

11. *Protein measurement with the Folin phenol reagent* / O. H. Lowry, N. J. Rosenhrough, A. L. Farr, R. J. Randal // *J. Biol. Chem.*—1951.—193, N 1.—P. 265—275.
12. *Chance B., Williams G. R.* The respiratory chain and oxidative phosphorylation // *Adv. Enzymol.*—1956.—17, N 1.—P. 65—134.
13. *Flatmark T., Pedersen J. I.* Studies of the energy state of isolated brown adipose tissue mitochondria. Effect of adenine nucleotides and oligomycin on the generation and dissipation of the «energy potential» // *Biochem. et biophys. acta.*—1973.—292, N 1.—P. 64—72.
14. *Ахмеров Р. Н.* О нефосфорилирующем (термогенном) окислении янтарной кислоты в тканях теплокровного и холоднокровного организма // *Узб. биол. журн.*—1981.—№ 2.—С. 24—27.
15. *Ахмеров Р. Н.* Реакции энергообеспечения и термогенеза в тканях зрело- и незрелорождающихся // *Онтогенез.*—1983.—14, № 2.—С. 195—197.
16. *Ахмеров Р. Н.* Тканевое окисление и его митохондриальное нефосфорилирующее звено // *Узб. биол. журн.*—1984.—№ 4.—С. 20—22.
17. *Akhmerov R. N.* Qualitative difference in mitochondria of endothermic and ectothermic animals // *FEBS Letters.*—1966.—198, N 2.—P. 251—255.
18. *The possible proton translocating activity of the mitochondrial uncoupling protein of brown adipose: reconstitution studies in liposomes* // F. Bouilland, D. Ricquier, T. Gulik-Krynski, C. M. Gary-Bobo // *Ibid.*—1983.—164, N 2.—P. 272—276.
19. *Zalman L. S., Nikado H., Kedawa I.* Mitochondrial outer membrane contains a proton producing nonspecific diffusion channels // *J. Biol. Chem.*—1980.—255, N 5.—P. 1771—1774.
20. *Мирзабеков Т. А., Ахмеров Р. Н.* Каналообразующий мембранный белок (32 кД) из митохондрий бурого жира // *Биофизика.*—1987.—32, вып. 2.—С. 345—346.
21. *Mitchell P., Moyle J.* Estimation of membrane potential and pH difference across the cristal membrane of rat liver mitochondria // *Eur. J. Biochem.*—1969.—7, N 4.—P. 471—484.
22. *Николс Д. Д.* Биоэнергетика. Введение в хемоосмотическую теорию.—М.: Мир, 1985.—190 с.
23. *Fain J. N., Lonen S. C., Czech M. P.* Oligomycin effects on lipolysis and the oxidative metabolism of brown fat cells // *Biochem. et biophys. acta.*—1970.—197, N 1.—P. 40—48.
24. *Williamson J. R.* Control of energy metabolism in hamster brown adipose tissue // *J. Biol. Chem.*—1970.—245, N 8.—P. 2043—2050.

Ин-т физиологии АН УзССР, Ташкент

Получено 15.04.88.

УДК 577.115.087:616—006.487

Н. М. ГУЛАЯ, В. Е. ВАСЬКОВСКИЙ, М. В. ВЫСОЦКИЙ,  
Г. Л. ВОЛКОВ, Н. Н. ГОВСЕЕВА, И. П. АРТЕМЕНКО

### ОБНАРУЖЕНИЕ N-АЦИЛЭТАНОЛАМИНОВЫХ ФОСФОЛИПИДОВ В КЛЕТКАХ НЕЙРОБЛАСТОМЫ C1300

В клетках мышечной нейробластомы C1300 обнаружены фосфолипиды с высокой хроматографической подвижностью, один из которых на основании данных последовательностей химической деградации идентифицирован как N-ацилфосфатидилэтаноламин. Вероятно, он служит предшественником физиологически активных N-ацилэтаноламинов. Показано, что N-пальмитоил- и N-стеароилэтаноламины тормозят транспорт ионов через быстрые натриевые каналы, активированные вератрином, а также снимают эффект накопления лизофосфолипидов в клетках под влиянием вератрина.

