

УДК 591.48:577.112:547.953

ЛИПИДНЫЙ КОМПОНЕНТ ПРОТЕОЛИПИДОВ РАЗНЫХ ОТДЕЛОВ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ И СУБКЛЕТОЧНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ МОЗГА

МАНУКЯН К. Г.

Липидный компонент протеолипидов (ПЛ) из разных отделов нервной системы и субклеточных образований мозга имеет наряду с различиями ряд общих черт. Все ПЛ характеризуются присутствием менее прочно связанного компонента, содержащего большие количества неполярных липидов и нейтральных фосфолипидов, и более прочно связанного, в состав которого входят преимущественно или только кислые липиды. Различия в липидном составе ПЛ из разных субклеточных образований в основном обусловлены разницей в содержании двух кислых фосфолипидов: фосфатидилсерина, который преобладает в фосфолипидах ПЛ, выделенных из миелина и белого вещества мозга, и дифосфатидилглицерина, преобладающего в ПЛ, выделенных из митохондрий и серого вещества мозга. На основании сопоставления данных относительно липидного и белкового компонента ПЛ из разных субклеточных структур мозга делается заключение о существовании по крайней мере двух типов ПЛ: миелинового и митохондриального. Обсуждается возможная роль ПЛ, в частности, их липидного компонента в клеточных мембранах нервной и других тканей.

Протеолипиды (ПЛ), обнаруженные впервые Folch и Lees в 1951 г. [1], представляют особую группу липопротеинов, характеризующихся специфической растворимостью в органических растворителях, которая обусловлена в основном гидрофобной природой белка ПЛ, богатого неполярными аминокислотами, и поддерживается связанными с ним липидами. С целью подчеркнуть эту особенность они и были названы протеолипидами. ПЛ являются мембранными компонентами многих животных, растительных и микробных клеток [2]. Особенно богата ПЛ нервная ткань и, главным образом, белое вещество мозга, где они локализованы в основном в миелине, составляя 30—50% общего белка миелина, выделенного из головного мозга млекопитающих [3, 4]. В небольших количествах ПЛ входят также в состав других субклеточных образований нервной ткани: митохондрий, синапсом, синапсомальных мембран, синаптических пузырьков, микросом, ядер [5, 6]. Из других органов наиболее богато ПЛ сердце, где они являются главным образом компонентами митохондрий [7]; в растениях ПЛ входят в основном в состав хлоропластов [8].

Интерес к изучению ПЛ нервной системы в настоящее время определяется, с одной стороны, их преимущественной локализацией в миелине ЦНС, где они являются главным белковым компонентом, с дру-

той—предполагаемым участием этих соединений в процессах синаптической передачи в качестве рецепторов ряда медиаторов и нейроактивных аминокислот [9—12]. ПЛ придает определенную роль также в функции митохондрий, в частности, в процессах трансформации энергии. Известно, что чувствительная к олигомицину протонпроводящая часть митохондриальной АТФазы является ПЛ [13].

Хотя роль ПЛ пока не выяснена, полагают, что они, являясь важными структурными компонентами различных клеточных мембран, могут участвовать в ряде мембраносвязанных функций, в частности в процессах протонного и ионного транспорта [14—17]. Функция ПЛ в мембранах определяется, вероятно, особыми свойствами белкового компонента (гидрофобностью, конформационной гибкостью, способностью к агрегации) и входящими в их состав липидами. Липиды играют важную роль в регуляции функций белков, с которыми они связаны, в частности, многих ферментных систем.

В настоящее время накоплен ряд данных о составе, строении, свойствах и локализации ПЛ в нервной системе [2, 18, 19]. Они относятся в основном к белковому компоненту этих комплексов.

В связи с различной локализацией и предполагаемой разницей ролей ПЛ в мембранных образованиях клетки возникает вопрос о сходстве и отличиях ПЛ, входящих в состав разных субклеточных структур. Целью проводимых нами в течение ряда лет исследований являлось изучение наряду с белковым липидного компонента ПЛ, выделенных в виде растворимых, очищенных в разной степени от липидов липидно-белковых комплексов из различных отделов нервной системы некоторых млекопитающих и субклеточных образований мозга крысы. Имеющиеся в литературе в отношении липидного компонента этих комплексов данные других авторов касаются ПЛ, выделенных из белого вещества мозга, и получены главным образом Folch и сотр. [2, 19].

Материалы и методы

Выделение субклеточных частиц из мозга крысы производили по методике, описанной ранее [6]. В результате фракционирования получали достаточно чистые фракции митохондрий, синапсом, микросом, ядер и две отличающиеся по размерам миелиновых фрагментов фракции миелина. Содержащий несколько более крупные фрагменты миелин был обозначен как «тяжелый» (Мт), а содержащий несколько более мелкие—как «легкий» (Мл).

Липидные экстракты разных отделов нервной системы и субклеточных образований мозга получали и отмывали по методу Folch и др. [20]. Содержание белка ПЛ определяли методами [21, 22]. ПЛ выделяли методом эмульгирования-центрифугирования [23] с внесенными нами видоизменениями. Лиофилизированные осадки изолированных этим методом неочищенных ПЛ (НПЛ), содержащих 40—60% белка и 60—40% липидов, промывали в зависимости от задачи 2—4 раза при

—20, —12 или +23° 200-, 300-, 600-кратным объемом смеси спирт—эфир (1:1). Полученные таким образом очищенные ПЛ (ОПЛ) растворяли во влажных хлороформ-метаноловых смесях, определяли оптическую плотность при 278 нм, после чего подвергали многократному упариванию из насыщенной водой хлороформ-метаноловой смеси для расщепления связей между липидами и белками. Липиды экстрагировали из расщепленных ОПЛ сначала нейтральной, затем подкисленной HCl до 0,04 N хлороформ-метаноловой смесью [24, 25]. Фосфолипиды (ФЛ) разделяли методом восходящей хроматографии на бумаге, пропитанной кремниевой кислотой [26], а полифосфонозитиды (ПФИ)—дополнительно на бумаге, пропитанной формальдегидом [27]. Галактозу гликолипидов (цереброзиды, сульфатиды) определяли орциновым методом [28]. Для пересчета на гликолипиды полученные величины умножали на фактор 4,6. Холестерин (ХС) определяли по реакции Либермана-Бурхарда в модификации Прохоровой и Туниковой [29].

