировании, которые сложны и трудоемки. Этими методами получены субклеточные органеллы мозга ⁽²⁾, печени ⁽³⁾ и других тканей. В связи с необычной морфологией и физиологической функцией нервной системы данный этап анализа был медленным и прогресс достигнут с трудом. Митохондриальная фракция мозга, содержащая нервные окончания, была получена ^(4, 5) путем градиентного центрифугирования. Большинство исследователей выделяли синапсомы центрифугированием грубой митохондриальной фракции в непрерывном градиенте сахарозы или фиколла и прерывном градиенте сахарозы с хлористым цезием ⁽⁶⁾.

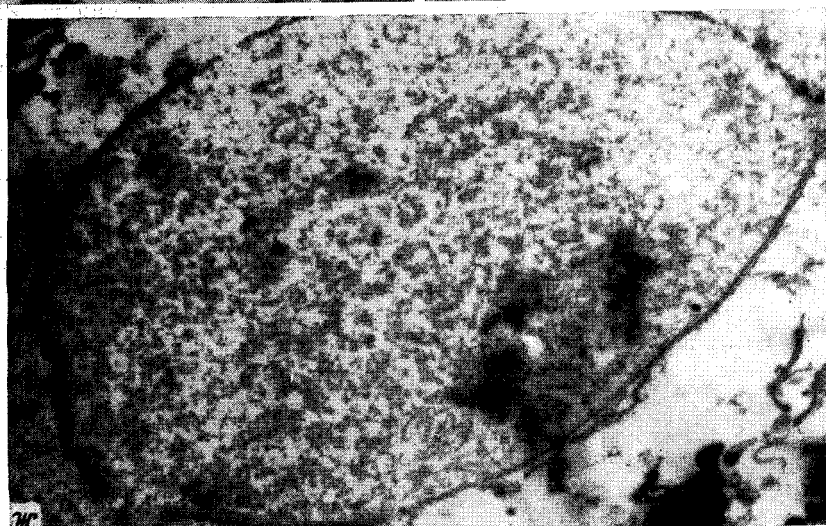
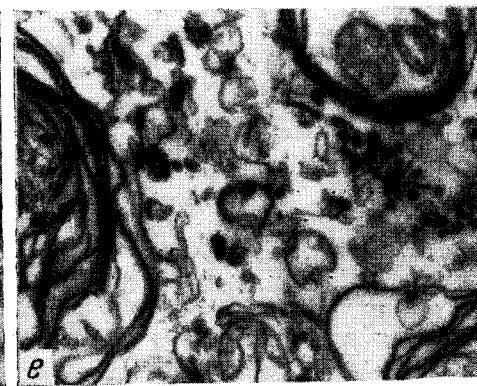
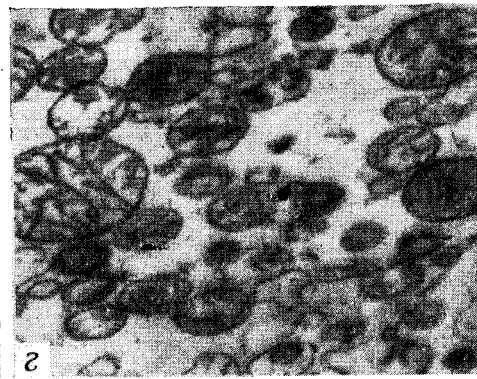
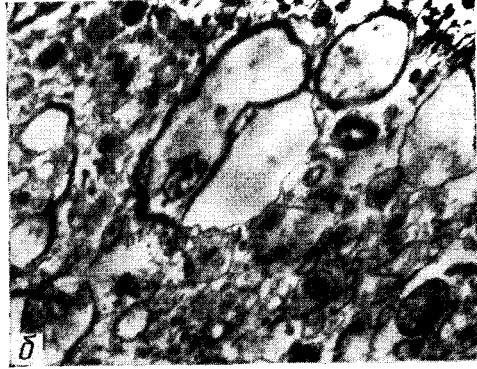
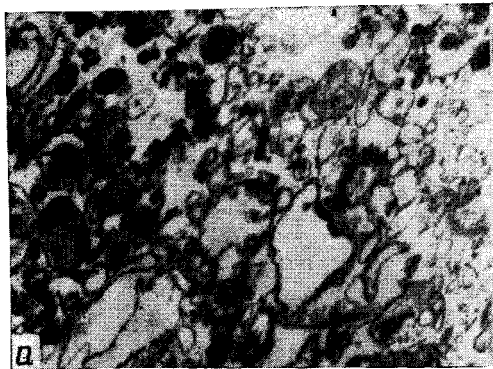
Целью настоящего исследования является создание метода, позволяющего выделить субклеточные структуры за относительно короткий период времени, серийно, метода, простого в эксплуатации. Для этого использовано известное свойство передвижения заряженных частиц в растворе электролита в зависимости от их заряда, молекулярного веса и размеров. Задача решается при помощи сконструированного нами прибора для электрофореза в градиенте плотности сахарозы, который, в отличие от других методов зонального электрофореза ⁽⁷⁾, позволяет разделить не только макромолекулы, но и суспензии цельных клеток и субклеточных структур. Поставленная цель достигается тем, что в секторных или цилиндрических колонках для носителя (сахароза, фиколл, хлористый цезий и др.) нижний конец оснащен полупроницаемой пленкой или же пробкой из 1,5% агара или 7,0% полиакриламидного геля; создают градиент плотности сахарозы, последовательно наслаивая 1,2; 1,0; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5 и 0,32 *M* растворы, приготовленные на трис-буфере, pH 7,4, содержащем $5 \cdot 10^{-3}$ *M* хлористый натрий. При помощи шприца в колонки вносят 0,5–1,0 мл гомогената ткани (мозг, печень, почки и др.) в 0,25 *M* сахарозе и наверх наслаивают 0,25 *M* сахарозу. Верхний и нижний электродные сосуды заполняют фосфатным буфером pH 7,4 так, чтобы в верхнем сосуде уровень электролита был выше электрофоретических колонок. Электрофорез проводят при 0–4°, 8 в/см, силе тока 3 ма на колонку в течение 1,5–2,0 час. В случае необходимости визуального контроля за передвижением фракций гомогенат ткани (0,5 г) вносят вместе с раствором метиленового синего, гемоглобина или цитохрома с.

