

УДК 577.1.:547.953:612.822.1:612.8.015

ИЗМЕНЕНИЯ В СОСТАВЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ ЛИПИДОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КАК ПРИЧИНА РАЗНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЦНС ЖИВОТНЫХ К РАЗДРАЖАЮЩИМ ФАКТОРАМ

Чернявская Л.И., Архипова Г.В.,

Бурлакова Е.Б.

Институт химической физики АН СССР, Москва

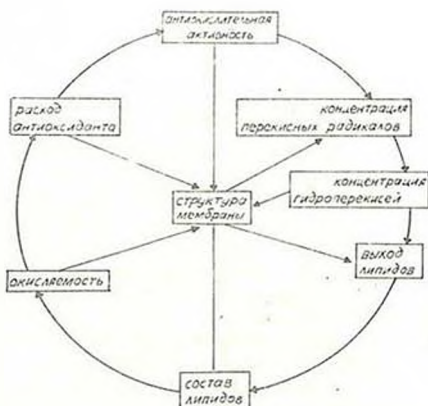
Изучено изменение отдельных параметров регуляторной системы ПОЛ: состава, антиокислительной активности липидов и их окисляемости, а также текучести липидной компоненты мембран для мозга крыс двух линий. Показано, что по указанным характеристикам липидов крысы линии Крушинского-Молодкиной (КМ), имеющие повышенную чувствительность к звуку, отличаются от беспородных животных. Введение антиоксиданта легковозбудимым животным так изменяло параметры регуляторной системы ПОЛ, что они становились похожими на эти показатели у беспородных крыс. В то же время отмечено значительное сходство указанных характеристик липидов мозга линии КМ с аналогичными характеристиками у беспородных животных с введенным антиоксидантом. Сходство и различие в характеристиках липидов мозга подопытных и контрольных крыс линии КМ и беспородных нашли свое отражение в чувствительности этих групп животных к действию раздражающих факторов. При этом восприимчивость к звуковому раздражителю и чувствительность холинергической системы к ареколину у беспородных животных с введенным антиоксидантом были повышены и приближались к этим показателям у легковозбудимых крыс линии КМ. Введение антиоксиданта крысам линии КМ, наоборот, понижало их чувствительность и к звуку, и к холиномиметику. В работе сделан вывод о важной роли физико-химических показателей липидов для чувствительности ЦНС к раздражителям.

* * *

Изучение регуляторных механизмов клетки является актуальным вопросом современной биологии. Нами ранее была предложена, а затем экспериментально подтверждена физико-химическая модель регуляции клеточного метаболизма окислительными реакциями в липидах (см. схему) [1].

Имеются многочисленные экспериментальные данные, которые показывают универсальность работы этой регуляторной системы для прокариотов и эукариотов как для клеточных поверхностных мембран, так и для мембран различных субклеточных органелл [2—4]. Установлено, что в норме данная система, параметрами которой являются состав, физико-химические свойства липидов и структура мембран, поддерживает стационарный уровень окислительных реакций в липидах мембран. При интенсифика-

ции ПОЛ происходит ускорение выхода из мембран наиболее легко окисляющихся фракций липидов, содержащих ненасыщенные жирные кислоты. В результате изменяется относительный состав липидов, которые обогащаются наиболее устойчивыми к окислению фракциями, уменьшается текучесть и окисляемость липидов мембран, следствием чего является уменьшение скорости зарождения радикалов в липидах и возвращение ПОЛ к норме.



Показано, что многие патологические состояния, например, опухолевый рост и поздние стадии ишемической болезни сердца сопровождаются изменениями взаимосвязи между параметрами регуляторной системы [5,6].

В связи с этим представляло интерес рассмотреть работу этой системы регуляции ПОЛ при заболеваниях ЦНС. Одной из моделей патологии ЦНС является разновидность эпилептического состояния — аудиогенная эпилепсия крыс линии КМ (развитие судорожного эпилептиформного припадка в ответ на звуковой раздражитель) [7].

Целью работы было выяснить, изменяется ли поведение регуляторной системы на уровне синапсомембранных головного мозга для крыс линий КМ по сравнению с беспородными животными.