Исследованию подвергали экстракты липидов, выделенных нейтральной и подкисленной хлороформ-метаноловой смесью из ОПЛ, а также спирт-эфирные отмывы НПЛ. О липидном составе НПЛ судили по сумме: липиды спирт-эфирных отмывов+липиды ОПЛ.

Результаты и обсуждение

ПЛ являются сложными мембранными липопротеинами, в построение которых могут быть вовлечены разные типы липидно-белковых связей (вандерваальсовы силы, водородная связь, но в основном гидрофобные и ионные взаимодействия). Одни липиды связаны менее прочной связью, диссоциирующей в различной степени в зависимости от условий выделения, другие—более прочной, для расщепления которой необходимо применить подкисленные растворители [2, 19].

Для выделения менее прочно связанных липидов мы промывали НПЛ смесью спирт—эфир (1:1) при разных температурах, что способствовало, вероятно, последовательному удалению не только наименее прочно связанных липидов, но и части более прочно связанных. Известно, что спирт как полярный растворитель расщепляет некоторые липидно-белковые связи [30].

Как видно из табл. 1, содержание белка ПЛ общих липидных экстрактов, а также НПЛ и ОПЛ в белом веществе больших полушарий мозга в 8—11 раз выше, чем в сером. С другой стороны, оно снижается в белом веществе разных отделов нервной системы в кранио-каудальном направлении, достигая очень низких величин в периферическом нерве [24, 25]. Исследования показали, что в наибольших количествах и более прочно с ПЛ связаны ФЛ, в меньшей степени—гликолипиды и наименее прочно—ХС (табл. 1), что соответствует данным Folch и соотр. для ПЛ из белого вещества больших полушарий [2]. Параллельно с белком ПЛ содержание связанных с ним липидов также снижается в белом веществе нервной системы в кранио-каудальном направлении

[27], так что НПЛ и ОПЛ, выделенные из белого вещества разных отделов ЦНС собаки, почти не отличаются по содержанию ФЛ, гликолипидов и ХС, тогда как в ПЛ из седлищного нерва концентрация всех этих липидов выше (табл. 1).

Коэффициент оптической плотности при 278 нм препаратов ПЛ из разных отделов ЦНС очень сходен и колеблется в пределах 7—10—13 в зависимости от степени очистки от липидов, у ПЛ из седлищного нерва он в 2,0—2,5 раза ниже (табл. 1).

В табл. 2 представлены данные по фосфолипидному составу общих липидных экстрактов. НПЛ и ОПЛ серого и белого вещества мозга крупного рогатого скота. Для получения ОПЛ осадки НПЛ промывали 2 раза 600-кратным объемом смеси спирт—эфир (1:1) при 23°. С НПЛ серого и белого вещества мозга связано 5,7 и 13,5, а ОПЛ—1,0 и 4,4% всех ФЛ общего липидного экстракта этих частей мозга соответственно.

НПЛ, выделенные как из серого, так и белого вещества мозга, держали заметные количества нейтральных ФЛ—фосфатидилхолина (ФХ), сфингомиелина (СФМ), а также фосфатидилэтанолamina (ФЭА). Однако по сравнению с общими липидными экстрактами они характеризовались более низким процентным содержанием нейтральных ФЛ—ФХ и СФМ и более высоким кислых—дифосфатидилглицерина (ДФГ) или кардиолипина, монофосфоинозотида (МФИ) и фосфатидилсерина (ФС). Промывание спирт—эфирной смесью при +23° приводило к экстракции 82% всех ФЛ, связанных с НПЛ серого вещества, и 53%—белого. При этом из НПЛ почти полностью (на 95—97%) удалялись нейтральные ФЛ. С полученными ОПЛ как серого, так и белого вещества мозга были связаны в основном кислые ФЛ. Преобладающим ФЛ ОПЛ серого вещества являлся ДФГ, составляющий 38% от суммы всех связанных ФЛ, затем ФС и МФИ. В ОПЛ из серого вещества всегда присутствовало также некоторое количество ФХ. В отличие от серого вещества преобладающими ФЛ ОПЛ из белого вещества являлся ФС, составляющий 49% всех ФЛ, затем ДФГ, МФИ и МФИ. Процент кислых ФЛ, более прочно связанных с белком ПЛ, в белом веществе был значительно выше, чем в сером.

Наши исследования с выделением цельных, неразрушенных ПФИ, а не продуктов их гидролиза, подтверждают данные Folch и соотр. [31, 32] о том, что в состав ПЛ белого вещества мозга входит ТФИ более прочно, чем другие липиды, связанные с белками этих комплексов [27]. Он отсутствовал в спирт—эфирных отмывках НПЛ и извлекался из ОПЛ только подкисленной хлороформ—метаноловой смесью. Дифосфоинозотида в ПЛ мало.

Следует отметить, что на хроматограммах нейтральных и, особенно, подкисленных липидных экстрактов ОПЛ на кремниевой бумаге всегда выявлялось отчетливое, яркое пятно, соответствующее сульфатиду.

