

УДК 612.82:577.95:577.112:577:335

ИЗМЕНЕНИЕ ФОСФОЛИПИДНОГО СОСТАВА
ПРОТЕОЛИПИДОВ МИЕЛИНА МОЗГА КРЫСЫ В ХОДЕ
МИЕЛИНОГЕНЕЗА

СТЕПАНЯН А. А., МАНУКЯН К. Г.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятыана НАН Армении, Ереван

Показано, что концентрация неочищенных и очищенных протеолипидов (ПЛ) и связанных с ними свободных фосфолипидов (ФЛ) — (РХ25 в мг/г) влажной массы мозга в миелине мозга крысы постепенно повышается с возрастом. Уже на ранних стадиях образования миелина (10-дневные крысы) в составе его ПЛ имеются все те ФЛ, которые обнаруживаются в миелине мозга взрослых животных. Однако фосфолипидный состав ПЛ миелина претерпевает определенные изменения в ходе миелиногенеза. По мере развития в неочищенных и особенно очищенных ПЛ миелина уменьшается содержание нейтральных ФЛ, главным образом фосфатидилхолина, и резко возрастает содержание кислых ФЛ, особенно фосфатидилсерина. Одновременно увеличивается процент кислых ФЛ — фосфатидилсерина, дифосфатидилглицерина и фосфатидилинозита, более прочно связанных с белком ПЛ. Эти сдвиги имеют место в основном в период наиболее активного накопления миелина — между 17-ым и 30-ым днями после рождения и связаны, по-видимому, с изменением белкового состава миелиновых ПЛ. Известно, что в это время в миелине, наряду с белком ДМ-20, преобладающим на ранних стадиях развития резко возрастает содержание главного белка ПЛ.

ПЛ представляют довольно широко распространенную группу типично внутренних, гидрофобных мембранных белков, связанных с липидами и объединенных на основе специфической растворимости в органических растворителях [1, 2]. Они являются необходимыми компонентами мембран животных, растительных и микробных клеток [2—4]. ПЛ особенно богата 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 [2, 5—7]. Полагают, что эти белки и связанные с ними липиды принимают активное участие в формировании и поддержании уникальной мультиламеллярной структуры миелина [2, 8, 9]. Одновременно миелиновый ПЛ, благодаря своей конформационной гибкости и способности агрегировать, может модулировать жидкость липидного окружения в мембране и таким образом влиять на активность ферментов миелиновой оболочки [2]. Накапливается все больше фактов, свидетельствующих о важной роли ПЛ в развитии патологических процессов в НС, в этиологии и патогенезе демиелинизирующих заболеваний генетического, аллергического и вирусного происхо-

ждения [9, 10]. Показано, что одной из основных причин возникновения наследственных демиелинизирующих заболеваний является нарушение биосинтеза апотротенина ПЛ миелина, либо его встраивания в миелиновую мембрану [11, 12]. В последние годы уделяется большое внимание вопросам, связанным с синтезом миелиновых ПЛ, их посттрансляционной модификацией, доставкой и встраиванием в миелиновую мембрану [13]. Показано, что миелиновые ПЛ синтезируются на шероховатом эндоплазматическом ретикулуме и без или посттрансляционной модификации транспортируются к миелиновому комплексу, проходя транзитом через девять промежуточных мембранных пулов [14].

В связи с вышесказанным представляет интерес изучение формирования протеолипидных комплексов миелина в ходе онтогенеза. Имеющиеся в литературе по этому вопросу данные касаются только белкового компонента ПЛ, липидный компонент не изучали. Между тем, как отмечалось, связанные с белком ПЛ липиды играют, по-видимому, важную роль в процессе формирования миелина и поддержания его структуры. Поскольку, как было показано ранее [15], с ПЛ белого вещества и миелина, как и других субклеточных образований мозга, связаны в основном ФЛ, задачей настоящего исследования явилось изучить фосфолипидный состав ПЛ, выделенных в виде очищенных в разной степени от липидов липидно-белковых комплексов из миелина мозга крыс разного возраста.

Сроки исследований были выбраны в соответствии с данными литературы о ходе миелинизации в мозгу крысы.