В задачу работы входило экспериментальное изучение изменений отдельных параметров системы: состава, антиокислительной активности липидов и их окисляемости, а также текучести липидной компоненты мембран для мозга крыс двух линий. Для оценки надежности работы регуляторной системы исследовали их изменения под действием антиоксиданта.

Материалы и методы

В работе были использованы крысы линии КМ и беспородные массой 150—200 г, содержащиеся на стандартном рационе. В качестве биологически активного вещества исследовали синтетический антиоксидант из класса экранированных фенолов—фенозан в дозе 40 мг/кг. Ранее было установлено, что эта доза фенозана проявляет защитное противосудорожное действие у крыс линии КМ [8]. Препарат вводили внутрибрюшинно, контролем животным вводили равный объем физиологического раствора. Декапитацию животных, гомогенизацию ткани и выделение синапсом проводили по методике, предложенной De Robertis [9]. Экстракцию липидов из гомогената мозга проводили по методу Folch, Lees [10], а из синапсом по методике Кейтса [11]. Фракционирование фосфолипидов осуществляли методом восходящей одномерной хроматографии на силикагеле [12] с последующим количественным определением фосфолипидных фракций по P_i [13], а холестерина — по методу Sperry, Webb [14]. Определение антиокислительной активности липидов, адекватной уровню природных антиоксидантов, проводили на метилолеатной модели [15]. Окисляемость липидов определяли по степени их ненасыщенности методом озонирования на анализаторе двойных связей АДС-2, разработанном в Институте химической физики АН СССР [16], а также по жирнокислотному составу липидов, измеренному по методу Штофеля в модификации Верещагина [17]. Текучесть липидов мембран оценивали по времени вращательной корреляции (τ_c) спинного зонда—2,2,6,6-тетрамтил-4 каприлоил-1 оксилпиперидин, который встраивается преимущественно в липидную фазу мембраны [18]. Радиоспектрометрические исследования проводили на спектрометре «Вгукер», используя суспензию синапсом с концентрацией белка 10 мг/мл. Определение белка в пробах проводили по методу Lowry и соавт. [19]. Об относительном уровне гидроперекисей липидов судили по накоплению малонового диальдегида, который определяли по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [20]. Для оценки действия фенозана на состояние ЦНС использовали ареколиновый тест и определяли эффективную дозу (ED_{50}), при которой у 50% животных наблюдали полный тремор спинной мускулатуры. Смещение этого показателя позволяет судить об изменении чувствительности ЦНС на введение того или иного препарата [21]. Чувствительность крыс к звуку определяли по методу Крушинского и соавт. [22].

Результаты и обсуждение

В табл.1 представлены значения основных физико-химических показателей липидов головного мозга беспородных крыс. Для исследования характера взаимосвязи этих параметров в регуляторной системе мы

решили изучить изменение каждого из рассматриваемых показателей при воздействии антиоксиданта.

Таблица 1

Изменения физико-химических характеристик мембран синапсом головного мозга крыс через 1 ч и (в скобках) 4,5 ч после внутрибрюшинного введения антиоксиданта

Характеристики мембран синапсом	Группы животных	Беспородные	Беспородные с фенозаном	Крысы линии КМ	Крысы линии КМ с фено-заном
Антиокислительная активность липидов (ч · мл/г)		-675 ± 70	150 ± 55 (-625 ± 60)	-500 ± 50	-475 ± 60 (-250 ± 55)
Концентрация малонового диальдегида (в нмоль /мг белка · м) · 10 ⁻³ (инкубация при 37°)		0,93 ± 0,09	0,36 ± 0,04	0,36 ± 0,03	0,87 ± 0,07
Сумма легкоокисляемых липидов / сумма трудноокисляемых липидов (S)		29,1 ± 3,6	44,0 ± 4,1	42,8 ± 3,9	25,8 ± 3,0
Время вращательной корреляции спинного зонда при 37° (с · 10 ⁻¹⁰)		4,27 ± 0,20	2,88 ± 0,09	2,95 ± 0,1	3,38 ± 0,1
Белок в мг/липид в мг		2,00 ± 0,15	1,63 ± 0,08	1,7 ± 0,07	1,85 ± 0,07
Холестерин (мкмоль) / фосфолипиды (мкмоль)		1,80 ± 0,20	0,79 ± 0,08	1,44 ± 0,15	0,84 ± 0,07
Холестерин в мг/белок в мг		3,75 ± 0,36	1,63 ± 0,17	2,08 ± 0,21	1,38 ± 0,11
Сумма ненасыщенных жирных кислот / сумма насыщенных жирных кислот		0,76 ± 0,04	1,02 ± 0,06	1,04 ± 0,05	0,94 ± 0,04
Ненасыщенность липидов методом озонирования (моль O ₃ /мг липида) · 10 ⁻⁵		0,09 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,15 ± 0,01
Эффективная доза асептолина (мг/кг)		12,0 ± 1,2	7,5 ± 0,7	7,0 ± 0,7	9,8 ± 1,0
% животных, подверженных групп		10,0 ± 2,1	60,0 ± 3,6	96,0 ± 3,5	0