• Исследование НПЛ и ОПЛ, выделенных из белого вещества раз-

Таблица 1

Содержание и липидный состав ПЛ из серого и белого вещества больших полушарий:
мозга крупного рогатого скота и белого вещества разных отделов нервной
системы собаки

Животное, отдел нервной системы	мг г влажной ткани			E ₁ ^{1%} _{1 см} 278 нм		Липиды (мг 100 мг ПЛ)					
	Белок ПЛ об- щих ли- пидных экстрак- тов	НПЛ	ОПЛ	НПЛ	ОПЛ	Фосфолипиды		Гликолипиды		Холестерин	
						НПЛ	ОПЛ	НПЛ	ОПЛ	НПЛ	ОПЛ
Крупный рогатый скот <i>Большие полушария</i> Серое вещество (cortex)	2,1±0,1 (11)	4,9—6,4	2,3—2,9	7,0	11,2	41,3	10,8—13,7	3,2	2,1	—	—
Белое вещество (sep- trum semiovale, cor- pus callosum)	23,4±0,4 (12)	40,6±1,2 (7)	24,4±0,4 (13)	7,3	10,1— 13,3	30,0	12,2—17,6	5,5—10,0	2,1	11,6	0,1
Собака											
<i>Белое вещество</i>											
Большие полушария	22,4±0,5 (16)	42,8±1,9 (14)	22,0±0,8 (12)	—	11,8	35,2±0,5 (6)	17,1±0,3 (15)	6,5±0,4 (7)	3,2±0,3 (8)	12,8	0,2
Продолговатый мозг	17,4±0,5 (11)	32,7±2,0 (10)	15,9±0,7 (10)	—	12,4	35,3±0,6 (7)	18,4±0,5 (12)	10,0±0,5 (6)	3,7±0,3 (8)	15,4	0,3
Спинной мозг, отдел шейный (1—8 сегмен- ты)	15,5±0,4 (17)	27,7±1,4 (14)	14,0±0,7 (11)	—	11,6	35,2±0,6 (7)	17,8±0,5 (13)	8,9±0,6 (7)	3,7±0,3 (9)	14,2	0,4
Грудной (9—21 сегмен- ты)	14,7±0,4 (16)	29,9±1,1 (14)	13,6±0,4 (12)	—	11,7	34,6±1,3 (7)	17,4±0,5 (14)	9,5±0,8 (6)	3,5±0,4 (8)	14,4	0,4
Пояснично-крестцовый (22—31 сегменты)	15,3±0,4 (16)	30,2±2,0 (14)	14,4±0,5 (13)	—	10,6	35,8±1,2 (7)	17,3±0,6 (15)	9,5±0,4 (7)	3,6±0,2 (9)	16,5	0,8
<i>Седалищный нерв</i>	1,9±0,1 (18)	9,0±0,4 (12)	1,8±0,1 (12)	—	4,9	11,8±3,3 (9)	21,3±1,0 (10)	15,1±1,6 (6)	15,1±1,6 (7)	23,5	1,8

ных отделов нервной системы собаки, показало, что ПЛ белого вещества разных отделов ЦНС весьма сходны по своему фосфолипидному составу. Здесь, как и в белом веществе мозга крупного рогатого скота, с НПЛ связаны заметное количество ФЭА и нейтральных ФЛ, а с ОПЛ—в основном кислые ФЛ и главным образом ФС, составляющий 36—46% от суммы ФЛ,ДФГ—11—13%,ТФИ—5—8,5%,МФИ и фосфатидная кислота (ФК)—по 5—7%. Таким образом, в состав белого вещества разных отделов ЦНС входят, по-видимому, одни и те же протеолипидные комплексы. В отличие от ОПЛ центрального белого вещества в ОПЛ из седалищного нерва отсутствуют ПФИ и неидентифицированные кислые ФЛ. Основным ФЛ НПЛ и ОПЛ является СФМ, составляющий 42% всех связанных с ОПЛ ФЛ, затем уже ФС—23%.ДФГ в ОПЛ из седалищного нерва очень мало—2%. Следует отметить, что этого ФЛ в нерве вообще гораздо меньше, чем в белом веществе ЦНС [33].

Таблица 2
Фосфолипидный состав общих липидных экстрактов и НПЛ, изолированных из серого и белого вещества больших полушарий мозга крупного рогатого скота (в % от суммы ФЛ)

Фосфолипиды	Серое вещество			Белое вещество		
	Общий липидный экстракт	НПЛ	ОПЛ	Общий липидный экстракт	НПЛ	ОПЛ
Линия старта	1,93	2,25	3,32	2,53	—	—
Неидентифицированный ФЛ, сорбированные на сульфатиде	—	0,81	4,43	—	2,56	4,71
Монофосфонозитид	1,54	1,42	3,11	1,45	0,58	1,78
Дифосфонозитид	3,92	4,83	1,59	2,37	1,66	2,04
Трифосфонозитид	—	—	—	—	3,99	7,75
Сфингомиелин	—	—	—	—	0,52	1,61
Фосфатидилхолин	10,79	8,22	4,43	21,07	3,24	10,00
Фосфатидилэтаноллин	38,97	30,75	5,33	26,47	10,42	0,91
Неидентифицированный Фосфатидилсерин	—	0,53	2,90	—	17,45	1,31
Фосфатидилэтаноламин	15,21	16,76	21,43	20,56	0,71	3,37
Дифосфатидилглицерин	24,50	26,45	3,88	23,04	26,22	49,14
Фосфатидная кислота	3,08	7,98	37,58	2,51	27,34	2,94
	—	—	—	—	4,70	12,66
	—	—	—	—	0,58	1,78
ФЛ в % от веса ПЛ	—	40,30	13,68	—	31,30	15,60

Субклеточное распределение белка ПЛ в мозгу крысы представлено на рис. 1. Данные приводятся в процентах от содержания белка ПЛ в общем гомогенате, которое равняется 5,35 мг/г влажной ткани. Большая часть ПЛ в мозгу локализована в миелине, белок ПЛ двух фракций которого составляет 3,7 мг/г влажной ткани. Содержание белка ПЛ в липидных экстрактах митохондрий и синапсом почти одинаково и равняется 0,44—0,45 мг/г. В микросомах оно ниже—0,26 мг/г и особенно низкое в растворимой фракции и ядрах—0,1 мг/г [6].