Материалы и методы

Исследования проводили на 10-, 13-, 15-, 17-, 20- и 30-дневных белых крысах. Животных декапитировали и извлекали головной мозг. Миелин изолировали методом [16]. Липидные экстракты, содержащие ПЛ, получали и отмывали по методу [17]. ПЛ выделяли из промытых липидных экстрактов миелина методом эмульгирования—центрифугирования [18] с той разницей, что опускали последнее центрифугирование при 200g. Лиофилизированные осадки полученных этим методом неочищенных протеолипидов (НПЛ) промывали для удаления менее прочно связанных липидов 2 раза 600-кратным объемом смеси спирт-эфир (1:1) при -6° . Применяли абсолютный спирт и обезвоженный эфир. Полученные в результате ПЛ обозначали как «очищенные» протеолипиды (ОПЛ). Расщепление связей между липидами и белками, экстракцию и отмывку липидного компонента, хроматографическое разделение ФЛ производили методами, описанными ранее [18, 19].

Результаты и обсуждение

Концентрация НПЛ и ОПЛ и связанных с ними общих ФЛ ($P \times 25$) в мг/г влажной массы мозга постепенно повышалась в миели-

не мозга крысы в процессе развития, особенно начиная с 17 дня после рождения (табл. 1). Однако процентное содержание ФЛ в НПЛ и полученных после их промывания ОПЛ поддерживалось на довольно постоянном уровне на протяжении всего изученного периода миелиногенеза.

Таблица 1

Содержание НПЛ и ОПЛ и связанных с ними общих ФЛ в миелине мозга крыс разного возраста

Возраст (дни)	Н П Л			О П Л		
	мг г вл. массы	фосфолипиды		мг г вл. массы	фосфолипиды	
		мг г вл. массы	% от массы НПЛ		мг г вл. массы	% от массы ОПЛ
10 (1)*	0,197	0,064	32,69	0,080	0,011	13,72
13 (2)	0,172	0,054	31,63	0,075	0,007	9,63
15 (2)	0,252	0,062	24,80	0,058	0,008	14,70
17 (1)	0,493	0,179	36,02	0,172	0,033	19,48
20 (2)	0,351	0,131	37,30	0,245	0,035	14,47
30 (3)	1,589	0,472	29,72	0,551	0,076	13,81

* Число опытов

При исследовании фосфолипидного состава ПЛ оказалось, что на хроматограммах спирт-эфирных отмывов НПЛ и липидных экстрактов ОПЛ, изолированных из миеллина мозга 10-дневных крыс, выявлялись те же пятна ФЛ, что и у взрослых животных. Однако в ходе постнатального развития состав ФЛ, связанных с НПЛ и ОПЛ, подвергался определенным изменениям.

В табл. 2, 3 содержание каждого ФЛ, связанного с ПЛ, представлено в процентах от общей суммы связанных с ними ФЛ.

Исследования показали, что на всех изученных стадиях развития преобладающими ФЛ НПЛ миеллина являются нейтральные ФЛ и, главным образом, фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилэтаноламин (ФЭА) (табл. 2). Содержание первого в НПЛ в процессе развития несколько снижалось (в 1,3 раза), а второго, наоборот, возрастало. По мере развития в ФЛ НПЛ миеллина уменьшалось также содержание фосфатидилинозита (ФИ) (в 1,9 раза) и повышалось содержание фосфатидилсерина (ФС) (в 1,54 раза) и особенно фосфатидной кислоты (в 4,0 раза) и сфингомиелина (СФМ) (в 2,52 раза). Основные сдвиги в концентрации большинства ФЛ приходились на период начиная с 17 до 30 дня после рождения, только содержание СФМ повышалось раньше.

В табл. 3. представлен фосфолипидный состав ОПЛ, полученных после промывания НПЛ спирт-эфирной смесью. Из табл. видно, что «очистка» ПЛ из мозга крыс разного возраста приводила к концентрации кислых ФЛ, доля которых в общих ФЛ, связанных с ОПЛ, была значительно выше, чем в НПЛ, уже на ранних стадиях разви-

Таблица 2

Содержание отдельных ФЛ, связанных с НПЛ миелина из мозга крыс разного возраста (в % от суммы ФЛ)