Примечание. Достоверность различий между опытом и контролем и между разными линиями крыс $p \leq 0,05$.

Как видно из табл.1, внутрибрюшинное введение антиоксиданта беспородным крысам уже через 1 ч привело к значительному увеличению антиокислительной активности (АОА) липидов от $-675 \frac{\text{ч} \cdot \text{мл}}{\text{г}}$ до $150 \frac{\text{ч} \cdot \text{мл}}{\text{г}}$. В более поздние сроки (через 4,5 ч) после введения препарата наблюдалось возвращение АОА липидов к норме. Антиоксидант вызывал уменьшение скорости образования малонового диальдегида (МДА) у беспородных

крыс в 2,5 раза. Таким образом, взаимосвязь между АОА липидов и скоростью образования гидроперекисей функционирует согласно рассматриваемой схеме регуляции.

Одним из основных параметров системы регуляции является состав липидов. В работе было изучено изменение состава фосфолипидов и холестерина синапсомембранных мембран. Из полученных данных вычисляли величину окисляемости (S) как отношение легко окисляемых фракций фосфолипидов (фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, кардиолипин) к сумме трудноокисляемых фракций (сфингомиелин, фосфатидилхолин) с соответствующими коэффициентами [23]. Через 1 ч после введения фенотана величина S возрастала от 29 до 44, так как фенотан вызывал увеличение относительного содержания легкоокисляемых фракций фосфолипидов у беспородных крыс. Взаимосвязанная с составом липидов текучесть липидной компоненты синапсомембранных также увеличивалась, так как время вращательной корреляции спинного зонда уменьшалось. При этом более жидкому состоянию мембраны соответствовало уменьшение содержания холестерина как в расчете на мг белка, так и на мкмоль фосфолипидов, а также наблюдалось увеличение содержания общих липидов в расчете на мг белка.

Согласно литературным данным [24], степень ненасыщенности липидов является важным фактором, влияющим как на окисляемость, так и на вязкость липидов мембраны. Увеличение текучести липидной компоненты синапсомембраны беспородных крыс вследствие введения им антиоксиданта происходило одновременно почти с 2-кратным возрастанием степени ненасыщенности липидов, измеренной как методом озонирования, так и по соотношению суммы ненасыщенных жирных кислот к насыщенным, что также позволяет говорить об увеличении окисляемости.

Таким образом, на основании рассмотрения параметров регуляторной системы (АОА, состав и окисляемость липидов, а также микровязкость липидной компоненты) мы обнаружили, что в мозгу беспородных крыс на увеличение АОА липидов мембрана отвечает уменьшением концентрации гидроперекисей, изменением состава липидов за счет накопления легкоокисляемых фракций (фосфатидилсерина, фосфатидилинозита, фосфатидилэтаноламина, кардиолипина), повышением вследствие этого способности липидов мембран к окислению, что, в свою очередь, вызывает увеличение скорости расходования антиоксиданта и возвращение АОА липидов к нормальному уровню. При этом повышенному уровню АОА липидов соответствовало более «жидкое» состояние липидного бислоя синапсомембраны и уменьшение содержания холестерина в ней.

При изучении физико-химических характеристик липидов головного мозга крыс линии КМ, имеющих повышенную возбудимость, было показано их отличие от аналогичных параметров у беспородных животных.