На рис. 2—5 приведен фосфолипидный состав НПЛ, выделенных из различных субклеточных частиц, и ОПЛ, полученных после промывания НПЛ спирт-эфирной смесью при различных температурах. ФЛ

составляют 30—39% от веса НПЛ из разных субклеточных образований и 8—25% от веса ОПЛ в зависимости от условий очистки. Преобладающими ФЛ НПЛ всех изученных субклеточных частиц являются ФХ и ФЭА, составляющие каждый 25—30% от суммы всех связанных ФЛ. В ПЛ, отмываемых при -12° , процентное содержание этих и остальных нейтральных ФЛ снижается и повышается содержание кислых. ПЛ разных субклеточных образований, так же как и ПЛ из исследованных отделов нервной системы, отмываемые при $+23^{\circ}$, содержат только или преимущественно кислые ФЛ и в основном ФС,ДФГ и МФИ.

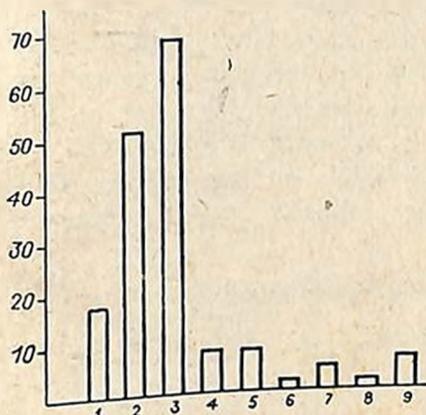


Рис. 1. Белок ПЛ субклеточных фракций мозга крысы в % от белка ПЛ общего гомогената: 1—Мт, 2—Мл, 3—Мт+Мл, 4—синапсомы, 5—митохондрии, 6—ядра, 7—микросомы, 8—растворимая фракция, 9—прочие отмывы

В ПЛ общего гомогената, очищенных при $+23^{\circ}$ (рис. 2), основными ФЛ являются ФС и ДФГ, содержащиеся примерно в равных количествах и составляющие 36 и 34% от суммы ФЛ, связанных с ОПЛ; 10,5% составляет МФИ и 7% ФХ.

НПЛ и ОПЛ из двух фракций миелина—Мт и Мл очень сходны по своему фосфолипидному составу [34]. Для ОПЛ миелина, как и белого вещества мозга, характерно преобладание ФС, содержание которого достигает 62% в ФЛ ПЛ, очищенных при $+23^{\circ}$, затем следуют МФИ—12—14% и ДФГ—9—11% (рис. 3).

В ОПЛ из митохондрий основным ФЛ является ДФГ, составляющий 34% в ФЛ ПЛ, очищенных при -12° , и 46% в ФЛ ПЛ, очищенных при $+23^{\circ}$, меньший процент составляют ФС и ФХ—15—16% и МФИ—10% (рис. 4). Таким образом, ПЛ митохондрий по своему фосфолипидному составу ближе к ПЛ серого вещества мозга. Преобладание ДФГ еще более выражено в ПЛ, выделенных из сердца, где он составляет 60—70% всех ФЛ, связанных с ОПЛ [35].

ПЛ синапсом занимают промежуточное положение между ПЛ миелина и митохондрий и характеризуются, как и ПЛ общего гомогената, примерно одинаковым содержанием ФС и ДФГ, которые являются преобладающими ФЛ (рис. 5). В очищенных при $+23^{\circ}$ ПЛ из синапсом

наптосомальных мембран основным ФЛ является ФС, составляющий 49% от суммы всех связанных ФЛ, затем ДФГ—25,4%, ФХ—7,8% и МФИ—6%.

Результаты проведенных исследований подтверждают, что в формировании протеолипидных комплексов могут участвовать разные липидно-белковые связи. Менее прочно связаны с белком ПЛ непонные липиды: ХС, часть гликолипидов (цереброзиды) и нейтральные ФЛ. Они почти полностью удаляются из ПЛ спирт-эфирной смесью при +23°. Более прочно связаны с белком ПЛ сульфатиды и кислые ФЛ: ФС, ДФГ и МФИ, которые частично экстрагируются из НПЛ спирт-эфирной смесью, но в основном остаются в составе ОПЛ. В связывании этих липидов, по-видимому, принимают участие как поные, так и гидрофобные связи. Наиболее прочно с ПЛ серого вещества связаны два неидентифицированных кислых ФЛ, которые вообще не экстрагируются спирт-эфирной смесью, а белого—также ПФИ и особенно ТФИ. Последний извлекается из ОПЛ подкисленной хлороформ-метаноловой смесью. Эти ФЛ связаны, вероятно, только ионными связями.