Чистота полученных фракций контролировалась методом световой, фазово-контрастной и электронной микроскопии. Биохимический контроль проводился путем определения активности моноаминоксидазы (⁸), ацетилхолинэстеразы (⁹), цитохромоксидазы (¹⁰), сукцинатдегидрогеназы (¹¹), глутаматдегидрогеназы (¹²), малатдегидрогеназы (¹³) и содержания аминокислот (¹⁴) и белка (¹⁵).

Было установлено, что гомогенаты мозга, печени и других тканей разделяются на ряд четких фракций: А, Б, В, Г, Д, Е и Ж, различающихся по плотности окраски и электрофоретической подвижности, зависящих от изоэлектрической точки субклеточных структур, рН буфера, градиента плотности сахарозы и электролита.

Данные световой, фазово-контрастной и особенно электронной микроскопии (рис. 1) показывают, что гомогенат головного мозга разделяется на семь фракций, имеющих характерную структуру и не являющихся артефактом изоляции или фиксации. Каждая субфракция содержала многочисленные клеточные частицы, размеры которых увеличиваются от низкой концентрации сахарозы к более высокой, от катода к аноду. Электронная микроскопия фракции А показывает, что она содержит главным образом маленькие светоположительные везикулы. Следующая фракция (Б) отличается от первой и состоит преимущественно из мембранных профилей, шероховатого эндоплазматического ретикулума, маленьких синапсомальных и гранулярных везикул. Кроме того, встречаются отдельные обрывки миелиновых волокон и аксоны (рис. 1, Б). Следует отметить, однако, что в этой фракции встречаются преимущественно агрегаты мембранных профилей гранулярного и агранулярного характера. Представляет, на наш взгляд, интерес и тот факт, что в ней обнаружена преимущественная локализация гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК). Как оказалось после морфологического и электронно-микроскопического анализа, особой чистотой разделения отличается фракция В (рис. 1, В), которая более чем на 90% состоит из микросом (гладких и шероховатых мембран), правда, изредка встречаются мембранные фрагменты, и в том числе постсинаптические. Что же касается следующей фракции — Г (рис. 1), то она характеризуется большим количеством митохондрий с отдельно встречающимися светоположительными лизосомами, включает отдельные фрагменты маленьких нервных окончаний, содержащих синаптические везикулы и микросомы. В целях обнаружения митохондрий среди других субклеточных органелл полученную фракцию окрашивали янусгрюном или тетразолием с последующей микроскопией. Митохондрии после фиксации приобретают характерную розовую окраску, контрастно выделяющуюся на фоне окрашенных в голубой цвет других элементов клеток. Таким образом, можно считать, что фракция Г представляет собой митохондрии с отдельными пре- и постсинаптическими мембранами и профилями плазматических мембран. Как видно из рис. 1, фракция Д содержит изолированные нервные окончания среднего и большого размеров, изредка встречаются субсинаптические мембраны. Электронная микроскопия этой фракции показывает также, что многочисленные нервные окончания содержат большое количество синаптических и интрасинапсомальных митохондрий. В отдельных нервных окончаниях могут встречаться и вакуолизированные везикулы. Кроме того, хорошо видно, что маленькие фрагменты нервных окончаний содержат синаптические везикулы, профили мембран, возможно синаптических, отдельные фрагменты миелина, микросомы и светоположительные везикулы. Электронно-микроскопическое ис-

Рис. 1. Электронная микрофотография субклеточных фракций головного мозга крыс. А — фракция мелких синаптических везикул; Б — синапсомальная фракция; В — микросомальная фракция; Г — митохондриальная фракция; Д — фракция нервных окончаний (крупных) + синапсомы; Е — миелиновая фракция; Ж — ядерная фракция



следование электрофоретической фракции Е позволяет утверждать, что в данном случае мы имеем дело с типичной фракцией миеллина, нервных окончаний (крупных), содержащих аксоплазму, пре- и постсинаптические мембраны и светоположительные тельца. И, наконец, последняя, седьмая, фракция (Ж) мозга крыс содержит ядра с хорошо очерченной мембраной и внутренним содержимым. К тому же в этой фракции имеется достаточно большое количество мелких синапсом, фрагментов цитоплазматических мембран и постсинаптических мембран.

