



УДК 577.352.56:577.115

СОСТАВ ЛИПИДНОЙ ФАЗЫ НЕРВНЫХ ПРОВОДНИКОВ В ПОКОЕ И ИЗМЕНЕНИЕ ЕГО ПРИ ВОЗБУЖДЕНИИ

РЕВИН В. В., КАДИМАЛИЕВ Д. А., ЛНЯСЬКИН Ю. К.,
КОЛЕСНИКОВА В. Н., *КОЛЬС О. Р.

Мордовский госуниверситет им. Н. П. Огарева, г. Саранск,
*Московский госуниверситет им. М. В. Ломоносова, Москва

Изучен индивидуальный состав фосфолипидов и молярное соотношение холестерин/фосфолипиды в сепальном нерве лягушки и нервном стволе кальмара в покое и при проведении ритмического возбуждения, а также после прекращения раздражения. Показано, что изменение количества заряженных фосфолипидов—фосфатидной кислоты и фосфоинозитидов, а также молярное соотношение холестерин/фосфолипиды являются параметрами, тонко реагирующими на изменение функционального состояния нервных проводников.

В последние годы появилось довольно много работ, посвященных изучению роли липидов в функционировании возбудимых мембран. Большинство выводов об активном участии липидов в процессах, протекающих на мембранах, сделано на основании экспериментов, выполненных, во-первых, на модельных системах, главным образом на бислойных липидных мембранах и липосомах; во-вторых, на выделенных из клеток фракциях—синапсоматах, саркоплазматическом ретикулуме, плазматических везикулах и др.; в-третьих, непосредственно на возбудимых образованиях. В последнем случае обычно исследовали фосфолипидный состав мембран и сравнивали данные, полученные на организмах, находящихся на разных ступенях эволюционного развития [1—3]. При этом оставался, по существу, в тени принципиальный вопрос: происходят ли изменения в липидной фазе возбудимых мембран при переходе от покоя к возбуждению? Между тем обнаружение различий в индивидуальном составе липидов нервных проводников в покое и при возбуждении свидетельствовало бы о возможном участии липидов в функционировании возбудимых мембран. В литературе на этот счет имеются лишь отдельные сведения [4—6].

Для выяснения вопроса об участии липидной фазы нервных про-

проводников в процессе проведения возбуждения мы исследовали индивидуальный фосфолипидный состав нервов в покое и при возбуждении и изменения параметра, характеризующего состояние мембраны—молярного соотношения холестерина/фосфолипиды.

Материалы и методы

В работе использовали седлищные нервы лягушки и гигантские аксоны кальмара (кальмара Бертрапа). Изолированные нервные проводники раздражали во влажной камере от стимулятора ЭСЛ-2. Потенциалы действия наблюдали на экране катодного осциллографа С1-48 или С1-65. Нервы лягушки раздражали с частотой 80 имп/с, а нервы кальмара с частотой 30 имп/с. Параметры раздражающих электрических импульсов: для лягушки амплитуда—450 мВ, длительность—0,3 мс; для кальмара амплитуда—750 мВ, длительность—0,3 мс. Нераздражившиеся нервы (нервы в покое) выдерживали во влажной камере столько же времени и при той же температуре, как и при раздражении. Липиды из нервных стволов экстрагировали по Bligh, Dyer [7]. Для разделения индивидуальных фосфолипидов (ФЛ) использовали метод двумерной микротонкослойной хроматографии в системе Rouser на пластинках фирмы Merck и КСК [8, 9].

Для идентификации ФЛ использовали общепринятые методы и соответствующие свидетели [10, 11]. Определение количества фосфора проводили по методу Vaskovsky и соавт. [12]. Концентрацию холестерина измеряли по модифицированному методу Courthaine и соавт. [13]. Для количественной оценки индивидуального состава ФЛ суммарное количество ФЛ принимали за 100% и рассчитывали долю каждой фракции.

Результаты и обсуждение

В седлищном нерве лягушки в состоянии покоя обнаружено и идентифицировано 8 индивидуальных ФЛ: фосфатидная кислота (ФК), фосфатидилсерин (ФС), фосфоинозитид (ФИ), лизофосфатидилхолин (ЛФХ), сфингомиелин (СФМ), фосфатидилэтанолламин (ФЭА), фосфатидилхолин (ФХ) и кардиолипин (КЛ) (табл. 1).

Было установлено, что при покое в нерве лягушки ФК, КЛ и ЛФХ содержались в следовых количествах. Наибольшая доля ФЛ от их общего количества приходилась на ФХ и ФЭА. Из общего количества липидов количество всех холинсодержащих ФЛ составляло 45%, а аминоксодержащих—51%. Раздражение нервов лягушки с частотой 80 имп/с в течение 1,5 мин приводило к снижению фракции ФИ на 20%. Процентное содержание остальных фракций практически не менялось (табл. 1).