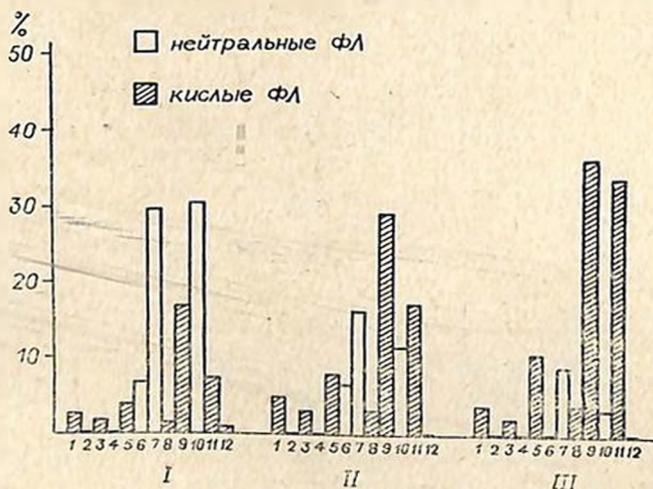


Рис. 2. Фосфолипидный состав (в % от суммы ФЛ)—НПЛ (I) и полученных после отмывания НПЛ смесью спирт-эфир (1:1) при -12° (II) и +23° (III) ОПЛ общего гомогената мозга крысы: 1—линия старта; 2—неидентифицированный; 3—ФЛ, сорбированные на сульфатиде; 4—лизолецитин; 5—МФИ; 6—СФМ; 7—ФХ; 8—неидентифицированный; 9—ФС; 10—ФЭА; 11—ДФГ; 12—ФК

Трудно утверждать, что все описанные связи имеют место *in vivo*, возможно, присоединение каких-то липидов происходит *in vitro* в процессе выделения препарата. Однако растворимость освобожденного от липидов апопротенина в воде [2, 19, 36] при полной нерастворимости в ней тканевых ПЛ свидетельствует о том, что в тканях апопротенин должен быть обязательно скомбинирован с липидами, которые стабилизируют белок ПЛ в его липофильной, водонерастворимой конформации.

В модельных опытах *in vitro* разными авторами получен ряд дока-

зательств о предпочтительном связывании апопротенна ПЛ из миелина с отрицательно заряженными липидами [37—39], что подтверждается и данными об изоэлектрической точке этого белка, равной 9,2 [40]. Bgain, Radin, изучив взаимодействие водорастворимого апопротенна из миелина с диспергированными липидами, пришли к заключению, что кислые и нейтральные липиды могут независимо и одновременно связываться с катионными и неполярными областями белка, причем анионные липиды связываются прочно с остатками основных аминокислот белка, тогда как нейтральные липиды менее прочно с гидрофобными участками [37].

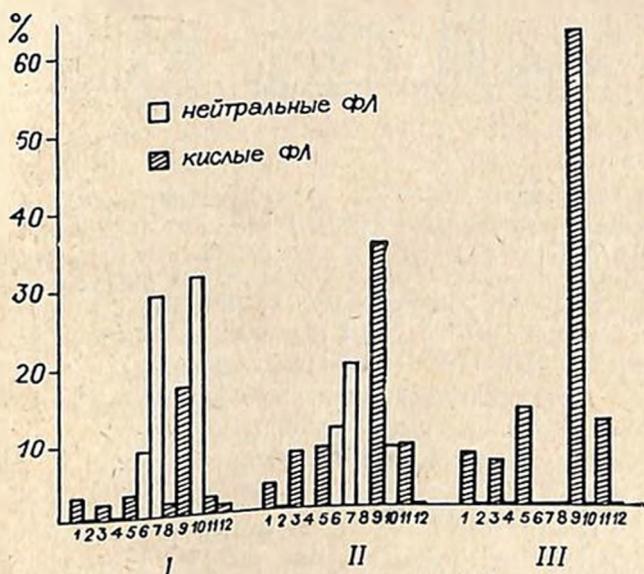


Рис. 3. Фосфолипидный состав (в % от суммы ФЛ)—НПЛ (I) и полученных после отмывания НПЛ смесью спирт—эфир (1:1) при -12° (II) и $+23^{\circ}$ (III) ОПЛ Мл из мозга крысы: 1—линия старта; 2—неидентифицированный; 3—ФЛ, сорбированные на сульфатиде, 4—лизолецитин; 5—МФИ; 6—СФМ; 7—ФХ; 8—неидентифицированный; 9—ФС; 10—ФЭА; 11—ДФГ; 12—ФК. ФЛ в мг/100 мг ПЛ: I—30,50; II—24,91; III—8,25

Проведенные нами исследования показали, что липидный компонент ПЛ, выделенных из разных отделов нервной системы и различных субклеточных образований мозга, имеет наряду с отличиями ряд общих черт.

Для всех изученных ПЛ характерно присутствие, с одной стороны, менее прочно связанного компонента, содержащего большие количества неполярных липидов и нейтральных ФЛ (в основном ФХ, а также ФЭА); с другой—более прочно связанного, в состав которого входят преимущественно или только кислые липиды (главным образом ФС, ДФГ и МФИ). Последние три кислых ФЛ являются обязательными компонентами ПЛ, выделенных из нервной ткани. Различия в липидном составе ПЛ разных субклеточных образований нервной ткани обусловлены в основном разницей в содержании двух из этих ФЛ: ФС и