Проведенный биохимический анализ подтверждает электронно-микроскопические данные. Оказалось, что сукцинатдегидрогеназа, глутаматдегидрогеназа, цитохромоксидаза локализованы преимущественно в митохондриальной фракции Г. Моноаминоксидаза (МАО) и ацетилхолинэстераза (АХЭ) также обнаруживают строгую специфичность распределения по субцеллюлярным структурам. Максимум активности МАО сосредоточен во фракции Г, митохондриальной; АХЭ — во фракции А. Интересно, что фракция крупных синапсом Д также имеет достаточно высокую активность МАО, что, вероятно, следует считать результатом присутствия значительного количества интрасинапсомальных митохондрий. Что же касается АХЭ, то активность этого фермента локализована главным образом в синаптических пузырьках фракции А. Нами также установлено специфическое распределение по субклеточным фракциям мозга и печени изоферментов гексокиназы, альдолазы, малатдегидрогеназы, аланин- и аспаргатаминотрансферазы и белка.

Перераспределение активности АХЭ и МАО свидетельствует о том, что фракция А головного мозга содержит холинэргические везикулы, а фракция Д — нехолинэргические, возможно — адренергические. Особый интерес в связи с этим представляют данные о локализации ГАМК, глутамата и глицина по субклеточным фракциям серого вещества головного мозга. Оказалось, что ГАМК и глицин находятся преимущественно во фракции Б, а глутамат — во фракции В. Это тем более важно в свете данных о нейротрансмиттерной функции этих аминокислот.

Таким образом, представленный экспериментальный материал свидетельствует о том, что разработанный нами метод фракционирования гомогенатов мозга, печени и других тканей крыс при помощи электрофореза в градиенте плотности сахарозы позволяет получать достаточно индифферентные фракции синаптических мембран, микросом, синапсом, митохондрий, миеллина, синаптических пузырьков и ядер. Локализация активности АХЭ, МАО, сукцинатдегидрогеназы, глутаматдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и других ферментов, а также ГАМК, глутамата или глицина свидетельствует о том, что фракция А мозга является преимущественно холинэргическими везикулами, фракция Б — ГАМК-содержащими везикулами. Электронно-микроскопический анализ подтверждает высокое содержание адренергических везикул во фракции Д и холинэргических во фракции А головного мозга крыс. Веским аргументом в пользу полученных данных являются результаты спектрофотометрического исследования взаимодействия ацетилхолина с рецепторным белком полученных фракций мозга и печени, выявившие появление гипохромного эффекта в области 200—350 нм.

Статистический анализ различных типов субцеллюлярных органелл электрофоретических фракций гомогенатов тканей животных, характеристика их содержимого и размеров будут опубликованы позже.

Симферопольский государственный университет
им. М. В. Фрунзе

Поступило
22 XII 1974

Сектор геронтологии
Академии наук БССР
Минск

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Т. Боуэн, Введение в ультрацентрифугирование, М., «Мир», 1973.
- ² Е. М. Крепс, К. Г. Манукян и др., В сб.: Проблемы нейрохимии, М.—Л., «Наука», 1968, стр. 124.
- ³ А. А. Покровский, В. И. Арчаков, Современные методы в биохимии, М., «Медицина», 1968.
- ⁴ V. P. Whittaker, Biochem. J., v. 72, 694 (1959).
- ⁵ E. De Robertis, A. P. de Iraldi et al., J. Biophys. Biochem. Cytol., v. 9, 229 (1961).
- ⁶ I. B. Levitan, E. Mushynski, G. Ramirez, J. Biol. Chem., v. 247, № 17, 5376 (1972).
- ⁷ H. Svensson, Methods of Biochemical Analysis, v. 10, N. Y., 1958, p. 6, 195.
- ⁸ D. Bennet, N. Giarman, J. Neurochem., v. 12, 911 (1965).
- ⁹ S. I. Hestrin, Biochem. J., v. 180, 249 (1949).
- ¹⁰ E. W. Simon, Biochem. J., v. 69, 67 (1958).
- ¹¹ E. Kun, L. Abood, Science, v. 109, 144 (1949).
- ¹² D. N. Emerson, Comp. Biochem. Physiol., v. 20, № 1, 245 (1967).
- ¹³ C. J. Thorne, O. Nathan, N. Kaplan, J. Biol. Chem., v. 238, № 5, 1861 (1963).
- ¹⁴ И. И. Довгалевич, Сб.: Биохимия, т. 4, Минск, 1973, стр. 171.
- ¹⁵ O. H. Lowry, A. Rosenbrough et al., J. Biol. Chem., v. 193, 265 (1951).