Как видно из табл.2, легковозбудимые животные (крысы КМ) по сравнению с обычными животными (беспородные крысы) имеют повышен-

ный уровень АОА, значительно меньшую скорость образования гидроперекисей, большее содержание легкоокисляемых фракций липидов, в частности фосфатидилсерина и фосфатидилинозита (КМ— $26,1 \pm 2,0\%$; беспородные— $19,2 \pm 1,5\%$), более высокую (в 2 раза) ненасыщенность липидов и, как следствие, менее вязкую, по сравнению с беспородными животными, синапсомную мембрану, а также значительно меньшее содержание холестерина как на мг белка, так и на мкмоль фосфолипида.

Таким образом, по всем исследованным показателям липидной фазы мембраны крысы линии КМ отличаются от беспородных. В то же время, при сопоставлении характеристик липидов мембран мозга крыс линии КМ с таковыми у беспородных животных, которым ввели антиоксидант, мы обнаружили их удивительную близость. Единственным отличием между показателями липидов у крыс линии КМ и беспородных с введенным антиоксидантом было содержание холестерина (табл.2).

Таблица 2

Состав фосфолипидов (в % от Р общ.) мембран синапсом головного мозга крыс в норме и через 1 ч после внутрибрюшинного введения животным антиоксиданта

Группы крыс Фосфолипиды	Беспородные	Беспородные с фенозаном	Крысы линии КМ	Крысы линии КМ с фенозаном
Фосфатидилсерин + фосфатидилинозит	$14,5 \pm 0,8$	$19,2 \pm 1,1$ *	$26,0 \pm 2,3$ *	$14,0 \pm 0,8$ **
Сфингомиелин	$6,0 \pm 0,3$	$3,5 \pm 0,2$ *	$4,1 \pm 0,4$ *	$5,9 \pm 0,5$ **
Фосфатидилхолин	$39,9 \pm 2,8$	$31,8 \pm 2,1$ *	$30,5 \pm 2,5$ *	$44,0 \pm 4,2$ **
Фосфатидилэтаноламин	$36,8 \pm 2,0$	$40,9 \pm 1,8$	$37,0 \pm 2,1$	$35,2 \pm 2,3$ **
Кардиолипин + фосфа- тидная кислота	$3,0 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,4$ *	$2,0 \pm 0,1$ *	$2,1 \pm 0,2$

Примечание. * $p \leq 0,05$ (сравнение с беспородными крысами), ** $p \leq 0,05$ (сравнение с крысами линии КМ).

При сопоставлении ареколиновым тестом функциональной характеристики синапсомной мембраны крыс линии КМ и беспородных с антиоксидантом также обнаруживаются близкие значения ED_{50} , отличающиеся от ED_{50} для контрольных беспородных крыс. Это свидетельствует о важном значении физико-химических характеристик липидов мембран мозга крыс разных линий для их возбудимости и активности холинергической передачи.

Важно было установить, функционирует ли физико-химическая система регуляции ПОЛ головного мозга крыс КМ так же, как и для беспородных. Введение антиоксиданта крысам линии КМ практически не изменило АОА липидов через 1 ч после введения, однако через 4,5 ч в отличие от беспородных крыс, наблюдалось увеличение АОА липидов почти в 2 раза. В то же время скорость образования МДА не уменьшается, а повышается и приближается к таковой для беспородных крыс. Увеличение скорости образования гидроперекисей повлекло за собой изменение величины S за счет изменения состава фосфолипидов в сторону уменьшения содержания легкоокисляемых фракций, в частности фосфатидилсерина и фосфатидилинозита (от 26,1% до 14%), а также уменьшение содержания общих липидов в расчете на мг белка и увеличение микровязкости (по τ). Следует отметить, что увеличение τ_c у крыс линии КМ с антиоксидантом происходит на фоне уменьшения окисляемости липидов на 66% по индексу ненасыщенности и на 80% по соотношению ненасыщенных жирных кислот к насыщенным.

