



УДК 577.355

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН МОЗГА ЖИВОТНЫХ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

АДАМЧИК Е. И., МИЛЮТИН А. А.

Институт радиобиологии АН БССР, Минск

Установлено, что в синаптических мембранах головного мозга при старении понижается микровязкость поверхностных и глубинных зон липидного бислоя, оцениваемая по подвижности спин-меченых жирных кислот. Уменьшается общее количество SH-групп мембранных белков без достоверного изменения соотношения между числом поверхностных и скрытых тиолов. С помощью спиновой метки на SH-группы показано, что у старых животных в синаптических мембранах увеличивается доля сильноимобилизованных тиолов, изменяется их подвижность, а также наблюдается значительное усиление влияния β -агониста изопротеренола на внутримолекулярную подвижность белков. При неизменной базальной активности аденилатциклазы степень активации фермента изопротеренолом выше у старых крыс по сравнению со зрелыми. Эти данные интерпретируются как изменение конформации или взаимориентации белков в мембранах. На основании анализа фосфолипидного и жирнокислотного состава сделано предположение, что накопление лизоформ фосфолипидов является одной из основных причин возрастной структурной реорганизации синаптических мембран.

В настоящее время не вызывает сомнений, что ЦНС играет ключевую роль в процессах старения организма. Анатомо-морфологические исследования свидетельствуют о возрастном нарушении нейронов [1], изменении фосфолипидного и жирнокислотного состава целого мозга [2], модификации активности ряда ферментов [3]. Хорошо изучены и электрофизиологические характеристики нервной ткани [4]. Оставалось неясным, изменяется ли с возрастом молекулярная организация и функциональная активность синапсов и изолированных синаптических мембран, играющих ведущую роль в межнейронных коммуникациях в ЦНС. Исходя из вышесказанного, а также из представлений о роли биологических мембран как кооперативных систем, способных к локальным и генерализованным структурным перестройкам в регуляции физиологической активности клеток, для понимания молекулярных механизмов возрастных изменений функций мозга представлялось перспективным сопоставить структурную организацию синаптических мембран у животных разного возраста, а именно: изучить физические свойства (микровязкость) липидного бислоя, физико-химические характеристики основного пула мембранных белков,

фосфолипидный и жирнокислотный состав синаптических мембран зрелых и старых животных.

Материалы и методы

Опыты проводили на крысах-самцах линии *Wistar* стадного разведения двух возрастных групп (6—12 месяцев—зрелые и 24—26 месяцев—старые животные), содержащихся на общем рационе вивария.

Синаптические мембраны выделяли по методу Jones, Malus [5], липиды экстрагировали по методу Folch и соавт. [6]. В работе использовали следующие химико-аналитические методы: ТСХ липидов [7], гель-электрофорез мембранных белков в ДДС-Na [8], газохроматографическое определение жирнокислотного состава липидов с помощью газового хроматографа «Varian-Aerograph» (США) на колонках, заполненных хроматоном N-AWDMCS с 10%-ным полиэтиленгликольсукцинатом [9], спектрофотометрическое измерение содержания гидроперекисей липидов [10] и ТБК-активных продуктов [11].

Активность мембраносвязанной аденилатциклазы определяли при 30° в среде конечного объема 50 мкл [13], выход сАМР контролировали с помощью известного количества [^3H] сАМР [14].

Титрование сульфгидрильных групп проводили спектрофотометрически с помощью проникающего SH-реagenta 5,5-дитиобис (2-нитробензойной) кислоты (ДТНБ) [15]. Для выявления SH-групп, недоступных для ДТНБ (скрытые тиолы), мембраны солибилизировались 1%-ным ДДС-Na. Концентрацию белка определяли по методу Lowry и соавт. [12].

Микровязкость липидного компонента мембран оценивали по значениям параметра упорядоченности S [16] и по отношению высокополюсового пика к центральному [17] спектров ЭПР жирнокислотных спиновых зондов—доксилпроизводных кетостеариновой и пальмитиновой кислот. Микровязкость поверхностных зон липидного бислоя исследовали с помощью 5-доксилстеарита (5-ДС) и 6-доксилпальмитата (6-ДП). Глубинную зону бислоя «зондировали» 16-доксилстеаратом (16-ДС).

