

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФОСФОЛИПИДОВ
В НЕЙРОНАХ И НЕЙРОГЛИИ

ФЛЕРОВ М. А.

Физиологический институт им. А. А. Ухтомского Ленинградского
государственного университета им. А. А. Жданова-2

Исследовали метаболическую активность отдельных фракций фосфолипидов в различные сроки после введения ацетата- ^{214}C и (метил- ^3H)холина. Установлено, что в течение изученных сроков радиоактивной экспозиции наибольшая интенсивность включения радиоактивного углерода как в нейронах, так и в нейроглии наблюдается во фракциях фосфатидных кислот и фосфоинозитидов. При введении (метил- ^3H)холина радиоактивность зарегистрирована в 3-х фосфолипидных фракциях: лизофосфатидилхолине, фосфатидилхолине и сфингомиелине. Показано, что независимо от вводимого предшественника уровень радиоактивности отдельных фракций фосфолипидов выше в нейронах по сравнению с нейроглией, что, по-видимому, связано с наличием в нейронах и нейроглии различных генетически обусловленных систем биосинтеза фосфолипидов.

Изучение биохимических механизмов функциональной деятельности нейронов и их метаболической взаимосвязи с нейроглией является одним из актуальных направлений современной нейрохимии. Как известно, экспериментальные данные, полученные на гомогенатах мозговой ткани, позволяют охарактеризовать метаболические процессы в наиболее общем виде без учета своеобразия и специфики отдельных клеточных популяций ЦНС, а ведь именно нервная ткань отличается крайне выраженной гетерогенностью клеточного состава. Несмотря на то, что нейроны и нейроглии значительно различаются как по морфологическим признакам, так и по выполняемым функциям, они образуют единую метаболическую систему, идея о существовании которой впервые была выдвинута в классических работах Нуден [1—3].

Значительный прогресс в развитии функциональной нейрохимии был достигнут благодаря разработке метода препаративного получения клеточных фракций головного мозга, обогащенных нейронами и нейроглией [4—9]. Особое место в исследовании химического состава и метаболизма нейроглии занимают фосфолипиды. Е. М. Крекс писал: «Без неперемennого участия сложных липидов—фосфолипидов, протолипидов, стеролов не осуществляется почти ни один биологический процесс» [10]. Важнейшими из перечисленных липидов являются фосфоли-

пиды, составляющие около 70% всех липидов головного мозга. Они являются не только постоянными структурными компонентами клеточных мембран, но и принимают непосредственное участие в регуляции тонко сбалансированных биохимических реакций [11]. В то же время имеющиеся в литературе данные об участии фосфолипидов в функционировании системы нейрон—нейроглия немногочисленны, что во многом связано с методическими трудностями препаративного выделения фракций, обогащенных нейронами и нейроглией.

Целью настоящей работы явилось исследование метаболической активности отдельных фракций фосфолипидов в нейронах и нейроглии, выделенных из коры головного мозга.

Материалы и методы

Опыты ставили на белых крысах-самках массой 120—150 г. В качестве радиоактивных предшественников биосинтеза фосфолипидов использовали ацетат- ^{214}C (вводили подкожно из расчета 30 мкКи/100 г веса животного) и (метил- ^3H)холин (вводили интракраниально в дозе 5 мкКи). Время радиоактивной экспозиции было равно 60, 120, 180 мин.