Культура клеток нейробластомы широко используется для решения многих вопросов нейрохимии, так как дифференцированные клетки нейробластомы обладают практически всеми свойствами зрелых нейронов [1]. Ранее мы исследовали состав главных липидов нейробластомы C1300 [2] и показали, что при изменении состава липидов меняются функциональные свойства клеток нейробластомы [3], в частности модифицируется функция быстрых натриевых каналов. В ходе дальнейших исследований мы обнаружили, что наряду с главными фосфолипидами нейробластома содержит в небольших количествах фосфолипиды с высокой хроматографической подвижностью, которые до сих пор не были описаны для клеток этого типа. Настоящая работа посвящена иден-

тификации этих фосфолипидов, а также выяснению возможной физиологической роли N-ацилфосфатидилэтанолламинов, которые были обнаружены рядом авторов в ишемических и дегенерирующих тканях животных. При этом было высказано предположение, что накопление таких фосфолипидов связано с последующим образованием из них N-ацилэтанолламинов — фармакологически активных соединений, обладающих противовоспалительным действием [4, 5].

В настоящее время опубликовано много работ, в которых показано, что N-ацилфосфатидилэтанолламины — составные компоненты нормальных тканей позвоночных [6, 7], при этом наибольшее их количество обнаруживается в мозге. Показано также, что в ЦНС имеются ферментативные системы, деградирующие эти фосфолипиды. Фосфодиэстераза типа фосфолипазы Д катализирует гидролиз N-ацилфосфатидилэтанолламинов с образованием N-ацилэтанолламинов.

### Материалы и методы

Опыты проводили на недифференцированных и дифференцированных в присутствии 5'-бромдезоксиридина ( $4 \cdot 10^{-5}$  М) клетках мышинной нейробластомы С1300. Условия культивирования и дифференцировки описаны ранее [2, 8]. Липиды экстрагировали по методу Блайя и Даера [9]. Фосфолипиды анализировали методом двумерной микро-ТСХ [10, 11] с использованием для их обнаружения молибдатного реагента [12] и реактива на основе малахитового зеленого [13]. Для хроматографии N-ацилэтанолламинов и N-ацилфосфатидилэтанолламинов использовали системы — диэтиловый эфир : ацетон : гексан : ледяная уксусная кислота (70 : 20 : 10 : 1) [4] и хлороформ : метанол : бензол : 7 н. водный аммиак (60 : 15 : 10 : 1) соответственно. Количественный анализ фосфолипидов проводили, как описано ранее [12]. N-ацилфосфатидилэтанолламины идентифицировали методом хроматографии и химической деградации с использованием свидетелей [6].

Гидролитические процедуры выполняли следующим образом: мягкое щелочное омыление — при помощи метиламинового реагента [14], плазмалогены разрушали 10 %-ной соляной кислотой в метаноле или прямо на пластинках ТСХ [15]. Метанолиз проводили при помощи 10 %-ного раствора хлористого ацетила в метаноле при 130 °С в запаянной ампуле в течение 4 ч. Полярные продукты гидролиза хроматографировали в системе растворителей метанол — вода — 7н. водный аммиак (6 : 3 : 1). Метилловые эфиры жирных кислот хроматографировали в толуоле [6].

В качестве свидетелей использовали либо синтетические, либо выделенные из природных источников фосфолипиды. В системе растворителей для анализа малополярных фосфолипидов (в описываемой аммиачной системе) средние  $R_f$  стандартов фосфолипидов были: для бис-фосфатидной кислоты — 0,66, N-ацилфосфатидилэтанолламинов — 0,47, семи-лизо-бис-фосфатидной кислоты — 0,39, фосфатидилэтанола — 0,33, фосфатидилметанола — 0,28, N-ацетилфосфатидилэтаноламина — 0,20, N-диацетонного производного фосфатидилэтаноламина — 0,07.

N-ацилэтанолламины получали из свободных жирных кислот и этаноламина [16] с последующими перекристаллизациями из ацетона до получения постоянных температур плавления. Индивидуальность полученных соединений подтверждали, исследуя их приметилсилиловые эфиры методом ГЖХ (3 % SP-2401, газ-носитель — гелий, детектор — пламенно-ионизационный, температура колонки 230 °С, инжектора — 250 °С, хроматограф «Shimadzu GC-9A» со станцией обработки данных «Chromatopak C-R3A», Япония. Во всех случаях чистота препаратов была не ниже 98,7 %. Остальное приходилось, по данным ГЖХ, на свободные жирные кислоты.