В качестве спиновой метки, ковалентно связывающейся с SH-группами мембранных белков, использовали нитроксильный радикал 4-бром-меркур-3-(4-нитрозопиперазинометил)-2,2,6,6-тетраметил- Δ^4 -дегидропиперидин-1-оксид (метка R_2), синтезированный в ИХФ АН СССР [18]. Метку R_2 растворяли в диметилсульфоксиде до концентрации 10^{-3} М и добавляли к мембранной суспензии при мягком непрерывном перемешивании при комнатной температуре. Конечная концентрация метки в пробе ($2 \cdot 10^{-5}$ М) на порядок превышала концентрацию SH-групп, а диметилсульфоксида—не превышала 2% (объем). Мембраны инкубировали с меткой 6 ч при 0° и отмывали от несвязанной метки двукратным центрифугированием по 10 мин при 6000 g. Для характеристики физического состояния мембранных белков при использовании спиновой метки R_2 рассматривали отношение W/S спектральных амплитуд низкополюсовой части спектра (рис. 1), где S —линия спектра, возникающая от сигнала относи-

тельно заторможенных спинных меток, W—линия спектра, обусловленная метками с относительно более высокой степенью подвижности [19].

В качестве эмпирической меры подвижности радикала использовался параметр $\mu = (1 - A_{\max}/A^{\circ}_{\max})$ [18],

где $A_{\max}$ —расстояние между внешними экстремумами спектра, $A^{\circ}_{\max}$ —значение $A_{\max}$ в предельном случае отсутствия вращения метки (при 77° К). Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре E-104 фирмы «Varian» (США), контролируя температуру с точностью $\pm 0,2^{\circ}$ при помощи термодары, помещенной в образец.

Результаты и обсуждение

Для сравнительной характеристики микровязкости липидного бислоя синаптических мембран мы использовали спин-меченые жирные кислоты. Спектры регистрировали при 25°.

Анализ отношения амплитуд высокополевого пика к центральному показал, что его величины для 16-ДС значительно выше, чем для 5-ДС и составляют соответственно для зрелых животных— $0,4 \pm 0,02$ и $0,023 \pm 0,005$, а для старых— $0,57 \pm 0,03$ и $0,0345 \pm 0,003$. Вместе с тем, подвижность обоих зондов выше в мембранах старых крыс, что указывает на значительную лабильзацию липид-липидных и липид-белковых взаимодействий по всей глубине бислоя и уменьшение микровязкости.

При сопоставлении физических свойств липидного бислоя в широком диапазоне температур от 10 до 39° с помощью зонда 6-ДП, оказалось, что при всех температурах, ниже физиологической, для мембран старых животных вращательная подвижность жирнокислотных остатков, оцениваемая по параметру упорядоченности больше, чем для молодых [20]. Эти данные, как и результаты, полученные при включении в мембраны 5-ДС и 16-ДС, могут свидетельствовать о разжижении и дестабилизации липидного бислоя синаптических мембран с возрастом.

При анализе состояния основного белкового фонда синаптических мембран в качестве конформационно-чувствительных тестов вначале использовали доступность SH-групп мембранных белков к непроницающему SH-реагенту ДТНБ. Известно, что при конформационных переходах белка часто наблюдается изменение соотношения между числом поверхностных и скрытых тиолов [15].

В наших опытах для выявления SH-групп, недоступных для ДТНБ (скрытые тиолы), мембраны солиubilizировались 1%-ным ДДС-Na. Сравнительный анализ соотношения между поверхностными и скрытыми SH-группами показал, что величина этого соотношения мало изменяется при старении, в то время как общее количество тиолов значительно снижается (с $6,30 \pm 0,01$ до $4,30 \pm 0,04$ моль на 10^5 г белка). Это согласуется с более ранними сообщениями об уменьшении содержания тиолов и увеличении количества дисульфидных связей в гомогенатах различных тканей при старении [21].

Подобного рода эффект может быть следствием повышенной доступ-

ности SH-групп к кислороду в структурно-дестабилизированных мембранах вследствие накопления в мембранах агентов, окисляющих SH-группы или снижением активности ферментов типа тиолредуктаз, поддерживающих тиоловые группы в восстановленном состоянии.