Фосфолипиды	Возраст (дни)					
	10 (1)*	13 (2)	15 (2)	17 (1)	20 (2)	30 (3)
1. Линия старта	4,89	2,71	4,56	2,16	3,97	2,81
2. Лизолецитин	3,96	—	—	—	—	—
3. ФЛ, сорбированные на сульфатиде	4,89	3,08	3,84	2,06	3,51	1,32
4. Фосфатидилинозит	6,56	6,16	5,00	4,91	5,59	3,45
5. Сфингомиелин	4,08	4,50	7,56	9,28	9,38	10,27
6. Фосфатидилхолин	46,47	51,98	48,08	44,37	38,40	40,16
7. Фосфатидилсерин	8,27	10,01	10,68	7,81	13,08	13,00
8. Фосфатидилэтаноламин	20,89	17,60	18,04	28,45	26,03	24,10
9. Дифосфатидилглицерин	—	3,31	2,52	0,28	—	2,35
10. Фосфатидная кислота	—	0,64	0,52	0,61	—	2,54
Кислые ФЛ (3+4+7+9+10)	23,68	23,20	21,76	16,14	22,18	22,66
Нейтральные (5+6+8)	71,43	74,06	73,69	82,20	73,85	74,53
Сумма ФЛ (мкг Рг влажной массы)	2,58	2,12	2,50	7,18	5,24	18,89

* Число опытов

Таблица 3

Содержание отдельных ФЛ, связанных с ОПЛ миелина из мозга крыс разного возраста (в % от суммы ФЛ)

Фосфолипиды	Возраст (дни)					
	10 (1)*	13 (2)	15 (2)	17 (1)	20 (2)	30 (3)
1. Линия старта	4,33	5,51	5,57	1,19	3,17	5,16
2. Лизолецитин	—	—	—	—	—	—
3. ФЛ, сорбированные на сульфатиде	12,30	6,57	8,80	6,65	7,62	5,03
4. Фосфатидилинозит	14,58	12,46	16,12	17,76	12,34	12,26
5. Сфингомиелин	2,96	5,54	—	1,12	7,19	—
6. Фосфатидилхолин	29,84	28,03	24,93	25,75	17,28	8,71
7. Фосфатидилсерин	15,04	26,65	30,50	33,28	43,37	50,90
8. Фосфатидилэтаноламин	20,96	10,38	7,92	9,55	9,03	4,50
9. Дифосфатидилглицерин	—	4,84	5,87	1,42	—	10,61
10. Фосфатидная кислота	—	—	—	3,28	—	2,83
Кислые ФЛ (3+4+7+9+10)	41,92	50,52	61,29	62,39	63,33	81,63
Нейтральные ФЛ (5+6+8)	53,76	43,95	32,85	36,42	33,50	13,21
Сумма ФЛ (мкг Рг влажной массы)	0,44	0,29	0,34	1,34	1,42	3,04

* Число опытов

тия и повышалась с возрастом. Преобладающими ФЛ ОПЛ миелина мозга 10-дневных крыс являлись ФХ, составляющие 30% от суммы всех связанных ФЛ, затем ФЭА — 21%, ФС и ФИ — около 15%. Содержание нейтральных ФЛ: ФХ и ФЭА в ФЛ ОПЛ резко снижалось

по мере развития (в 3,5 и более раз), концентрация же кислых ФЛ главным образом ФС, наоборот, резко возрастала (в 3,3 раза), причем основные изменения приходились на вторую декаду постнатальной жизни, когда начинался и активно протекал процесс миелинизации. С возрастом в ФЛ, связанных с ПЛ, повышалось также содержание дифосфатидилглицерина (ДФГ) — почти в 2,0 раза. Однако содержание другого важного кислого ФЛ — ФИ не изменялось или даже несколько понижалось после 17-дневного возраста (табл. 3).

Соотношение кислые—нейтральные ФЛ в ОПЛ заметно повышалось в ходе развития, тогда как в НПЛ оно почти не претерпевало изменений. У 10-дневных крыс кислые и нейтральные ФЛ составляли 23,7% и 71,4% соответственно от суммы всех ФЛ, связанных с НПЛ и 41,9% и 53,8% соответственно от суммы ФЛ, связанных с ОПЛ. У 30-дневных крыс на долю кислых ФЛ приходилось 82% от суммы всех связанных с ОПЛ ФЛ, а нейтральных—всего 13% (табл. 3).