По прошествии времени радиоактивной экспозиции крыс деканттировали, быстро извлекали и отмывали от крови мозг охлажденным физиологическим раствором. Кору больших полушарий помещали на охлажденные стеклянные пластинки, тщательно измельчали, суспендировали в растворе поливинилпирролидона и выделяли фракции, обогащенные нейронами и нейроглией, по методу Sellinger и созат. [9] в нашей модификации, позволявшей выделять значительно больше клеточного материала. Подробно этапы предпринятой нами модификации описаны ранее [12]. Отдельные фракции фосфолипидов нейронов и нейроглии получали методом двумерной хроматографии в тонком слое силикагеля КСК [13]. Пятна, соответствующие фракциям фосфолипидов, после проявления в парах йода переносили с хроматограмм в вials для подсчета радиоактивности. Идентификацию отдельных фракций фосфолипидов проводили с помощью ИК-спектроскопии. Для этого пятна, соответствующие фракциям фосфолипидов нейронов и нейроглии, соскабливали в пробирку с притертой пробкой и осуществляли 3-кратную элюцию с помощью системы растворителей хлороформ:метанол:7 н. NH_3 (120:70:10). Элюаты выпаривали на ротационном испарителе и после растворения в 10 мкл сероуглерода переносили в микрокюветы. Применение микротехники обусловлено тем, что выделенного из нейронов количества фосфолипидов (особенно минорных фракций) недостаточно для снятия ИК-спектров в обычных кюветах. Спектры снимали на инфракрасном спектрофотометре UR-20. Ввиду идентичности спектров нейрональных и нейроглиальных фосфолипидов на рисунке представлены ИК-спектры отдельных фракций фосфолипидов, выделенных из нейронов коры головного мозга. Для всех фракций фосфолипидов, как нейронов, так и нейроглии характерно наличие сильной полосы поглощения в области $1250\text{—}1215\text{ см}^{-1}$, связанной с колебаниями группы P=O и в области $1100\text{—}1050\text{ см}^{-1}$ (P—O—C). Это две главные полосы, которые отличают фосфолипиды от других липидов. Глицерофосфолипиды имеют сильную полосу поглощения $1750\text{—}1740\text{ см}^{-1}$, связанную с колебаниями сложноэфирной группировки. В ИК-спектре сфингомиелинов были обнаружены полосы 1640 и 1550 см^{-1} (амид I и 2), связанные с колебаниями групп CO—NH . Присутствие холиновых группировок обнаруживается по полосе средней интенсивности 970 см^{-1} , характерной для фракций лизофосфатидилхолинов (ЛФХ), сфингомиелинов (СФМ) и фосфатидилхолинов (ФХ). Благодаря этой полосе отличают холинсодержащие фосфолипиды от этаноламинсодержащих. Так, в ИК-спектре фосфатидилэтанолamina (ФЭ) имеется одиночная полоса 1080 см^{-1} , а для холинсодержащих фосфолипидов характерен дуплет 1090 ,

1070 см^{-1} . Следует отметить, что в ИК-спектрах ФЭ нейроглии в отличие от ФЭ нейронов полоса 1650 см^{-1} , характерная для плазмалогенов, имеет большую интенсивность. Этот факт, по-видимому, свидетельствует об относительном обогащении ФЭ нейроглии по сравнению с нейрональными. После снятия спектра определяли количественное содержание отдельных фракций фосфолипидов в микрокувете. Данные представлены в табл. 1. Таким образом, количества отдельных фракций ФЛ для

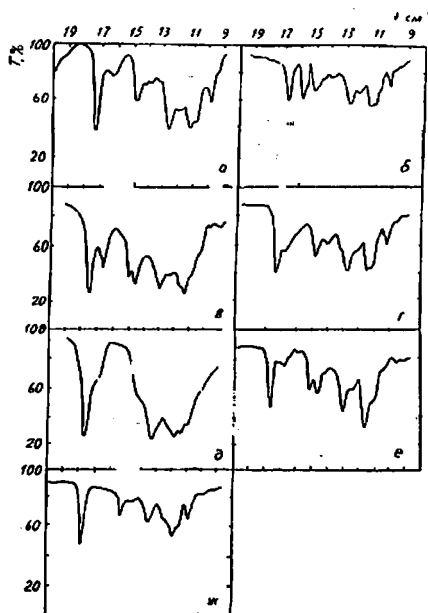


Рис. ИК-спектры отдельных фракций фосфолипидов нейронов. а—лизофосфатидилхолина, б—сфингомиелины, в—фосфатидилсерины, г—фосфатидилхолина, д—фосфонозитаты, е—фосфатидилэтаноламины, ж—фосфатидные кислоты

ИК-спектроскопии колебались в пределах от 6,2 до 29,2 мкг, давая удовлетворительные спектры, сравнимые с ИК-спектрами фосфолипидов, получаемых в обычных кюветах [14], в которых для анализа необходимо значительно большее количество вещества. Это несомненно существенно расширяет границы применения ИК-спектроскопии в нейрохимических исследованиях.