Рассматривая взаимосвязь найденных нами изменений АОА, состава, микровязкости, окисляемости липидов мы обнаружили, что у крыс линии КМ взаимосвязь параметров регуляторной системы отличается от нормы. При этом первое «искажение» появляется на этапе связи между АОА липидов и концентраций гидроперекисей. В дальнейшем все изменения параметров происходят так, как они должны были бы происходить в ответ не на увеличение АОА липидов, а на повышение концентрации гидроперекисей. Поэтому большинство параметров системы для крыс линии КМ с введенным антиоксидантом близки к беспородным в норме.

Это же проявляется и при определении чувствительности холинергической системы к ареколину: величина ED_{50} для крыс линии КМ с антиоксидантом близка этой величине у беспородных животных.

Если чувствительность ЦНС крыс линии КМ и беспородных определенным образом связана с физико-химической системой регуляции ПОЛ, то из полученных нами данных следует, что беспородные крысы с введенным антиоксидантом должны стать более чувствительными не только к действию холиномиметика, но и к сильному звуковому раздражителю. Проведение экспериментов по той же методике, что и для выявления чувствительности к звуковому раздражителю у крыс линии КМ [22], показало, что у 60% беспородных крыс с введенным фенозаном сильный звуковой раздражитель вызывал произвольные движения — груминг (в 10 раз более продолжительный по времени, чем в контроле), свидетельствующий о начале припадка. Однако, в отличие от крыс линии КМ, этот первый этап повышенной чувствительности к звуку не завершился эпилептиформным судорожным припадком. Мы полагаем, что неадекватная реакция в виде эпилептиформных судорог при действии сильного звукового раздражителя у крыс линии КМ в некотором отношении может быть связана с обнаруженными нами «искажениями» в системе регуляции.

Таким образом, мы обнаружили, что по всем характеристикам липидов мембран головного мозга (АОА, состав, окисляемость липидов, вязкость липидной компоненты) крысы линии КМ, отличающиеся повышенной возбудимостью и выпадающие в 96% случаев в судорожный эпилептоформный припадок в ответ на действие звука, отличаются от беспородных животных. При этом интересно отметить значительное сходство указанных характеристик липидов мозга крыс линии КМ с аналогичными характеристиками у беспородных животных с введенным антиоксидантом. В то же время введение антиоксиданта легковозбудимым животным (линия КМ) так изменяет параметры системы регуляции ПОЛ, что они становятся похожими на эти показатели у беспородных крыс.

Ответ легковозбудимых животных (КМ) на введение антиоксиданта отличается от ответной реакции у беспородных крыс. При этом у крыс линии КМ «искажения» в ответе регуляторной системы на введение антиоксиданта наблюдаются на самых ранних этапах, а именно на этапе связи АОА липидов и концентрацией гидроперекисей. Все остальные звенья системы отвечали на введение антиоксиданта так же, как и беспородные на усиление ПОЛ.

Сходство и различие в характеристике липидов мозга подопытных и контрольных крыс линии КМ и беспородных находят свое отражение в чувствительности этих животных к действию раздражающих факторов. Чувствительность к звуковому раздражителю, так же как и чувствительность холинергической системы (по ЕД₅₀) у беспородных животных с введенным антиоксидантом повышена и приближается к чувствительности у легковозбудимых крыс КМ. Введение антиоксиданта крысам линии КМ, наоборот, снижает чувствительность и к звуку, и к холиномиметику. Это связано с изменением в системе регуляции ПОЛ у крыс линии КМ по сравнению с беспородными животными. Если бы система регуляции не была бы искажена, то введением антиоксиданта мы могли бы достичь лишь еще большего увеличения чувствительности.

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о важной роли состава, текучести и окисляемости липидов мембран мозга для чувствительности ЦНС к раздражителям.

CHANGES IN THE COMPOSITION AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF BRAIN LIPIDS AS AN EXPLANATION OF DIFFERENT SENSITIVITY OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM TO STIMULATION

Chernyavskaya L.I., Arkhipova G.V.,
Burlakova E.B.