Как будет показано дальше, при старении не происходит активации процессов перекисного окисления липидов, что делает маловероятным накопление окислителей SH-групп с возрастом. В то же время установлено, что в разных областях головного мозга крыс при старении происходит уменьшение содержания NADPH-зависимой дисульфидредуктазы и сродства фермента к субстрату на фоне падения количества белковых SH-групп, экстрагируемых Тритоном X-100, ДДС-Na и водой [22]. Снижение активности ферментов, восстанавливающих тиолы наряду с фактором структурной дестабилизации и определяет, вероятно, наблюдаемое уменьшение числа сульфгидрильных групп.

Тот факт, что соотношение между числом поверхностных и скрытых SH-групп мембранных белков остается при старении неизменным, не позволяет сделать однозначный вывод о какой-либо модификации основного фонда белков в позднем онтогенезе. В этом отношении гораздо более информативны методы, характеризующие подвижность отдельных функциональных групп, например тиолов, в мембранных белках.

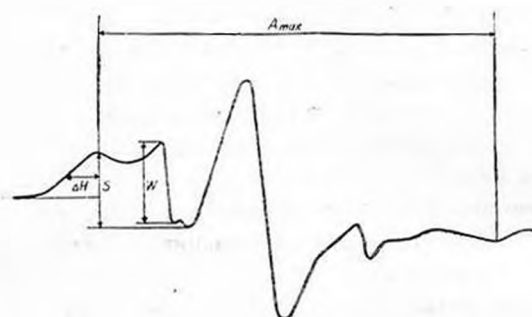


Рис. 1. Спектр ЭПР нитроксильной спиновой метки R_2 в синаптических мембранах. Концентрация зонда $2 \cdot 10^{-5}$ М. Измерения проводили при 25°

Для более строгой оценки конформационного состояния белков синаптических мембран мы использовали нитроксильную спиновую метку R_2 на SH-группы. Благодаря большой гидрофобности, метка R_2 может присоединяться к SH-группам, расположенным как на поверхности мембран, так и в глубине бислоя. Присоединением метки к двум классам SH-групп объясняется усложненная форма ее спектра, который представляет собой суперпозицию по крайней мере двух сигналов (рис. 1): сильно заторможенной метки (с широкими линиями S) и слабо заторможенной (с узкими линиями W). При использовании спиновых меток типа R_2 о физическом состоянии мембранных белков обычно судят по отношению спектральных амплитуд W/S [19]. Как видно из табл. 1, этот показатель выше у зрелых животных, что свидетельствует об относительном росте вклада белков с пониженной подвижностью SH-групп в суммарный спектр ЭПР при старении.

Для количественного определения подвижности этой популяции метки использовалась полуширина пика $S(\Delta H)$. Оказалось, что величина ΔH

меньше у старых животных, чем у зрелых. Иными словами, подвижность сильноиммобилизованной метки в белках нейрональных мембран старых крыс выше, чем в белках мембран зрелых животных (табл. 1). Учитывая результаты тилометрии и данные электрофореза, которые свидетельствуют об отсутствии каардинальных сдвигов в распределении и амплитуде

Таблица 1

Параметры спектров ЭПР метки R_2 , ковалентно связанной с сульфгидрильными группами мембранных белков синаптических мембран мозга крыс ($n=4$)

Возраст	$t, ^\circ\text{C}$	$A_{\text{max}} \text{ (Гс)}$ $\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\Delta H \text{ (Гс)}$ $\bar{x} \pm S\bar{x}$	W/S $\bar{x} \pm S\bar{x}$	μ $\bar{x} \pm S\bar{x}$
6—7 месяцев	—196	$71,3 \pm 0,1$	$6,8 \pm 0,05$		
	22	$66,4 \pm 0,05$	$4,0 \pm 0,05$	$1,39 \pm 0,015$	$2,68 \pm 0,03$
	38	$65,4 \pm 0,05$	$4,4 \pm 0,05$	$3,30 \pm 0,025$	$2,49 \pm 0,025$
24—26 месяцев	—196	$70,8 \pm 0,05$	$6,5 \pm 0,05$		
	22	$66,8 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,05$	$1,18 \pm 0,02$	$2,87 \pm 0,06$
	38	$65,7 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,05$	$2,1 \pm 0,05$	$2,63 \pm 0,045$