С возрастом изменялась также прочность связывания ФЛ с белком ПЛ. Мы обозначили как «менее прочно» связанный—ту часть каждого ФЛ, которая экстрагировалась из НПЛ при промывании спирт-эфирной смесью, и как «более прочно» связанный ФЛ—вторую часть, которая оставалась в составе ОПЛ после промывания. Исследования показали, что по мере развития повышается процент кислых ФЛ, более прочно связанных с белком ПЛ. У 10—13-дневных крыс промывание спирт-эфирной смесью приводило к удалению 64—71% всех связанных с ПЛ кислых ФЛ, тогда как у 17—20-дневных крыс в тех же условиях удалялось всего 23—28% кислых ФЛ, а остальные 70% и более оставались в составе ОПЛ (рис. 1). Наибольшие изменения претерпевала прочность связывания с белком ПЛ ФС и ДФГ и, в несколько меньшей степени, ФИ. Этот сдвиг имел место в основном на 17—20 дни после рождения. У 10-дневных крыс с белком ПЛ было связано 31% всего ФС, а у 20-дневных—90% (рис. 2). Сходные данные были получены нами ранее для ПЛ целого мозга крысы [20].

Найденные изменения связаны, по-видимому, с одной стороны, с временем и местом синтеза отдельных ФЛ в мозгу в ходе миелинизации и их комбинации с белком ПЛ. С другой — с изменениями в структуре или составе самих ПЛ, способствующими более прочному связыванию кислых ФЛ с белком ПЛ. Последнее предположение подтверждается данными литературы, согласно которым белковый состав ПЛ миелина претерпевает существенные сдвиги в ходе миелинизации [21]. Известно, что в состав миелина входят в основном два белка протеолипидной природы: белок ПЛ (M_r 30 кД) и белок ДМ—20 (M_r 25 кД). Последний является изоформой белка ПЛ и отличается от него генетически обусловленным выпадением определенной внутренней аминокислотной последовательности. Отсутствующий у белка ДМ—20 фрагмент, состоящий из 35 аминокислот (116—150), соответствует главному гидрофильному домену белка ПЛ, содержащему пять положительно и два отрицательно заряженных аминокислотных

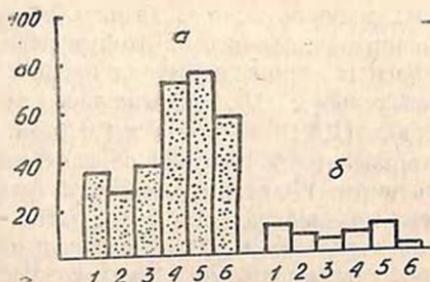


Рис. 1. Изменение содержания более прочно связанной с белком ПЛ миелина части кислых (а) и нейтральных (б) ФЛ в ходе миелиногенеза (в% от всех связанных с ПЛ ФЛ данной группы). 1—10-дневные; 2—13-дневные; 3—15-дневные; 4—17-дневные; 5—20-дневные; 6—30-дневные крысы.