Результаты и обсуждение

В табл. 2 приведены данные по включению радиоактивного углерода C^{14} в отдельные фракции фосфолипидов нейронов в различные сроки после введения ацетата- 2^{14}C . Величина У. А. представлена в импульсах в 1 мин на 1 мг углерода (имп/мин·мг «С»). Из представленных данных видно, что через 60 мин после введения ацетата- 2^{14}C наибольшей У. А. обладает ФК, а наименьшей—СФМ. Довольно высоким уровнем метаболизма характеризуются фракции ЛФХ и ФИ. Через 120 мин после введения ацетата- 2^{14}C происходит увеличение У. А. отдельных фракций фосфолипидов: У. А. ФИ увеличивается по сравнению с 60-й мин после введения радиоактивного предшественника в среднем в 7 раз, а У. А. фосфатидилсерина (ФС) и СФМ—в 4

раза. У. А. остальных фракций также увеличивается, но не столь значительно. Через 180 мин после введения ацетата- 2^{14}C хоть и происходит увеличение У. А., но по сравнению с 2-часовой радиоактивной

Таблица 1

Содержание отдельных фракций фосфолипидов нейронов и нейроглии в микрокювете (мкг).

Фракции фосфолипидов	Нейроны	Нейроглия
Лизофосфатидилхолин	7,4	7,9
Сфингомиелин	12,4	9,6
Фосфатидилсерин	18,5	20,8
Фосфатидилхолин	17,8	27,8
Фосфатидилэтаноламин	18,5	29,2
Фосфатидилинозит	13,0	18,7
Фосфатидная кислота	6,2	15,2

экспозицией оно не столь значительно, как переход от 60 до 120 мин. Наибольшей У. А., как и через 120 мин, обладают фракции ФИ и ФК, наименьшей—СВМ и ФЭ. Увеличение У. А. ФИ и ФК в этот период по сравнению с 2-часовой радиоактивной экспозицией колеблется в пределах 1,5—2 раза.

Таблица 2

Удельная активность отдельных фракций фосфолипидов нейронов в различные сроки после введения ацетата- 2^{14}C (имп/мин. мг «С»)

Фракция фосфолипидов	Время радиоактивной экспозиции (мин)		
	60	120	180
Лизофосфатидилхолин	1060 $\pm$ 221	3560 $\pm$ 1215	9139 $\pm$ 2367
Сфингомиелин	613 $\pm$ 34	2308 $\pm$ 611	2778 $\pm$ 573
Фосфатидилсерин	719 $\pm$ 274	3034 $\pm$ 348	7402 $\pm$ 877
Фосфатидилхолин	747 $\pm$ 106	1784 $\pm$ 279	4020 $\pm$ 779
Фосфатидилинозит	902 $\pm$ 69	6230 $\pm$ 1115	10381 $\pm$ 1318
Фосфатидилэтаноламин	682 $\pm$ 69	1513 $\pm$ 301	2685 $\pm$ 391
Фосфатидная кислота	2313 $\pm$ 722	4291 $\pm$ 1051	10235 $\pm$ 1952

Представленные данные величин У. А. отдельных фосфолипидов свидетельствуют об их высокой метаболической активности в нейронах. Однако очевидно, что в общую метаболическую активность фосфолипидов головного мозга вносят вклад и фосфолипиды, принадлежащие нейроглиальным клеткам. Поэтому нами была исследована динамика включения радиоактивного углерода в отдельные фракции фосфолипидов нейроглии. Данные представлены в табл. 3.

В нейроглии через 60 мин после введения ацетата- 2^{14}C наибольшей У. А. обладает фракция ФК, а наименьшей—ФЭ. В следующие 60 мин происходит увеличение уровня У. А. всех нейроглиальных фосфолипидных фракций, особенно ФИ, ФС, и ЛФХ. У. А. ФИ в этот

период возрастает в 4 раза по сравнению с часовой радиоактивной экспозицией. Через 180 мин после введения ацетата- 2^{14}C только в двух фракциях, а именно в ФК и ФЭ, У.А. возрастает в среднем в 1,5 раза. Наибольшей У.А., так же как и при 120 мин экспозиции, обладает фракция ФИ, а наименьшей—ФЭ.