пиков отдельных мембранных полипептидов, результаты ЭПР-спектроскопии можно интерпретировать как возрастное изменение конформации и/или взаимоориентации белков в синаптических мембранах при старении. Об этом также свидетельствуют и результаты исследования влияния β -агониста изопротеренола, вызывающего активацию аденилатциклазной системы синаптических мембран, на внутримолекулярную подвижность мембранных белков. В пределах концентраций 10^{-6} — 10^{-4} М изопротеренол вызывает уменьшение отношения W/S у старых животных и практически не изменяет его у зрелых (рис. 2). Полученные результаты свидетельствуют об увеличении доли сильноиммобилизованных SH-групп мембранных белков у старых животных при действии β -адренэагониста.

Таблица 2

Содержание основных классов фосфолипидов синаптических мембран мозга крыс разного возраста

Фосфолипиды	Содержание, $\mu\text{моль}/P_i/\text{мг}$ общих липидов	
	6—7 месяцев	24 месяца
Лизофосфатидилхолин	$12,9 \pm 0,5$ (11)	$25,8 \pm 1,0^*$ (14)
Сфингомиелин	$44,8 \pm 1,3$ (12)	$46,1 \pm 1,1$ (13)
Фосфатидилхолин	$364 \pm 12,0$ (13)	$325 \pm 15,0^{**}$ (14)
Фосфатидилэтаполамин	$196 \pm 8,0$ (13)	$222 \pm 11,0$ (15)
Общие фосфолипиды	$770 \pm 14,0$ (14)	$802 \pm 20,0$ (12)

Примечание. $^*p < 0,01$; $^{**}p < 0,05$. В скобках указано количество опытов.

Такие возрастные изменения в реакции различных пулов белковых SH-групп на взаимодействие изопротеренола с β -адренорецепторами могут в определенной мере объяснить различную степень активации аденилатциклазы синаптических мембран через β -адренорецепторы данным агонистом (на 143% у зрелых крыс, а у старых—на 178%).

Обнаруженные возрастные различия в физических свойствах липидного бислоя и состояния белков мембран могли быть обусловлены изменением их фосфолипидного состава.

Анализ фосфолипидного состава синаптических мембран показал, что при старении достоверно не изменяется содержание сфингомиелина, фосфатидилэтаноламина и общих фосфолипидов. Аналогичная картина отмечалась в отношении фосфатидилинозитола и фосфатидилсерина (данные не приведены). В то же время, как видно из табл. 2, в которой представлены данные по содержанию основных классов фосфолипидов, составляющих 80% от всех фосфолипидов, и вносящих определяющий вклад в

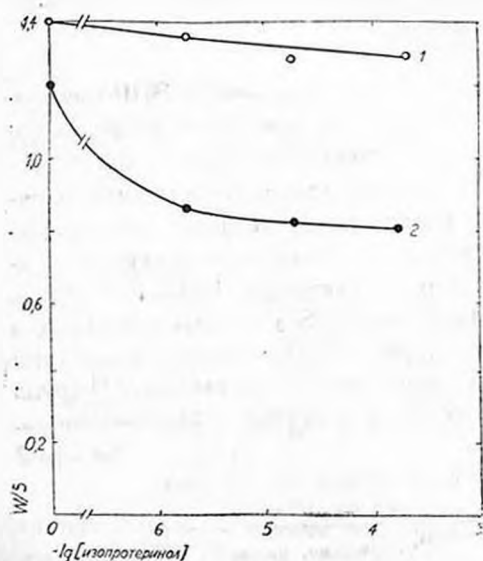


Рис. 2. Соотношение сигналов слабо и сильно заторможенной метки R_2 в синаптических мембранах зрелых (1) и старых (2) крыс в контроле и после инкубации (20 мин при комнатной температуре с изопротеренолом. По оси ординат—отношение спектральных амплитуд

поддержание оптимального физического состояния липидного компонента мембран [23], концентрация фосфатидилхолина снижается примерно на 10%, а содержание лизофосфатидилхолина увеличивается в 2 раза. Аналогичные результаты на синаптических мембранах были получены и другими исследователями [2].

