

Академик АН АрмССР Г. Х. БУНЯТЯН, К. Г. МАНУКЯН

О ПРОТЕОЛИПИДАХ БЕЛОГО ВЕЩЕСТВА РАЗНЫХ ОТДЕЛОВ ГОЛОВНОГО И СПИННОГО МОЗГА И СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА СОБАКИ

Протеолипиды (ПЛ), выделенные впервые в ⁽¹⁾, являются белково-липидными комплексами, растворимыми в органических растворителях. Они особенно характерны для белого вещества головного мозга, где составляют 40—60% общего миелинового белка ^(2,3). Долгое время оставалось неясным, чем обусловлено снижение содержания протеолипидного белка в кранио-каудальном направлении ⁽⁴⁾ и крайне низкое его содержание в периферическом нерве ⁽⁵⁾. Связано ли это с уменьшением растворимости ПЛ, трудностями их извлечения, или высокое содержание этих комплексов, а возможно каких-то определенных их фракций, характерно именно для белого вещества головного мозга и его миелина. Все проведенные до сих пор в этом направлении исследования касались только белкового компонента ПЛ.

Целью настоящей работы являлось выделить ПЛ из белого вещества больших полушарий (*corona radiata*, *centrum ovale*), продолговатого мозга, а также белого вещества спинного мозга, шейного (1—8 сегменты), грудного (9—21 сегменты), пояснично-крестцового (22—31 сегменты) отделов и седалищного нерва собаки и изучить содержание этих комплексов, некоторые их свойства и фосфолипидный состав. Мы нашли более целесообразным не подвергать белое вещество субклеточному фракционированию. Известно, что в результате удаления некоторых ионов при выделении субклеточных частиц, в частности миелина, растворимость белков нервной ткани меняется, и многие из них приобретают способность растворяться в хлороформ-метаноле ⁽⁶⁾.

Протеолипиды выделяли методом эмульгирования — центрифугирования ⁽⁷⁾. Очищенные ПЛ растворяли в смеси хлороформ — метанол — вода (2:1:0,2). Определяли оптическую плотность растворов при длине волны 278 мк, затем их упаривали. К осадкам еще 7—8 раз добавляли влажную смесь хлороформа с метанолом и каждый раз упаривали досуха для разрыва связей между липидами и белками. Липиды экстрагировали нейтральной и подкисленной HCl до 0,04 N хлороформ-метаноловой (2:1) смесью. Для разделения фосфолипидов применяли метод восходящей хроматографии на бумаге, пропитанной кремневой кислотой ⁽⁸⁾.

Исследования показали, что содержание ПЛ снижается в кранио-каудальном направлении, тогда как общее содержание липидов, наоборот, в спинном мозге несколько выше, чем в головном (табл. 1). Содержание очищенных ПЛ в белом веществе больших полушарий в 1,4 раз выше, чем в белом веществе продолговатого мозга, в 1,6 раз выше, чем в белом веществе спинного мозга, и в 12,4 раза выше, чем в седалищном нерве. Содержание ПЛ в разных отделах спинного мозга примерно одинаково. Нами не обнаружено снижения концентрации ПЛ в передне-боковых столбах спинного мозга в рострально-каудальном направлении, которое наблюдалось у Амадуччи в отношении протеолипидного белка.

Таблица 1

Содержание ПЛ в белом веществе разных отделов головного и спинного мозга и в седалищном нерве собаки (среднее из 10 — 17 опытов)

Отдел нервной системы	Общие липиды, мг/г влажной ткани	Очищенные ПЛ		
		содержание, мг/г влажной ткани	$E_{1\%}^{1\text{см}}$ (λ 278 м μ)	фосфолипиды, %
Большие полушария	222,7	22,00	11,82	14,00
Продолговатый мозг	218,2	15,92	12,36	13,94
Спинной мозг				
Шейный отдел	257,1	13,95	11,61	13,55
Грудной отдел	256,6	13,55	11,68	13,50
Пояснично-крестцовый отдел	233,8	14,38	10,59	13,22
Седалищный нерв	163,3	1,78	4,88	19,10

Таблица 2

Содержание отдельных фосфолипидов, связанных с очищенными ПЛ белого вещества разных отделов нервной системы ($\mu\text{г P}$ на 1 г влажной ткани)

Фосфолипиды	Белое вещество *					Седалищный нерв (14)
	большие полушария (10)	продолговатый мозг (9)	отделы спинного мозга			
			шейный (10)	грудной (12)	пояснично-крестцовый (14)	
Линия старта	7,61	5,83	7,49	6,89	5,18	0,59
Фосфолипиды, сорбированные на сульфатиде	4,92	3,52	2,85	3,06	3,06	0,45
Монофосфоинозитид	8,15	6,27	4,49	4,44	5,08	0,58
Сфингомиелин	3,11	2,78	2,50	2,65	2,99	5,55
Неидентифицированный	2,62	2,34	1,39	1,40	1,52	—
Лецитин	2,84	2,54	2,76	2,07	2,33	1,64
Серинфосфатид	63,20	41,18	33,13	32,52	34,65	3,43
Этаноламинфосфатид	6,99	5,68	5,81	5,60	6,07	1,12
Политрицерофосфатиды	16,74	13,27	10,28	10,46	9,98	0,28
Фосфатидная кислота	7,08	5,39	5,08	4,25	5,30	—
Сумма	123,26	88,80	75,78	73,34	76,16	13,62

* В скобках — число опытов.