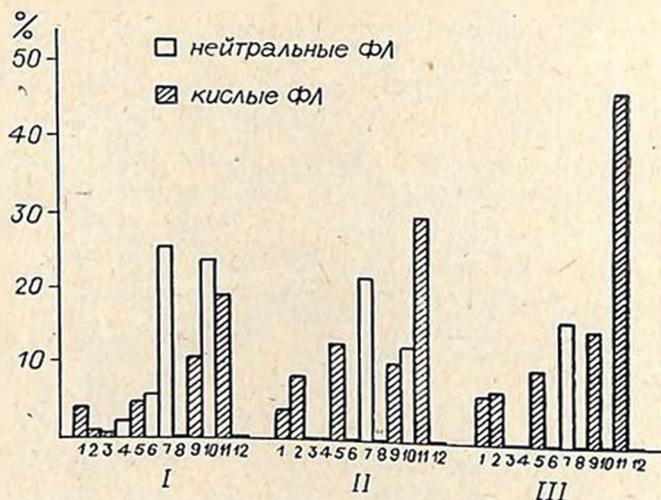


Рис. 4. Фосфолипидный состав (в % от суммы ФЛ)—НПЛ (I) и полученных после отмывания НПЛ смесью спирт—эфир (1:1) при -12° (II) и $+23^{\circ}$ (III) ОПЛ митохондрий из коры мозга крысы: 1—линия старта; 2—неидентифицированный; 3—ФЛ, сорбированные на сульфатиде; 4—лизолецитин; 5—МФИ; 6—СФМ; 7—ФХ; 8—неидентифицированный; 9—ФС; 10—ФЭА; 11—ДФГ; 12—ФК. ФЛ в мг/100 мг ПЛ: I—34,53; II—16,61; III—10,84

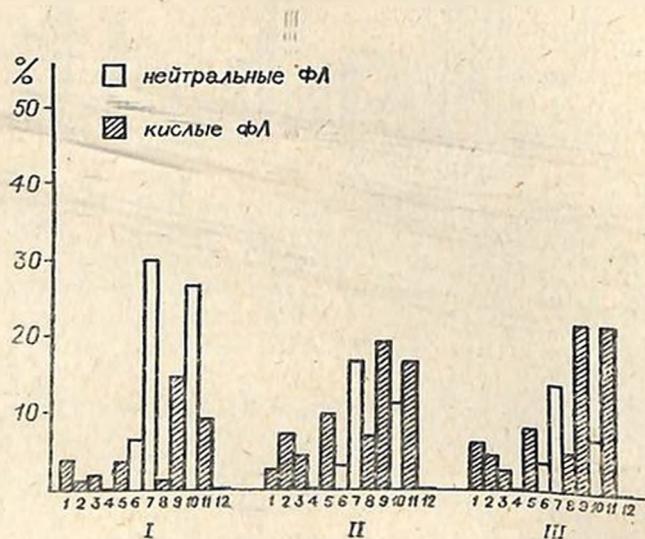


Рис. 5. Фосфолипидный состав (в % от суммы ФЛ)—НПЛ (I) и полученных после отмывания НПЛ смесью спирт—эфир (1:1) при -19° (II) и -12° (III) ОПЛ синапсом из мозга крысы: 1—линия старта; 2—неидентифицированный; 3—ФЛ, сорбированные на сульфатиде; 4—лизолецитин; 5—МФН; 6—СФМ; 7—ФХ; 8—неидентифицированный; 9—ФС; 10—ФЭА; 11—ДФГ; 12—ФК. ФЛ в мг/100 мг ПЛ: I—39,32; II—17,90; III—11,74

ДФГ. Следует отметить, что липидный состав ПЛ определяется в значительной степени общим липидным составом тех структур, где они локализованы. Для миелина и белого вещества мозга, основным фосфолипидом которых является ФС, характерно преобладание в ПЛ именно этого ФЛ, а также присутствие в ПЛ двух других преимущественно миелиновых липидов—ТФИ и сульфатида. В ПЛ из митохондрий и серого вещества мозга, а также сердца, преобладающим ФЛ является ДФГ-характерный митохондриальный липид, которому придается важная роль в структуре и функциях митохондриальных мембран.

ПЛ миелина и митохондрий, а также белого и серого вещества мозга, несколько отличаются и по своему белковому компоненту. Для ПЛ из миелина характерно присутствие в белковом составе, кроме белка ДМ-20, тогда как в ПЛ митохондрий присутствует в основном один белок, соответствующий ПЛ, но с несколько более высоким молекулярным весом [25]. N-концевой аминокислотой ПЛ из белого вещества мозга и миелина является глицин, а митохондрий — аспарагиновая кислота [41, 42]. Исследование аминокислотного состава показало, что по сравнению с ПЛ миелина и белого вещества мозга ПЛ митохондрий несколько богаче аспарагиновой кислотой, метионином, пролином, лейцином, изолейцином и беднее полуцистеином, треонином и тирозином [25, 41, 43].

Сопоставляя данные относительно белкового и липидного компонентов ПЛ из разных субклеточных образований мозга, можно прийти к заключению о существовании по крайней мере двух типов ПЛ: миелинового, присущего белому веществу ЦНС, и митохондриального, более характерного для серого вещества и других органов. ПЛ остальных субклеточных структур являются, возможно, комбинацией в какой-то степени этих двух типов, как, например, ПЛ синапсом. Не исключено, конечно, присутствие в нервной ткани и других ПЛ с иным липидным и белковым составом. Как было показано выше, ПЛ периферической и центральной нервной системы отличаются по липидному составу. Lunt и др. [44] нашли, что с холинорецепторным ПЛ из коры мозга связан в основном МФИ, составляющий 30—33% всех связанных с ПЛ ФЛ. Известное стимулирующее влияние ацетилхолина на обмен МФИ связано именно с этим его пулом.

Таким образом, ПЛ разных субклеточных структур нервной ткани отличаются по своему белковому и особенно липидному компоненту, чем, возможно, определяются в значительной степени различия их функции в зависимости от локализации.