Изменяется и жирнокислотный состав мембранных липидов. С возрастом уменьшается доля ненасыщенных жирных кислот, а отношение ненасыщенных жирных кислот к насыщенным снижается с 1.1 до 0.087.

В качестве причины модификации мембран рассматривали также ПОЛ. С этой целью изучали накопление диеновых конъюгатов как показатель ацилгидропероксидов [10, 11] и индуцируемую экзогенной перекисью водорода и озоком стационарную интенсивность хемилюминесценции [24] как меру интенсивности свободнорадикальных окислительных процессов.

Как показал анализ производной зависимости скорости нарастания хемилюминесценции синаптических мембран от времени озонирования при постоянной скорости подачи озона (10 мкМ в мин), интенсивность хемилюминесценции мембран старых животных значительно ниже, чем у зрелых. Содержание начальных продуктов перекисного окисления—ацилгидроперекисей также ниже у старых крыс по сравнению со зрелыми (табл. 3). Удаление антиоксидантов при обработке мембран спиртом приводит к усилению хемилюминесценции, причем эффект сильнее выражен у зрелых, чем у старых животных (табл. 3). Эти результаты говорят о снижении интенсивности свободнорадикальных реакций и уменьшении содержания биоантиоксидантов в позднем онтогенезе. Таким образом, маловероятно, что в нашем случае структурная реорганизация мембран у старых животных вызвана усилением ПОЛ. Кроме того, активация перекисных процессов на модельных и природных мембранах сопровождается повышением, а не понижением микровязкости [25].

Таблица 3

Содержание ацилгидроперекисей и интенсивность хемилюминесценции синаптических мембран мозга крыс разных возрастных групп

Возраст (месяцы)	Ацилгидро- перекиси, А ₂₃₂ /мг белка	Интенсивность хемилюминесценции в имп. за 15 мин при индукции		
		H ₂ O ₂ (0,1%)	O ₂ интакт- ные	O ₂ после спирто- вой обработки
6—7	0.39	4680	6710	19120 (185%)
24—26	0.08	3500	5350	7310 (37%)

Представленные данные свидетельствуют о том, что при старении в синаптических мембранах крыс наблюдается изменение физических свойств липидного бислоя, а также изменение конформации и/или ориентации мембранных белков. Анализ возможного вклада возрастных изменений липидного состава в наблюдаемую возрастную реорганизацию синаптических мембран позволил предположить, что наиболее вероятным причинным фактором является накопление лизофосфатидилхолина, разжижающий эффект которого продемонстрирован на липосомах из фосфатидилхолина [26].

THE STRUCTURAL ORGANIZATION OF SYNAPTIC MEMBRANES IN THE BRAIN OF RATS OF DIFFERENT AGE

ADAMCHIK E. I., MILYUTIN A. A.

Institute of Radiobiology, Academy of Sciences of the Byelorussian USSR,
Minsk

Aging leads to a decreased microviscosity of the surface or deeper zones of the lipid bilayer in brain synaptic membranes. This was recorded by measuring mobility of the spin-labeled fatty acids. The