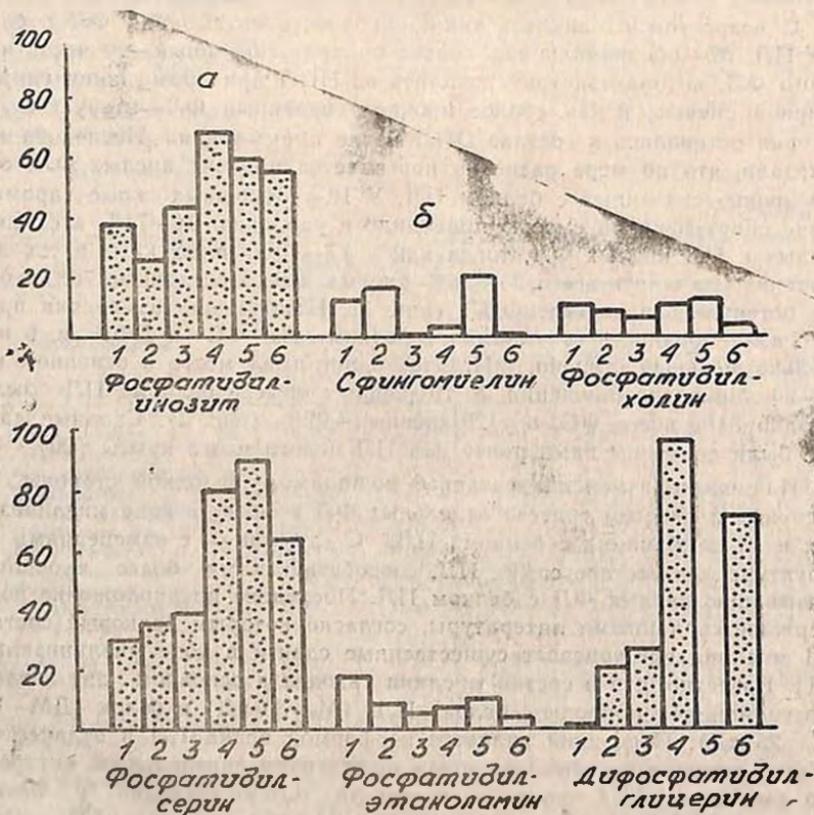


Рис. 2. Изменение содержания более прочно связанной с белком ПЛ миелина части отдельных ФЛ в ходе миелиногенеза (в% от всего связанного с ПЛ ФЛ). 1—10-дневные; 2—13-дневные; 3—15-дневные; 4—17-дневные; 5—20-дневные; 6—30-дневные крысы. а—кислые ФЛ; б—нейтральные ФЛ

остатка [22, 23]. Исследования с применением различных физико-химических методов (ЭСР, флуоресцентный анализ) показали, что хотя оба протеолипидных белка взаимодействуют с ФЛ, только ПЛ обнаруживает строгую специфичность в отношении кислых ФЛ и особенно ФС. Белок ДМ—20, который более гидрофобен, не выявляет такой специфичности и связывается почти одинаково и с кислыми и нейтральными ФЛ [24, 25]. В настоящее время показано, что в развивающемся мозгу белок ДМ—20 появляется значительно раньше, чем белок ПЛ. В начале миелинизации мозг содержит в основном белок ДМ—20, а белок ПЛ нарастает по мере образования миелина, становясь преобладающим у взрослых животных, у которых его содержание в 1,5—1,7 раз выше, чем белка ДМ—20 [21].

Результаты наших исследований относительно изменения фосфолипидного компонента ПЛ в ходе миелиногенеза хорошо коррелируют с этими данными. На ранних стадиях развития (10—15-дневные крысы) ПЛ миелина содержат наряду с кислыми значительные количества нейтральных ФЛ, что можно объяснить преобладанием в этом периоде белка ДМ—20. Увеличение в дальнейшем содержания кислых ФЛ, особенно ФС, в ОПЛ и прочности их связывания с белком можно объяснить накоплением белка ПЛ в период активной миелинизации. Поскольку ПЛ расположены на наружной стороне миелиновой мембраны, а фрагмент 116—150, как полагают, выступает из липидного бислоя, он может через свои положительно заряженные аминокислотные остатки взаимодействовать с отрицательно заряженными липидами противоположного бислоя миелина и этим способствовать формированию компактной мультимембранной структуры миелина в ходе миелиногенеза.

Таким образом, обнаруженное нами изменение фосфолипидного состава ПЛ миелина, увеличение количества кислых липидов, более прочно связанных с белком ПЛ, может служить показателем формирования более компактного, упорядоченного миелина в ходе развития.

CHANGES IN COMPOSITION OF PHOSPHOLIPID MOIETY OF RAT BRAIN MYELIN PROTEOLIPIDS DURING MYELINOGENESIS

STEPANIAN A. A., MANUKIAN K. H.

H. Kh. Buntatian Institute of Biochemistry, Natl. Acad. Sci.
of Rep. Armenia, Yerevan

It has been shown that the concentration of crude and purified proteolipids (PL) and the total phospholipids (PhL)— $P \times 25$ bound to them increased gradually in rat brain myelin during development. Already at early stages of myelin formation (10-day-old rat) almost all those PhL were found in the composition of phospholipid moiety of PL that were associated with PL in mature brain. But the composition of phospholipid moiety of PL underwent certain changes during myelinoge-

nesis. The contents of neutral PhL, mainly phosphatidylcholine, in crude and especially purified PL of myelin decreased, and the contents of acidic PhL, mainly phosphatidyl serine sharply increased. At the same time noticeably increased the percentage of acidic PhL (phosphatidyl serine, diphosphatidyl glycerol, phosphatidyl inositol) that were more tightly bound to the PL protein. These changes took place chiefly at the period of the most active myelin deposition (17--30 days after birth) and were probably connected with shifts in the composition of protein moiety of PL. It is known that at that time in myelin PL parallel by the protein DM-20, which prevailed at the early stages of myelin formation, sharply the content of the major PL protein increased.