Таблица 3

Удельная активность отдельных фракций фосфолипидов нейроглии после введения ацетата- 2^{14}C (имп/мин. мг «С»)

Фракции фосфолипидов	Время радиоактивной экспозиции (мин)		
	60	120	180
Лизофосфатидилхолин	492±117	1443±135	2185±322
Сфингомиелин	372±120	698±77	743±121
Фосфатидилсерин	326±23	1049±256	1945±511
Фосфатидилхолин	64±153	864±89	995±130
Фосфатидилинозит	414±98	2317±310	2782±626
Фосфатидилэтаноламин	157±25	326±30	481±99
Фосфатидная кислота	1206±96	1591±118	2504±498

Полученные данные по динамике включения радиоактивного углерода свидетельствуют о том, что во все исследованные сроки радиоактивной экспозиции нейропальные фосфолипиды имеют более высокий метаболический статус по сравнению с нейроглиальными. Как известно, с помощью ацетата- 2^{14}C удастся проследить метаболическую активность гидрофобных компонентов молекулы фосфолипидов. Наряду с этим несомненный интерес представляют обменные реакции азотистых оснований. Данные по изучению включения меченых азотистых оснований позволяют сделать заключение относительно активности ферментативных систем биосинтеза отдельных представителей фосфолипидов в различных клеточных популяциях ЦНС. Одним из важнейших азотистых оснований, входящих в состав наиболее представительной группы фосфолипидов, а именно ЛФХ, ФХ и СФМ, является холин. В табл. 4 представлены результаты по включению (метил- ^3H)холина во фракции фосфолипидов нейронов и нейроглии в различные сроки радиоактивной экспозиции. В нейронах через 60 мин после введения (метил- ^3H)холина наибольшей У.А. обладает фракция ЛФХ, а наименьшей—фракция СФМ. ФХ по уровню метаболизма в этот период занимает промежуточное положение. Через 120 мин У.А. ФХ увеличивается более чем в 2 раза, а У.А. ЛФХ и СФМ практически не изменяется. В дальнейшем происходит снижение уровня ЛФХ в среднем в 1,5 раза и повышение У.А. СФМ в 2,4 раза. При расчете процентного распределения радиоактивности по фракциям 80% последней во все исследованные сроки сосредоточено во фракции ФХ.

В нейроглии через 60 и 120 мин после введения (метил- ^3H)холина наибольшей У.А. обладают ЛФХ, а наименьшей—СФМ. Следует отметить, что в период между 60 и 120 мин наблюдается увеличение

У.А. ЛФХ более чем в 1,5 раза, а через 180 мин она достигает такого же уровня, как через 60 мин после введения (метил- ^3H)холина. Для СФМ характерен относительно постоянный уровень У.А. в течение 2-часовой радиоактивной экспозиции с последующим резким, в среднем в 5 раз, возрастанием её в период между 120 и 180 мин. У.А. ФХ в первые 2 ч ниже У.А. ЛФХ в среднем в 2 раза, однако через 180 мин после введения (метил- ^3H)холина её уровень в среднем в 1,7 раза выше, чем У.А. ЛФХ. В исследованные сроки в ФХ нейроглии сосредоточено от 75 до 90% радиоактивности общих липидов.

Таблица 4

Удельная активность отдельных фракций фосфолипидов нейронов и нейроглии в разные сроки после введения (метил- ^3H)холина (нмп/мин·мг ФЛ)

Фракция фосфолипидов	Время радиоактивной экспозиции (мин)		
	60	120	180
Нейроны			
Лизофосфатидилхолин	10121±1240	11362±1936	7578±1016
Сфингомиелин	1477±211	1669±291	4079±175
Фосфатидилхолин	5556±1039	12837±2011	12037±1039
Нейроглия			
Лизофосфатидилхолин	4689±944	7416±1090	4286±502
Сфингомиелин	405±112	585±158	2710±550
Фосфатидилхолин	2952±209	4781±745	7859±780

Таким образом, на основании приведенных данных можно сделать вывод, что независимо от используемого радиоактивного предшественника в нейронах фосфолипидные фракции обладают более высокой скоростью обмена, чем фосфолипиды нейроглии.

Это положение справедливо не только для предшественников, меченных ^{14}C и ^3H , но также и для ^{32}P [15]. Следовательно, все компоненты молекулы фосфолипидов, как гидрофобные, так и гидрофильные различаются в нейронах и нейроглии по уровню своего метаболизма. Более высокий уровень метаболической активности нейрональных фосфолипидов по сравнению с нейроглиальными подтверждает важную роль фосфолипидов в процессах, связанных с транспортом ионов, секрецией медиаторов, действием гормонов и др. В настоящее время установлено, что такие фракции фосфолипидов, как ФХ, ФС, ФИ и ФЭ, обладают способностью связывать двухвалентные ионы, и в частности Ca^{2+} [16—18]. Прямое отношение фосфолипидов к ионной проницаемости подтверждается в опытах с адренохромом, осуществляющим деполяризацию мембран [19], и с обработкой мембран фосфолипазами, вызывающими быстрое падение мембранного потенциала и сопротивления мембраны [20]. Наиболее значительные изменения в метаболизме отмечены для фракций ФИ, ФК и ЛФХ. Это связано прежде всего с тем, что ФК и ФИ принимают самое непосредственное