total level of SH-groups in membrane proteins decreases with age without any significant change in the proportion between the surface and masked thiols. Experiments with spin labeling of SH-groups have demonstrated that synaptic membranes of old animals contain greater levels of strongly immobilized thiols, their mobility is changed and there is a marked increase in the effect of isoproterenol, a beta-agonist, on the intramolecular mobility of proteins. The basal activity of adenylate cyclase remains unchanged but the extent of its activation by isoproterenol is higher in old rats as compared with mature ones. These data are interpreted in terms of altered conformation or modified mutual orientation of proteins in the membranes. Analysis of the phospholipid and fatty acid composition leads to a hypothesis that the accumulation of lysophospholipids in the membranes is a major factor responsible for their age-related structural modification.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вербицкая Л. Б., Боголспов Н. Н. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 84, № 7, с. 987—993, 1984.
2. Sun A., Sun J. Interdiscipl. Topics Geront., v. 15, № 1, p. 34—53, 1979.
3. Канунго М. Биохимия старения. М., Мир, 1982.
4. Фролькис В. В. Старение. Нейрогуморальные механизмы. Киев, Наукова думка, 1981.
5. Jones D. H., Matus A. J. Biochim. et biophys. acta, v. 356, № 3, p. 276—287, 1974.
6. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. J. Biol. Chem., v. 177, № 6, p. 751—766, 1957.
7. Кейтс М. Техника липидологии. М., Мир, с. 24—25, 1975.
8. Rutteri M. Comp. Bioch. Physiol., v. 42, № 4, p. 543—546, 1972.
9. Берчфилд Э., Старс Г. Газовая хроматография в биохимии. М., Мир, 1964.
10. Гаврилов В. Б., Мишкорудная М. И. Лаб. дело, № 3, с. 33—35, 1983.
11. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., Наука, 1972.
12. Lowry O. H., Rosebrough N., Farr A., Randall R. J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 255—275, 1951.
13. Salomon Y., Londos C., Rodbell M. Anal. Biochem., v. 58, № 5, p. 541—548, 1974.
14. Ткачук В. А., Балденкес Г. Н. Биохимия, т. 43, № 6, с. 1097—1110, 1978.
15. Ando G., Steiner M. Biochim. et Biophys. acta, v. 311, № 1, p. 26—37, 1973.
16. Caffney B. J. Spin labelling: theory and application. New York, p. 567—571, 1976.
17. Кольтовер В. К. Спинные метки изонды в исследованиях модельных и биологических мембран. Итоги науки и техники. сер. Биофизика, т. 11, с. 10—100, 1979.
18. Гольдфельд М. Г., Кольтовер В. К., Майор П. С., Микоян В. Д., Дмитриев П. И., Шапиро А. Б. Мол. биол., т. 20, № 1, с. 120—127, 1986.
19. Butterfield D. A., Roses A. D., Appel S. H., Chesnut D. B. Arch. Biochem. and Biophys., v. 177, № 6, p. 226—234, 1976.

20. Милютин А. А., Беляева Е. И., Буланова К. Я., Кирилук А. П., Лысакова Т. И., Окунь И. М., Аксенцев С. Л., Конев С. В. Бисфизика, т. 29, № 4, с. 640—642, 1984.
21. Оэриу С. Труды Международной конф. геронтол., Киев, т. 3, с. 41, 1972.
22. Кошоридзе А. И., Алексидзе Н. Г. Тезисы докл. IX Всесоюзн. конф. по биохимии нервной системы, Ереван, с. 63, 1983.
23. Quinn P. J. Prog. Biophys. Molec. Biol., v. 38, p. 1—104, 1981.
24. Конев С. В., Аксенцев С. Л., Окунь И. М., Беляева Е. И., Милютин А. А. Биохемилюминесценция, Ивано-Франковск, с. 143, 1981.
25. Curtis M. T., Gilfor D., Farber J. L. Arch. Biochem. and Biophys., v. 235, № 2, p. 644—649, 1984.
26. Morris D., McNeil R., Castellino F., Thomas J. Biochim et biophys. acta, v. 599, № 2, p. 380—390, 1980.

Поступила 8. IX 1988

Ганглиозиды и модуляция функции нейрона, 647 с., 1987.

Gangliosides and modulation of Neuronal Functions. H. Rohmann, Springer-Verlag, West. Berlin, 647 p. 1987.

После открытия Эрнстом Клекком ганглиозидов в 1936 г. появились тысячи статей, иллюстрирующих уникальные особенности этих гликолипидов и их вероятное участие в различных биологических феноменах. Однако и по настоящее время существуют значительные различия и противоречия между накопленными данными в этой области, требующие незамедлительного разрешения, поскольку ганглиозиды находят широкое применение в качестве терапевтических препаратов для лечения различных нейропатий. В рассматриваемой книге анализируется существующая информация об исследованиях в области ганглиозидов и перспективах их применения в медицине.

Содержание отдельных глав: Основные направления исследований в области функции ганглиозидов; Метаболизм ганглиозидов мозга; Специфическое распределение в клетках и связанная с дифференцировкой экспрессия ганглиозидов мозга; Ганглиозиды и пластичность мозга; Ганглиозиды и пластичность нейронов.