Приведенные данные были получены на нерве лягушки, включающем тысячи нервных волокон. Поэтому здесь можно говорить только об интегральной характеристике исследуемых параметров. Чтобы выяснить, имеют ли место изменения фосфолипидного состава в одиночных возбудимых образованиях, были поставлены опыты на гигантских аксонах кальмара.

Было обнаружено, что в состав ФЛ гигантских аксонов входят 10 индивидуальных ФЛ: ФК, ФС, ФИ, СФМ, ФХ, ФЭА, КЛ, а также лизофосфатидилхолин (ЛФХ), лизофосфатидилэтанолламин (ЛФЭА) и церамидэтилфосфонат (ЦЭФ).

Таблица 1

Содержание индивидуальных фосфолипидов в седалищном нерве лягушки
(в % от общего количества фосфолипидов)

Условия опыта	Фракции фосфолипидов							
	ФК	ФС	ФИ	ЛФХ	СФМ	ФХ	ФЭА	КЛ
Покой Стимуляция (80 имп/с, 1,5 мин)	следы	$13,25 \pm 1,20$	$3,42 \pm 0,22$	следы	$10,68 \pm 0,36$	$37,60 \pm 2,80$	$35,04 \pm 2,13$	следы
	следы	$13,36 \pm 0,10$	$2,76 \pm 0,20^*$	следы	$10,14 \pm 0,75$	$38,70 \pm 2,80$	$35,00 \pm 2,30$	следы

Примечание. * $p < 0,05$; в остальных случаях изменения недостоверны.

Таблица 2

Содержание индивидуальных фосфолипидов в нервном стволе кальмара
(в % от общего количества фосфолипидов)

Условия опыта	Фракции фосфолипидов								
	ФК	ФС	ФИ	ЛФХ	ЛФЭА+ СМФ	ЦАЭФ	ФХ	ФЭА	КЛ
Покой	1,57±0,16	5,95±0,23	3,31±0,35	1,70±0,13	7,11±0,54	4,61±0,22	47,25±0,83	27,01±0,45	1,30±0,25
Стимуляция (30 имп/с, 1,5 мин)	1,07±0,12*	5,60±0,31	3,73±0,40	2,14±0,60	6,17±0,22*	4,75±0,35	46,96±0,77	27,21±0,47	1,97±0,20*
Через 1,5 мин после прекращения стимуляции	1,43±0,27	6,21±0,41	3,50±0,37	1,93±0,36	6,81±0,41	4,33±0,55	46,57±0,65	27,10±0,74	2,02±0,20

Примечание. * $p < 0,05$; в остальных случаях изменения недостоверные

При покое наибольшая доля от всех ФЛ приходилась на ФХ и ФЭА. В наименьшем количестве были представлены КЛ, ЛФХ и ФК. В аксоне кальмара был выявлен ФЛ, который ранее из аксона не выделяли—ЦАЭФ; его количество составляло 4,6%. Предполагается, что его функция, как и функция СФМ, изоляторная [2]. Общее содержание ФЛ, имеющих в своем составе аминогруппы, в аксонах кальмара равнялось 40%, а ФЛ, включающих холин—50%. В данном случае картина оказалась обратной той, которую наблюдали в случае нерва лягушки: у кальмара доля аминоксодержащих ФЛ в нерве ниже, чем холинсодержащих (табл. 2).

При проведении возбуждения достоверные изменения были обнаружены в трех фракциях. Содержание ФК уменьшалось на 32%, а содержание ЛФЭА и СФМ—на 14%. Сфингомиелин является весьма стабильным ФЛ и обновляется очень медленно [2]. Можно полагать, что изменения, обнаруженные во фракциях ЛФЭА и СФМ, происходили лишь за счет лизоформы ФЭА. Затем заметно менялось количество КЛ—превышение над уровнем покоя составляло 46%. Достоверных изменений в индивидуальном составе остальных ФЛ фракций при возбуждении не было выявлено.

Через 1,5 мин после прекращения ритмической стимуляции содержание ФК и фракции ЛФЭА+СФМ в нервном стволе кальмара возвращалось к уровню покоя, а содержание КЛ продолжало незначительно нарастать (табл. 2).

Вопрос о значении полярной части липидов широко обсуждается в литературе. В ряде работ показано, что состояние липидов связано с их химическим составом и зарядом полярной группы [15, 16]. Обнаружение изменений в индивидуальном составе основных ФЛ фракций при проведении возбуждения указало бы на один из возможных путей регуляции работы нонтранспортирующих систем. Но в наших условиях опыта при кратковременной стимуляции, когда по нерву проходило лишь небольшое число импульсов, существенных изменений в количественном распределении основных индивидуальных ФЛ не было выявлено. Очевидно, гидрофильная часть этих ФЛ достаточно стабильна [17]. Возможно, что функциональную роль выполняют ФК и ФИ; об этом свидетельствуют и литературные данные [18, 19].