участие в осуществлении нейрохимических процессов, происходящих на уровне нейрональных клеток. Поэтому эти фракции являются одними из самых высокометаболизируемых фракций в нейронах (табл. 2). Во все изученные сроки радиоактивной экспозиции их У.А. значительно превышает У.А. остальных фосфолипидных фракций. Высокий уровень обмена ЛФХ ещё до недавнего времени объясняли тем, что этот минорный фосфолипид является основной транспортной формой холина [21], потребности в котором наиболее значительны в нейронах.

Однако появившиеся в последнее время данные свидетельствуют о том, что ЛФХ играет определенную роль в секреции нейромедиаторов. По-видимому, не только ФК, но и ЛФХ являются теми мембранными липидами, которые осуществляют связь между деполаризацией и освобождением медиаторов в головном мозгу на молекулярном уровне [22—24]. Довольно высокий уровень метаболизма ФИ и ФК в нейроглии (табл. 3) подтверждает их прямую связь с транспортом ионов, в частности в регуляции активности Na^+ , K^+ -АТФазы, которая выше в клетках нейроглии по сравнению с нейронами [25, 26]. Следует также отметить высокую степень включения радиоактивных предшественников в СФМ нейронов. У.А. СФМ в нейронах в 2—3 раза выше У.А. СФМ нейроглии. Такое различие в метаболизме сфингомиелинов связано с двойственной функцией, которую они выполняют в ЦНС: с одной стороны, динамической, связанной с высоким уровнем метаболизма в телах нейронов, и с другой—структурной функцией в мембранах нейроглии и миелине [27—29]. По-видимому, все сказанное о СФМ в полной мере относится к ФС, которые также обмениваются в нейронах интенсивнее, чем в нейроглии. Представленные данные по динамике включения радиоактивных предшественников свидетельствуют о существовании различных систем биосинтеза фосфолипидов в нейронах и нейроглии. По-видимому, биосинтез нейрональных фосфолипидов обусловлен транспортом предшественников из нейроглии. Данные о большей интенсивности обмена фосфолипидов подтверждаются и при исследовании ферментов, катализирующих их превращения. Так, активность CDP-холин-1,2-диглицерид-фосфотрансферазы в нейронах почти в 3 раза выше, чем в нейроглии, а этаноламинтрансферазная активность более чем в 2 раза выше в нейрональных телах [30, 31]. Активность таких ферментов деградации фосфолипидов, как фосфолипаза A_1 , в 8 раз, а фосфолипазы A_2 в 5 раз выше во фракции нервных клеток по сравнению с нейроглией [32]. Обнаруженные различия в метаболизме отдельных фракций фосфолипидов отражают скорее количественные, чем качественные отличия в процессах распада и синтеза последних в нейронах и нейроглии и подтверждают существование единой метаболической системы нейрон—нейроглии на уровне обмена фосфолипидов.

METABOLIC ACTIVITY OF PHOSPHOLIPIDS IN NEURONS AND NEUROGLIA

FLEROV M. A.