Поглощение при длине волны 278 м μ , обусловленное высоким содержанием триптофана в белках ПЛ, примерно одинаково для очищенных ПЛ, выделенных из разных отделов белого вещества головного и спинного мозга. В седалищном нерве коэффициент оптической плотности значительно ниже (табл. 1).

Концентрация фосфолипидов, связанных с очищенными ПЛ, снижается в кранио-каудальном направлении примерно в такой же степени, как и самих ПЛ. В белом веществе больших полушарий содержание фосфолипидов ($P \times 25$), связанных с ПЛ, составляет 3,08 мг/г влажной ткани, в продолговатом мозгу 2,22 мг/г, в шейном, грудном и пояснично-крестцовом отделах спинного мозга 1,89, 1,83 и 1,90 мг/г соответственно и в седалищном нерве 0,34 мг/г. Процентное содержание фосфолипидов в очищенных ПЛ белого вещества разных отделов головного и спинного мозга почти одинаково, в седалищном нерве оно выше (табл. 1), т. е. очищенные ПЛ седалищного нерва богаче фосфолипидами.

Хроматограммы фосфолипидов, выделенных из очищенных ПЛ белого вещества разных отделов головного и спинного мозга, были очень сходны. Как было показано нами (*), с ПЛ белого вещества мозга связаны в основном кислые фосфатиды: монофосфоинозитид, неидентифицированный кислый фосфолипид, серинфосфатид, этаноламинфосфатид, полиглицерофосфатиды и фосфатидная кислота. Нейтральные фосфолипиды: сфингомиелин и лецитин — обнаруживались в небольших и варьирующих количествах. На хроматограммах фосфолипидов, выделенных из ПЛ седалищного нерва, преобладание кислых фосфатидов отсутствовало. Отчетливо выделялись пятна нейтральных фосфолипидов и особенно сфингомиелина. Пятна, соответствующие полиглицерофосфатидам, отсутствовали или были еле заметны.

Необходимо отметить, что на хроматограммах липидных экстрактов ПЛ всех изученных отделов нервной системы было отчетливо выражено пятно сульфатида (¹⁰).

Хотя содержание фосфора липидов, связанных с очищенными ПЛ, снижается в кранио-каудальном направлении, ПЛ разных отделов белого вещества головного и спинного мозга очень сходны по фосфолипидному составу (табл. 2) и процентным соотношениям фосфолипидов. Основным преобладающим фосфатидом во всех изученных отделах белого вещества мозга является серинфосфатид, составляющий 51,3% фосфолипидов, связанных с ПЛ больших полушарий, и 44—46% в фосфолипидах ПЛ других отделов, затем следуют полиглицерофосфатиды, составляющие 13—15%, монофосфоинозитид, этаноламинфосфатид и фосфатидная кислота, составляющие по 5,7—8,0%.

В отличие от белого вещества разных отделов мозга, в ПЛ седалищного нерва основным фосфатидом является сфингомиелин, составляющий 40,8% всех фосфолипидов, затем уже серинфосфатид — 25,2% лецитин — 12%, этаноламинфосфатид — 8,2% и монофосфоинозитид — 4,3%. Полиглицерофосфатидов в ПЛ седалищного нерва мало. Следует отметить, что этих фосфатидов в нерве вообще гораздо меньше, чем в белом веществе.

По предположению Фолча (¹¹), основными фосфатидами, наиболее прочно связанными с белком ПЛ, являются полифосфоинозитиды, в частности трифосфоинозитид. В связи с этим мы попытались разделить липидные экстракты ПЛ на бумаге, пропитанной формальдегидом (¹²), с целью выделения ди- и трифосфоинозитидов. Хроматографическому разделению подвергали экстракты липидов, выделенных подкисленной хлороформ-метаноловой смесью из очищенных ПЛ белого вещества и из осажденных с помощью трикалийцитрата ПЛ тех же отделов (¹³). Добавление водного раствора трикалийцитрата к хлороформ-метаноловым растворам ПЛ приводит к расщеплению этих комплексов. 80% протеолипидного белка выпадает в осадок вместе с наиболее прочно связанными с ним липидами. На хроматограммах подкисленных экстрактов как очищенных, так и осажденных трикалийцитратом ПЛ всех изученных отделов белого вещества мозга обнаруживались отчетливые пятна, соответствующие по положению *R_f*, форме и окраске родамином 6Ж пятнам три- и дифосфоинозитидов, выделенных из фракции фосфатидопептидов, где в основном и сконцентрированы эти липиды. На хроматограммах липидных экстрактов ПЛ седалищного нерва полифосфоинозитиды не выявлялись.