Определенная роль ПЛ в сохранении стабильности мембран, а также в некоторых их функциях, в частности в процессах транспорта ионов, зависит, с одной стороны, от комплексных взаимодействий белка с индивидуальными липидными компонентами, с другой—от влияния самого белка на липидный бислой.

Для изучения некоторых из этих вопросов нами были реконструир-

рованы искусственные мембраны двух типов. С одной стороны, непосредственно из очищенных в разной степени от липидов ПЛ из белого вещества мозга, что оказалось возможным благодаря гидрофобной природе белка ПЛ [45, 46]. С другой — получены устойчивые плоские мембраны из смесей ПЛ с липидами белого вещества мозга [47]. Исследования показали, что сопротивление как протеолипидных, так и липидно-протеолипидных мембран на 2—3 порядка ниже, чем обычных липидных бислоев [45—47]. ПЛ резко снижают сопротивление, т. е. повышают проводимость, при нанесении их на бислоюю мембрану из общих ФЛ мозга или добавлении в виде липосом в раствор КСl, окружающий лецитиновую мембрану [45, 46].

Искусственные мембраны, реконструированные из очищенных в разной степени ПЛ из белого вещества мозга, содержащих от 70 до 8—15% липидов, обладают катионной проводимостью, причем во всех случаях проводимость ОПЛ выше, чем НПЛ. Однако, несмотря на большие различия в липидном составе, коэффициенты катионной специфичности всех исследованных ПЛ в отношении одновалентных катионов почти одинаковы и располагаются в следующем порядке: $N_a^+ > K^+ > C_s^+ > L_i^+$ [45, 46]. Пока трудно судить, насколько эти эффекты обусловлены белковой частью ПЛ, насколько липидной и, особенно, связанными с ПЛ кислыми липидами. Гидрофобный белок ПЛ может, с одной стороны, сам создать катионпроводящие пути через мембрану, с другой — вызвать реорганизацию липидов с образованием отрицательно заряженных участков. Показано, что введение этого белка в липосому приводит к иммобилизации части липидов с образованием так называемого «пограничного» слоя и повышению упорядоченности оставшихся свободными липидов [48]. Поскольку более прочно с белком ПЛ связаны кислые ФЛ, можно предположить, что присутствие этих отрицательно заряженных липидов, сконцентрированных вокруг гидрофобной части ПЛ, должно играть важную роль в индуцировании локальной ПЛ из миелина [49] и некоторых холинорецепторных тканей [50] свидетельствуют и данные других авторов.

В настоящее время в модельных опытах на липосомах и плоских мембранах, реконструированных из смесей ПЛ (в основном апопротенина из миелина) и липидов, с помощью различных физических методов исследования изучено влияние апопротенина на липидный бислой. Показано, что белок ПЛ в основном глубоко погружен в аполярную область липидного бислоя, но часть его выступает в водную фазу [48]. Об этом свидетельствуют и наши исследования, где было обнаружено, что искусственная липидно-протеолипидная мембрана представляет собой мозаику из бислоюных липидных участков и протеолипидных утолщений, занимающих около 30% площади поверхности и непосредственно граничащих с водной средой [47].

Каждая молекула апопротенина может повлиять в результате связывания на фазовый переход примерно 142 липидных молекул, что для

глобулярного белка соответствует пограничному слою из 3—4 концентрических слоев ФЛ, окружающих каждую белковую молекулу в мембране [48, 49]. Найдено также, что чрезвычайно малое количество белка ПЛ оказывает, подобно холестерину, выраженное влияние на поверхностную упаковку ФХ головок в мембране [51] и т. д.

Хотя роль ПЛ и связанных с ними липидов пока окончательно не выяснена, можно думать, что белок ПЛ наряду с другими присущими ему функциями должен через изменение физического состояния, фазовых переходов и упорядоченности окружающих липидов играть определенную роль в регуляции метаболизма и функций различных клеточных мембран нервной и других тканей.

LIPID MOIETY OF PROTEOLIPIDS FROM VARIOUS PARTS OF NERVOUS SYSTEM AND BRAIN SUBCELLULAR PARTICLES

MANUKIAN K. H.

Institute of Biochemistry, Armenian SSR Academy of Sciences, Yerevan

In addition to certain differences lipid moieties to proteolipids (PL) from various parts of nervous system and brain subcellular particles are much alike. All these PL are characterized by the presence of a loosely bound component containing great amount of non-polar lipids and neutral phospholipids, and a tightly bound component, which contains mainly or only acidic lipids.

Differences in lipid composition of PL from various subcellular particles are due mostly to variation in acidic phospholipids content: phosphatidylserine and cardiolipin. The former predominates in PL isolated from myelin and brain white matter and the latter—in PL from mitochondria and brain grey matter. Data on lipid and protein moiety of PL from brain various subcellular particles point to the existence of at least two types of PL: one in myelin and another in mitochondria. Possible function of cell membrane PL and especially their lipid component is discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Folch J., Lees M. J. *Biol. Chem.*, 191, 807—817, 1951.
2. Folch-Pi J., Stoffyn P. J. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 195, 86—107, 1972.
3. Eng L. F., Chao F. C., Gersit B., Pratt D., Tavaststjerna M. G. *Biochemistry*, 7, 4455—4465, 1968.
4. Mehl E., Halaris A. J. *Neurochem.*, 17, 659—668, 1970.
5. Lapetina E. G., Soto B. F., De Robertis E. J. *Neurochem.*, 15, 437—445, 1968.
6. Манукян К. Г., Левонян К. Л., Степанян А. А., Кирикосян Л. Г., Казарян Т. И. *Вопросы биохимии мозга*, 12, 68—80, Изд-во АН АрмССР, 1977.
7. Murakami M., Ozawa Y., Funahashi S. J. *Biochemistry (Japan)*, 54, 166—172, 1963.
8. Zill L. P., Harmon E. A. *Biochim. Biophys. Acta*, 53, 579—581, 1961.
9. De Robertis E. *Science*, 171, 3975, 963—971, 1971.
10. Fiszer de Plazas S., De Robertis E. J. *Neurochem.*, 23, 1115—1120, 1974.
11. Fiszer de Plazas S., De Robertis E. J. *Neurochem.*, 25, 547—552, 1975.