Очень важным параметром, регулирующим ионную проницаемость мембран, является количество холестерина и, соответственно, молярное соотношение холестерин/ФЛ в мембране [20, 21]. Поэтому мы попытались исследовать также изменения соотношения холестерин/ФЛ в нервных проводниках при возбуждении.

Было установлено, что в нерве лягушки в состоянии покоя содержание холестерина составляло 21%, а ФЛ—57% от общего количества липидов. Молярное соотношение холестерин/ФЛ равнялось 0,70. При стимуляции нервов с частотой 80 имп/с в течение 1,5 мин оно увеличилось до 0,74; при продлении стимуляции до 5 мин соотношение хо-

лестерин/ФЛ возрастало до 0,76. Через 5 мин после прекращения ритмической стимуляции величина отношения составляла 0,74 (табл. 3).

Аналогичная серия опытов была поставлена на нервных стволах кальмара. В гигантских аксонах кальмара при покое содержалось около 20% холестерина и 75% ФЛ. Молярное соотношение холестерина/ФЛ равнялось 0,50. Эти результаты находятся в соответствии с полученными ранее литературными данными [6]. При стимуляции нервных стволов кальмара с частотой 30 имп/с в течение 1,5 мин величина молярного соотношения холестерина/ФЛ становилась равной 0,43. Через 1,5 мин после прекращения стимуляции содержание холестерина и величина отношения холестерина/ФЛ приближалась к уровню покоя (табл. 3).

Таблица 3:

Содержание холестерина, ФЛ и величина соотношения холестерин/ФЛ* в нервных стволах лягушки и кальмара

Условия опыта	Исследуемый параметр		
	Содержание холестерина (мкмоль/мг липида)	Содержание ФЛ (мкмоль/мг липида)	Молярное соотношение холестерин/ФЛ
Л я г у ш к а			
Покой	$0,54 \pm 0,01$	$0,77 \pm 0,04$	$0,70 \pm 0,015$
Стимуляция (80 имп/с, 1,5 мин)	$0,59 \pm 0,01$	$0,80 \pm 0,02$	$0,74 \pm 0,006$ ($p < 0,02$)
Стимуляция (80 имп/с, 5 мин)	$0,60 \pm 0,02$	$0,79 \pm 0,02$	$0,76 \pm 0,01$ ($p < 0,02$)
Через 5 мин после прекращения стимуляции	$0,58 \pm 0,02$	$0,78 \pm 0,03$	$0,74 \pm 0,01$ ($p < 0,05$)
К а л ь м а р			
Покой	$0,50 \pm 0,017$	$1,00 \pm 0,05$	$0,50 \pm 0,02$
Стимуляция (30 имп/с, 1,5 мин)	$0,44 \pm 0,02$	$1,02 \pm 0,04$	$0,43 \pm 0,016$ ($p < 0,02$)
Через 1,5 мин после прекращения стимуляции	$0,51 \pm 0,02$	$1,06 \pm 0,03$	$0,48 \pm 0,01$ ($p < 0,05$)

Примечание. * Величину M_r принимали за 386,7; общих ФЛ—750 Д

Сам факт, что после прекращения раздражения содержание холестерина возвращалось к уровню покоя, указывает на существование в нерве механизмов, регулирующих соотношение холестерина и ФЛ.

Учитывая данные о том, что холестерин влияет на активность Na^+ , K^+ -АТФазы и Ca^{2+} -АТФазы и на пассивный транспорт ионов [22—24], можно предположить, что изменение величины отношения холестерина/ФЛ в нервных проводниках при переходе от состояния покоя к возбуждению регулирует системы, ответственные за транспорт ионов, путем поддержания определенного уровня микровязкости. Уменьшение доли холестерина в аксоне свидетельствует, по-видимому, о том, что мембрана становится более жидкой. Это может явиться

фактором, создающим оптимальные условия для работы транспортных АТФаз [25].

Пока еще трудно сказать, какие системы ответственны за изменения молярного соотношения холестерина/ФЛ в нерве лягушки и аксоне кальмара. На данном этапе работы обнаружено, что индивидуальный состав ФЛ в нервных стволах лягушки и кальмара меняется при возбуждении по-разному. Так, в нерве лягушки достоверно сдвигалось (снижалось на 20%) только содержание ФИ; в нервном стволе кальмара достоверно изменялись три фракции—снижалось, соответственно, на 32 и 14% содержание ФК и ЛФЭА+СФМ и возрастало на 46% содержание КЛ. Разнонаправлены были и изменения молярного соотношения холестерина/ФЛ: в нерве лягушки при возбуждении величина этого отношения возрастала, а в нервном стволе кальмара—снижалась.