*Institute of Chemical Physics, USSR
Academy of Sciences, Moscow*

We studied changes in some parameters of the regulatory system of lipid peroxidation (LPO) including composition and antioxidative activity of lipids, their ability to be oxidized fluidity in membranes from the rat brain. In KM rats with high sensitivity to sound these parameters differed from the corresponding characteristics in inbred animals. Administration of antioxidants to easily excitable animals made their LPO characteristics similar to those of inbred rats. At the same time there was a considerable similarity of these characteristics for KM rats brain lipids and those of inbred rats after the administration of antioxidants. The inbred animals receiving the antioxidant had increased sensitivity, to sound stimuli, moreover, their cholinergic system was more sensitive to arecoline being similar in this respect to that of easily excitable KM rats. On the contrary, the administration of the antioxidant to KM rats decreased their sensitivity to the sound and cholinomimetic. It is concluded that physico-chemical parameters of lipids are important for the sensitivity of the CNS to stimulation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е.Б. — В сб.: Симпозиальные доклады III Всесоюз. Биохимического съезда, с.184—190, Зинатис, Рига, 1971.
2. Burlakova E.B., Molotchikina E.M., Palma N.P. *Adv. Enzyme Regul.*, v.18, p.163, 1980.
3. Богословская О.А. Автореферат канд. дис., М., 1983.
4. Феофилова Е.П., Бурлакова Е.Б., Кузнецов Л.С., Полотебнова М.Б., Розанцев Э.Г. *Прикладная биохимия и микробиол.*, т.22 вып.2, с.248, 1986.
5. Бурлакова Е.Б., Мальцева Е.Л., Пальмина Н.П., Голощапов А.Н. *Биофизика*, т.25, N4, с.3, 1982.
6. Калмыкова В.И., Бурлакова Е.Б. *Сов. медицина*, N4, с.3, 1982.
7. Крушинский Л.В. *Успехи соврем. биол.*, т.28, вып.1 (4), 1949.
8. Архипова Г.В., Бурлакова Е.Б., Семиохина А.Ф., Федотова И.Б., Крушинский Л.В. *Докл. АН СССР*, т.267, N2, с.469—471, 1982.
9. De Robertis E. — In: *Drug Receptor*, p.257—272, London, Plenum Press, 1973.
10. Folch J.J., Lees M.J. *J. Biol. Chem.*, v.226, p.497—502, 1957.
11. Кейтс М. *Техника липидологии*, М., Мир, с.72—77, 1975.
12. Шталь Э. — В кн.: *Хроматография в тонких слоях*, с.44—60, М., Мир, 1965.

13. *Chen P.S., Foribara T.J., Warnar N.* Anal. Chem., v.28, N 7, p.1756—1758, 1956.
14. *Sperry W.H., Webb M. J.* Biol. Chem., v.187, p.96—106, 1950.
15. Бурлакова Е.Б., Джоба Н.М., Пальмина Н.П., Эмануэль Н.М. Докл АН СССР, т.163, N 5, с.278—282, 1965.
16. Лисицын Д.М., Позняк Т.И., Разумовский С.Д. Кинетика и катализ, т.17, вып. 4, с.1049—1056, 1976.
17. Верецагин А.Г., Скорцова С.В., Исхаков Н.И. Биохимия, т.28, вып.5, с.868—878, 1963.
18. Голощапов А.Н., Бурлакова Е.Б. Биофизика, т.20, с.816—820, 1975.
19. *Lowry O.N., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* J.Biol.Chem., v.193, N 1, p.423—434, 1951.
20. *Buege J.A. Aust st.D. Microsomal lipid peroxidation method Enzymol*, v.52, p.302—310, 1978.
21. Аничков С.В. — В кн.: Избирательное действие медиаторных средств, с.224, Л., Медицина, 1974.
22. Крушинский Л.В., Семиохина А.Ф., Плещаксва М.Г. — В кн.: Эмоции и поведение: системный подход, Советско-американская Павловская конференция памяти П.К. Анохина, с.167—169, М., 1984.
23. Аристархова С.А., Архипова Г.Б., Бурлакова Е.Б., Гаахария В.О., Глущенко Н.И., Храпова Н.Г. Докл. АН СССР, т.228, N 1, с.215—219, 1976.
24. *Krepс E.M.* — В кн.: Липиды клеточных мембран, с.188—193, Л., Наука, 1981.

Поступила 20.11.1988