12. De Robertis Э. Ж. эвол. биох. и физиол., 12, 213—226, 1976.
13. Beechey R. B., Hubbard S. A., Linnett P. E., Mitchell A. D., Munn E. A. Biochem. J., 148, 533—537, 1975.
14. Cattel K. J., Knight J. G., Lindop C. R., Beechey R. B. Biochem. J., 117, 1011—1013, 1970.
15. Guerin M., Napias C. Biochemistry, 17, 2510—2516, 1978.
16. Racker E., Eytan E. J. Biol. Chem., 250, 7533—7541, 1975.
17. Racker E. J. Cell Physiol., 89, 697—700, 1976.
18. Lees M. B., Sakura D. J., Supristein V. S., Curatolo W. Biochim. Biophys. Acta, 559, 209—230, 1979.
19. Folch-Pi J. In: Proteins of Nervous System (ed. by G. J. Schneider), p. 45—66, N. Y., Raven Press, 1973.
20. Folch J., Lees M., Sloane-Stauley G. H. J. Biol. Chem., 226, 497—509, 1957.
21. Less H. H., Lewin E. J. Neurochem., 12, 205—211, 1965.
22. Lees M. B., Paxlan S. Analyt. Biochem., 47, 184—192, 1972.
23. Folch J., Webster G. R., Lees M. Federat. Proc. 18, part 1, 223, 1959.
24. Манукян К. Г., Киракосян Л. Г., Левонян К. Л. Вопросы биохимии мозга, 7, 140—149, Изд-во АН АрмССР, 1972.
25. Манукян К. Г. Вопросы биохимии мозга, 13, 86—106, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1979.
26. Смирнов А. А., Чирковская Е. В., Манукян К. Г. Биохимия, 26, 1027—1033, 1961.
27. Манукян К. Г., Бунятян Г. Х. Вопросы биохимии мозга, 9, 87—108, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1974.
28. Svennerholm L. J. Neurochem., 1, 42, 1956.
29. Прохорова М. И., Тушикова З. Н. Большой практикум по углеводному и липидному обмену, Л., Изд-во ЛГУ, 1965.
30. Lovren J. A. The Chemistry of Lipids of Biochemical Significance L., Methuen and CO Ltd; N. J., J. Wiley and Sons, 1957.
31. Pritchard E. G., Folch-Pi J. Biochim. Biophys. Acta, 70, 481—483, 1963.
32. Folch-Pi J. Federat. Proc., 23, part 1, 630—633, 1964.
33. Манукян К. Г., Киракосян Л. Г. Вопросы биохимии мозга, 6, 183—202, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1970.
34. Манукян К. Г., Киракосян Л. Г., Левонян К. Л., Степанян А. А. Вопросы биохимии мозга, 11, 116—128, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1976.
35. Левонян К. Л., Манукян К. Г. Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животного и человека, III Всесоюзн. симп., с. 123—124 Л., Наука, 1978.
36. Tenenbaum D., Folch-Pi J. Biochim. Biophys. Acta, 115, 141—147, 1966.
37. Braun P. E., Radin N. S. Biochemistry, 8, 4310—4318, 1969.
38. Lundin Y., Demel R. A., Geurts van Kessel W. S. M., Zahler P., Van Deenen L. L. M. Biochim. Biophys. Acta, 332, 69—81, 1974.
39. Boggs J. M., Wood D. D., Moscarello M. A., Parouhadjopoulos D., Biochemistry, 15, 2325—2329, 1977.
40. Draper M., Lees M. B., Chan D. S. J. Neurochem., 31, 1095—1099, 1978.
41. Whiteheart D. R., Lees M. B. J. Neurochem., 20, 1303—1315, 1973.
42. Казарян Т. И., Манукян К. Г. Биол. ж. Армении, 34, 502—505, 1981.
43. Манукян К. Г., Степанян А. А., Арутюнян Д. Л., Киракосян Л. Г. Биол. ж. Армении, 34, 878—880, 1981.
44. Lunt G. G., Canessa O. M., De Robertis E. Nature, New Biol., 239, 14, 187—190, 1971.
45. Баджиян С. А., Манукян К. Г. ДАН СССР, 250, 1262—1265, 1980.
46. Баджиян С. А., Манукян К. Г. Биофизика, в печати.
47. Гюльханджян М. З., Манукян К. Г. Биофизика, 27, 258—262, 1982.

48. *Curatolo W., Sakura J. D., Small D. M., Shipley G. G.* Biochemistry, 16, 2313—2319, 1977.
49. *Papahadjopoulos D., Vatt W. J., Moscarello M. A. J.* Membr. Biol., 22, 143—164, 1975.
50. *Adragna N. C., Salas P. J. I., Parisi M., De Robertis E.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 62, 110—117, 1975.
51. *Sears B., Curatolo W., Janiak M. J., Tall A., Sakura J. D., Shipley G. G., Small D. M., Neuringer L.* J. Biophys. J., 21, 213a, 1978.

Институт биохимии
АН Армянской ССР, Ереван

Поступила 15. XII 1981