О функции быстрых натриевых каналов судили по выходу  $^{86}\text{Rb}^+$  из предварительно нагруженных этим изотопом дифференцированных клеток [17]. Нагруженные изотопом клетки нейробластомы отмывали средой Игла, заливали ту же среду и инкубировали при 37 °С. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты для определения метки. После отбора последней аликвоты среду сливали и определяли содержание  $^{86}\text{Rb}^+$ , оставшегося в клетках. Это позволило рассчитать суммарную нагрузку клеток изотопом и скорость его выхода при разных условиях эксперимента, как уже было описано ранее [3]. Условия опытов обозначены на рисунках.

### Результаты и обсуждение

При анализе полярных липидов различных препаратов клеток нейробластомы С1300 с помощью микро-ТСХ наряду с обычными фосфолипидами, состав которых описан нами ранее [2], молибдатный реагент [12] окрашивал как фосфолипид еще одно пятно, располагающееся на хроматограммах в применяемых системах растворителей близко к фронтальной зоне. В результате использования более специфичного и чувствительного реагента на основе малахитового зеленого [13] показано, что вещество действительно содержит фосфор.

Факт присутствия фосфолипидов с высокой хроматографической подвижностью в клетках нейробластомы до сих пор не был известен. Однако имеется указание на присутствие их в злокачественных клетках других типов. Так, в асцитной карциноме Ландшутца был найден неизвестный фосфолипид, содержащий этаноламин [18]. В аденокарциноме, чешуевидной карциноме и мелкоклеточной карциноме легких обнаружено два близких по хроматографическому поведению фосфолипида, один из которых предположительно идентифицирован как лизо-бис-фосфатидная кислота [19].

Выделенный нами с помощью препаративной ТСХ фосфолипид при хроматографии в системах растворителей для малополярных липидов [6] дает два пятна с близкими значениями  $R_f$ . Один из этих липидов не отличается по хроматографическому поведению от N-ацилфосфатидилэтаноламинов ( $R_f=0,47$ ), а другой сходен с семи-лизо-бис-фосфатидной кислотой ( $R_f=0,39$ ). Относительное содержание этих веществ, составляющих в сумме 1% липидного фосфора, изменяется в зависимости от стадии развития клеток и от степени их дифференцированности. Мы уделили основное внимание исследованию фосфолипида, хроматографически сходного с N-ацилфосфатидилэтаноламином. Недавно было показано, что последний накапливается в значительных количествах в сердце собак с экспериментальным инфарктом миокарда. В ишемических участках его количество составляет 4—6% липидного фосфора, ацильные группы состоят в основном из 16:0 и 18:0 [5, 20].

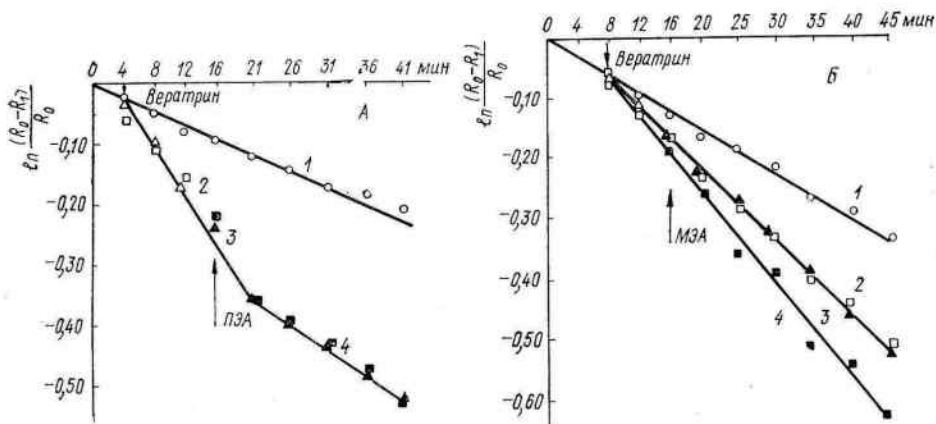
В результате мягкого щелочного гидролиза этого соединения при помощи метиламинового реагента образуются два фосфорсодержащих вещества. Одно из них по хроматографическому поведению не отличается от лизо-N-ацилфосфатидилэтаноламина, а другое от стандарта — N-ацилглицерофосфоэтаноламина. Показано, что при последовательном омылении липида и разрушении плазмалогенов образуется вещество, содержащее фосфор, и хроматографически не отличимое от N-ацилглицерофосфоэтаноламина. Метанолиз полученного вещества приводит к образованию метиловых эфиров жирных кислот,  $\alpha$ -глицерофосфата, неорганического фосфата и 2-аминоэтанола. Вследствие аналогичной обработки синтетического N-ацилфосфатидилэтаноламина получены те же соединения.