ЛИТЕРАТУРА

1. Folch-Pi J., Lees M. J. *Biol. Chem.*, v. 191, p. 807-817, 1951.
2. Lees M. B., Sakura D. J., Sapirstein V. S., Curatolo W. *Biochim. et biophys. acta*, v. 559, № 2-3, p. 203-230, 1979.
3. Folch-Pi J., Stoffyn P. J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 195, p. 86-107, 1972.
4. Schlesinger M. J. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 50, p. 193-206, 1981.
5. Mehl E., Halaris A. J. *Neurochem.*, v. 17, p. 659-668, 1970.
6. Манукян К. Г., Киракосян Л. Г., Левонян К. Л., Степанян А. А. В сб.: Вопросы биохимии мозга (под ред. Г. Х. Бунятыяна), т. II, с. 116-128, изд-во АН АрмССР, Ереван, 1976.
7. Lees M. B., Macklin W. B. — In: *Neuronal and glial proteins: structure, function and clinical application* (eds. Marangos P. J., Campbell I. C., Cohen R. M.) p. 267-294, Academic Press, San Diego, 1988.
8. Stoffel W., Hillen H., Schroeder W., Deutzmann R., Hoppe-Seyler Z. *Physiol. Chem.*, v. 364, p. 145-146, 1983.
9. Yoshimura T., Kunishita T., Sakai K., Endoh M., Nam'kaw T., Tabira T. *J. Neurol. Sci.*, v. 69, № 1, p. 45-58, 1985.
10. Hafler D. A., Benjamin D. S., Borks J., Weiner H. L. *Immunol.*, v. 139, № 1, p. 68-72, 1987.
11. Campagnoni A. T., Sorg B. J. A., Agrawal D., Agrawal H. C. *J. Neurochem.*, v. 44, suppl., S 23A, 1985.
12. Simons R., Riordan J. J. *Neurochem.*, v. 54, p. 1079-1081, 1990.
13. Bizzozero O. A., Soto E. F., Pasquini J. M. *Neurochem. Int.*, v. 6, p. 659-664, 1984.
14. Konat G., Disakaran P., Samoraiski T., Wiggins R. C. *J. Neurochem.*, v. 44, p. 1500-1510, 1985.
15. Манукян К. Г. *Нейрохимия*, т. I, с. 51-65, 1982.
16. Waehneidt T. V., Matthieu J. M., Neuhoff V. *Brain Res.*, v. 138, p. 29-43, 1977.
17. Folch-Pi J., Lees M., Sloane-Stanley C. H. *J. Biol. Chem.*, v. 226, p. 497-503, 1957.
18. Манукян К. Г., Киракосян Л. Г., Левонян К. Л. — В сб.: *Вопр. биохимии мозга* (под ред. Г. Х. Бунятыяна), т. 7, с. 140-149. Изд-во АН АрмССР, Ереван, 1972.
19. Смирнов А. А., Чирковская Е. В., Манукян К. Г. *Биохимия*, т. 26, с. 1027-1033, 1961.
20. Manukian K. H., Kirakosian L. G. *Neurochem. Res.*, v. 10, p. 1533-1545, 1985.
21. Schindler P., Luu B., Sorokine O., Trifiliev E., Van Dorsselaer A. J. *Neurochem.*, v. 55, p. 2079-2085, 1990.

22. Trifilieff E., Skalidis G., Helynk G., Lepage P., Sorokine O., Dorselaer A., Luu B. C. R. Acad. Sci., Paris, v. 300, S 111, № 7, p. 241—246, 1985.
23. Nave K. A., Lai C., Bloom F. E., Milner R. J. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, v. 84, p. 5665—5669, 1987.
24. Houbre D., Schindler P., Trifilieff E., Luu B., Duportail G. Blochim. et biophys. Acta, v. 1029, № 1, p. 136—142, 1990.
25. Horvath L. I., Brophy P. J., Marsh D. Biochemistry, v. 29, p. 2635—2638, 1990.

Поступила 7. VI. 1992