Полученные результаты позволяют предполагать, что участие ФЛ в процессе распространения ритмического возбуждения в миелиновых и немиелиновых нервных проводниках реализуется различно. Вероятно, наряду с изменениями количества индивидуальных ФЛ, существенным фактором, регулирующим состояние нонтранспортирующих систем в возбудимых мембранах, является и молярное соотношение холестерина/ФЛ.

COMPOSITION OF NERVE CONDUCTORS LIPID PHASE AT REST AND AT STIMULATION

REVIN V. V., KADYMALIEV D. A., LIYASKIN Y. K., KOLESNIKOVA V. N., KOLS O. R.

Mordovian ASSR State University, Saransk, M. V. Lomonosov State University, Moscow

Individual composition of phospholipids and molar cholesterol/phospholipid ratio have been studied in frog n. ischiaticus and calmar nervous trunk at rest, at rhythmical stimulation and after it. It has been demonstrated that changes in the amount of charged phospholipids—phosphatidic acid and diphosphoinositides—and in the molar cholesterol/phospholipid ratio reflect changes in the functional state of nervous conductors.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Антонов В. Ф. Липиды и ионная проницаемость мембран. М., Наука, 1982.
2. Кренс Е. М. Липиды клеточных мембран. Л., Наука, 1981.
3. Boldyrev A. A. Stud. biophys., v. 84, № 3, p. 153—160, 1981.
4. Gould R. M., Pant H., Calner H., Tytell M. J. Neurochem., v. 40, № 5, p. 1293—1299, 1983.
5. Brunetti M., Guittilta A., Porcellatti G. J. Neurochem., v. 32, p. 319—324, 1979.
6. Zambrano F., Cellino M., Canesso-Fischer M. J. Membrane Biol., v. 6, p. 289—303, 1971.
7. Bligh E. G., Dyer W. J. Can. J. Biochem. Physiol., v. 37, p. 911—917, 1959.
8. Svetashev V. I., Vaskovsky V. E. J. Chromatogr., v. 67, № 2, p. 376—378, 1972.

9. Rouser G., Kritchevsky G., Yamamoto A.—In: *Lipid Chromatographic analysis*, v. 1, p. 99—162, Dekker Inc., N. Y., 1967.
10. Beiss U. J. *Chromatogr.*, v. 13, № 1, p. 104—110, 1964.
11. Marinetti G. V., *New Biochemical Separations*, D. van Nostrand, Princeton; v. 7, p. 339—343, N. J., 1964. †
12. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin I. J. *Chromatogr.*, v. 114, p. 129—141, 1975.
13. Courhaine A. J., Miller W. H., Stein D. B. *J. Clin. Chem.*, v. 5, p. 609—612, 1959.
14. Костецкий Э. Я. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 18, № 1, с. 35—43, 1982.
15. Hinz J., Sturtevant J. J. *Biol. Chem.*, v. 247, p. 6071—6075, 1972.
16. Ladbroke B. D., Chapman D. *Chem. Phys. Lipids*, v. 3, p. 304—367, 1969.
17. Четвериков Д. А.—В кн.: Успехи нейробиохимии, Л., Наука, с. 73—82, 1974.
18. Ohsako S., Degushi T. *J. Biol. Chem.*, v. 21, p. 10945—10948, 1981.
19. Mitchell R. *Nature*, v. 296, № 5857, p. 492—493, 1982.
20. Demel R. B., Bruckdorfer K. R., Van Deenen L. L. *Biochim. et biophys. acta*, v. 255, p. 321—352, 1972.
21. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А., Коган Э. М. Холестериноз, М., Медицина, 1983.
22. Claret M., Garay R., Glraud F. *J. Physiol.*, v. 274, p. 247—263, 1978.
23. Papahadjopoulos D., Kimelberg H. K. *Progr. Surface Sci.*, v. 4, p. 141—232, 1973.
24. Ануховская Л. И., Ивашкевич С. П. *Вопр. мед. химии*, т. 25, с. 548—554, 1979.
25. Jackson B. L., Gotto A. M.—In: *Atherosclerosis Review* (ed. by R. Paoletti, A. M. Gotto) p. 1—21, N. Y., Raven Press, 1976.

Поступила 20. 11 1985

НОВЫЕ КНИГИ

Molecular Mechanisms of Ischemic Brain Damage
(ed. by K. K. Kogure, K. A. Hossman, B. K. Siesjö and F. A. Welsh),
Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985.

Книга посвящена механизмам ишемического повреждения различных структур мозга.

В книге сосредоточено внимание на широко распространенном, но мало понятном феномене их избирательной ранимости. С целью попытаться объяснить это явление подробно освещается изменение при ишемии метаболизма возбуждающих нейротрансмиттеров, кальция, H^+ , а также таких важных макромолекул, как белки и липиды.