В табл. 3 приведены данные по содержанию ди- и трифосфоинозитидов, связанных с очищенными и осажденными трикалийцитратом ПЛ белого вещества разных отделов мозга. Поскольку от момента забоя животного до полного взятия мозга проходило довольно много времени, величины содержания полифосфоинозитидов, конечно, занижены. Тем не менее из табл. 3 видно, что с ПЛ связан в основном трифосфоинозитид, составляющий 5—10% от суммы фосфолипидов, связанных с очищенными ПЛ белого вещества разных отделов головного и спинного мозга. Дифосфоино-

зита в ПЛ мало, особенно во фракции, осажженной добавлением трикалийдифосфата. Таким образом, наши исследования с выделением цельных, неразрушенных полифосфоинозитидов, а не продуктов их гидролиза подтверждают данные Фолча о том, что в состав ПЛ белого вещества мозга

Таблица 3

Содержание полифосфоинозитидов, связанных с ПЛ белого вещества разных отделов нервной системы (в $\mu\text{г Р}$ на 1 г влажной ткани)

Отдел нервной системы	Очищенные ПЛ		ПЛ, осажженные трикалийдифосфатом	
	дифосфоинозитид	трифосфоинозитид	дифосфоинозитид	трифосфоинозитид
Большие полушария	1,80	7,34	0,67	6,08
Продолговатый мозг	1,21	4,86	0,49	3,86
Спинальный мозг				
Шейный отдел	1,11	7,41	0,26	5,98
Грудной отдел	1,14	5,70	0,28	5,04
Пояснично-крестцовый отдел	1,09	6,32	0,24	3,40

входит трифосфоинозитид, прочно связанный с белками этих комплексов.

Результаты проведенных исследований показывают, что, хотя содержание ПЛ уменьшается в кранио-каудальном направлении, коэффициент оптической плотности, процент фосфолипидов, их состав весьма сходны в ПЛ белого вещества разных отделов головного и спинного мозга. По-видимому, для белого вещества этих отделов нервной системы характерны одни и те же протеолипидные комплексы.

В седалищном нерве содержание ПЛ весьма низкое. По сравнению с ПЛ белого вещества головного и спинного мозга, они характеризуются низким коэффициентом оптической плотности, более высоким содержанием фосфатидов и иным фосфолипидным составом. Вероятно, в состав седалищного нерва входят какие-то другие фракции ПЛ или другие липофильные белково-липидные комплексы.

Различия между белым веществом разных отделов нервной системы, по-видимому, обусловлены в основном различиями в химическом составе их миелина. Об этом свидетельствуют последние данные⁽³⁾ о качественных отличиях белков миелина белого вещества разных отделов нервной системы и, в частности, об уменьшении протеолипидного белка в миелине в каудальном направлении и замещении его другими белками.

Институт биохимии
Академии наук АрмССР
Ереван

Поступило
5 I 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. Folch, M. Lees, J. Biol. Chem., 191, 2, 807 (1951). ² L. Autilio, Federat. Proc., 25, 2, 764 (1966). ³ E. Mehl, F. Wolfgram, J. Neurochem., 16, 7, 1091 (1969). ⁴ L. Amaducci, J. Neurochem., 9, 2, 153 (1962). ⁵ J. Folch, M. Lees, S. Carr, Exp. Cell Res., Suppl. 5, 58 (1958). ⁶ M. B. Lees, J. Neurochem., 15, 3, 153 (1968). ⁷ J. Folch-Pi, G. R. Webster, M. Lees, Federat. Proc., 18, 1, 228 (1959). ⁸ А. А. Смирнов, Е. В. Чирковская, К. Г. Манукян, Биохимия, 26, в. 6, 1027 (1961). ⁹ К. Г. Манукян, Вопросы биохимии мозга, 3, Ереван, 1967, стр. 177. ¹⁰ Е. М. Крепс, М. В. Патрикеева и др., Журн. эволюцион. биохим. и физiol., 5, 4, 360 (1969). ¹¹ J. Folch-Pi, Federat. Proc., 23, 3, 630 (1964). ¹² М. А. Флеров, А. Г. Виноградов, Вопр. мед. хим., 15, 2, 196 (1969). ¹³ E. T. Pritchard, J. Folch-Pi, Biochim. et biophys. acta, 70, 5, 481 (1963).