Leningrad State University

The metabolic activity of individual phospholipid fractions has been studied at different time intervals (60, 120 and 180 min) after acetate- ^{214}C and (methyl- ^3H) choline injection to rats. It was established that maximal intensity of radioactive carbon incorporation in neurons and neuroglia was in the fractions of phosphatidic acid and phosphoinositides. After injection of (methyl- ^3H)-choline the radioactivity was detected in three phospholipid fractions: lysophosphatidylcholine, phosphatidylcholine and sphingomyelline. It was shown that irrespective of injected radioactive precursors the level of radioactivity in individual phospholipid fractions was higher in neurons than in neuroglia. Apparently, it is due to existence of genetically different systems of phospholipid biosynthesis in neurons and neuroglia.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hyden H. *Nature*, v. 184, p. 433—439, 1959.
2. Hyden H. *The Neuron* (ed. Elsevier), Amsterdam, 1967.
3. Хиден Х., Ланге П.—В кн.: Биохимия и функции нервной системы (под ред. Е. М. Крепса), с. 21—34, Л., Наука, 1967.
4. Rose S. P. R. *Nature*, v. 206, p. 621—622, 1965.
5. Rose S. P. R. *Biochem. J.*, v. 102, p. 33—34, 1967.
6. Freysz L., Bieth R., Judez C., Jacob M., Sensenbranner M. J. *Physiol. (France)*, v. 59, p. 239—245, 1967.
7. Norton W. T., Potusto S. E. *Science*, v. 167, p. 1144—1145, 1970.
8. Blomstrand C., Hamberger A. J. *Neurochem.*, v. 16, p. 1401—1407.
9. Sellinger O. L., Legrand J., Clos J., Ohlsson W. *J. Neurochem.*, v. 23, p. 1137—1144, 1971.
10. Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран, Л., Наука, 1981.
11. Крепс Е. М. Фосфолипиды клеточных мембран нервной системы в развитии животного мира (под ред. Опарина А. И.), Л., Наука, 1967.
12. Флёров М. А. *Вопр. мед. химии*, т. 24, с. 174—180, 1978.
13. Pumprey A. M. *Biochem. J.*, v. 108, p. 38, 1968.
14. Флёров М. А., Зубер В. Л. *Вопр. мед. химии*, т. 17, № 2, с. 211—215, 1971.
15. Freysz L., Bieth R., Mandel P. J. *Physiol. (France)*, v. 58, p. 520—522, 1967.
16. Haesser H., Chapman O., Dawson R. M. C. *Biochim. et biophys. acta*, v. 183, p. 309—331, 1969.
17. Jabusaki K. K., Wells M. A. *Biochemistry*, v. 14, p. 162—166, 1975.
18. Puskin I. S., Martin T. *Biochim. et biophys. acta*, v. 552, p. 53—65, 1979.
19. Flerov M. A. *Abstr. 5th Int. Meet. of Int. Soc. For Neurochem.*, Barcelona, v. 294, p. 377, 1975.
20. Hinsen D. H., Taus L. J. *Physiol.*, v. 268, p. 21—34, 1977.
21. Hingworth, Portman O. *Biochem. J.*, v. 130, p. 557—567, 1972.
22. Harris R. A., Schmidt J., Hitzemann B. A., Hitzemann R. J. *Science*, v. 212, p. 1290—1291, 1981.

23. Putney J. W. Jr. Life Sci., v. 29, p. 1183—1191, 1981.
24. Bradford P. G., Marinetti G. V., Abood L. G., J. Neurochem., v. 41, № 6, p. 1684—1693, 1983.
25. Medzihradsky F., Sellinger O. L., Nandasri P. S., Santlago J. C. J. Neurochem., v. 19, p. 543—545, 1972.
26. Флёров М. А., Толстухина Т. И., Тезисы докладов VI конф. биох. прибалтийских республик, БССР г. Ленинграда. с. 447—448, Зинатне, 1981.
27. Freysz L., Bleth R., Mandel P. J. Neurochem., v. 16, p. 1417—1424, 1969.
28. Freysz L., Lastennet A., Mandel P. J. Neurochem., v. 27, p. 355—360, 1976.
29. Freysz L., Mandel P. J. Neurochem., v. 34, № 2, p. 305—308, 1980.
30. Freysz L., Mandel P. FEBS Lett., v. 40, p. 110—113, 1974.
31. Binaglia L., Roberti R., Francesconsell E., Porcellati G. Lipids, v. 9, p. 738—747, 1974.
32. Woelt H., Jahrreiss R. In: Myelination and demyelination, p. 45—53, N. Y.—London, 1978.

Поступила 28. III 1985

НОВЫЕ КНИГИ

Inositol and Phosphoinositides. Metabolism and Regulation (ed. by I. E. Bleasdale, I. Elchberg and G. Hauser), John Wiley & Sons Ltd, England, 1985.

В книге представлены сведения о современном состоянии и перспективах исследований в области изучения инозитола и фосфоинозитидов. Подробно освещены вопросы, касающиеся метаболизма инозитола и гомеостаза, биосинтеза и деградации фосфоинозитидов, роли фосфоинозитидов и кальция в фосфорилировании белков, метаболизма фосфоинозитидов в нервной системе и т. д.