Для идентификации обнаруженного липида использовали также характерное для N-ацилфосфатидилэтаноламинов свойство при гидролизе в ледяной уксусной кислоте образовывать N-ацилэтаноламины. Действительно, проведя такой гидролиз, мы получили из исследуемого фосфолипида клеток нейробластомы соединение, по хроматографическому поведению не отличимое от N-ацилэтаноламина. На основании имеющихся результатов было сделано заключение, что обнаруженный липид из клеток нейробластомы представляет собой N-ацилфосфатидилэтаноламин, который обнаруживается как в дифференцированных, так и недифференцированных клетках. При этом, судя по предварительным данным, в последних — в большем количестве.

Хотя N-ацилфосфатидилэтаноламин известен уже давно и довольно широко распространен в природе, он до последнего времени не вызывал особого интереса исследователей. Американские ученые [5] нашли, что этот липид накапливается в инфарктном сердце собаки и высказали предположение, что он может играть важную роль, являясь предшественником N-ацилэтаноламина — липида, стабилизирующего клеточные мембраны в условиях ишемии [20]. N-ацилфосфатидилэтаноламин накапливается в заметных количествах в мозгу рыб [6, 7], может синтезироваться и расщепляться препаратами мозга позвоночных [21, 22]. Не исключено, что и в нервных тканях он служит предшественником N-ацилэтаноламинов, проявляющих биологическую активность.

Мы изучили эффект трех соединений — N-миристоил-, N-пальмитоил- и N-стеароилэтаноламинов, полученных с помощью химического синтеза, на специфическую нейрональную функцию — транспорт ионов через быстрые натриевые каналы.

Результаты этих исследований представлены на рисунке, из которого следует, что вератрин, добавленный в инкубационную среду, увеличивает скорость выхода  $^{86}\text{Rb}^+$  в 3 раза по сравнению с контролем. N-пальмитоилэтаноламин в значительной степени устраняет эффект вератрина, однако не полностью, как это происходит при добавлении



Влияние N-пальмитоилэтанолamina (ПЭА, А) и N-миристоилэтанолamina (МЭА, Б) на активированный вератрином выход  $^{86}\text{Rb}^+$  из дифференцированных клеток нейробластомы С1300.

1 — контроль; 2 — вератрин, 200 мкг/мл среды. Стрелками обозначено внесение вератрина и соответствующего N-ацилэтанолamina в концентрациях  $5 \cdot 10^{-6}$  (3),  $5 \cdot 10^{-5}$  М (4).  $R_0$  — исходная суммарная нагрузка клеток  $^{86}\text{Rb}^+$ , имп/мин,  $R_t$  — скорость выхода  $\text{Rb}^+$ , имп/мин.

тетродотоксина [8]. Это следует из того, что отрезок прямой на графике, отражающий выход  $\text{Rb}^+$  в присутствии N-ацилэтанолamina, не становится параллельным контрольной прямой. Аналогичный эффект наблюдается при добавлении в среду N-стеароилэтанолamina. Интересно, что нам не удалось обнаружить изменения скорости выхода рубидия из клеток после добавления в среду N-миристоилэтанолamina. Таким образом, в наших экспериментах, как и у других исследователей [23], эффективными оказались N-ацилэтанолamины с длинными ацильными цепями.

Ввиду крайне низких количеств N-ацилфосфатидилэтанолaminов, выделенных нами из клеток нейробластомы, их жирнокислотный состав определить не удалось. Нам также трудно объяснить различие механизмов действия N-ацилэтанолaminов с ацильными цепями различной длины. Небезынтересно, однако, напомнить, что именно пальмитиновая и стеариновая кислоты являются основными жирными кислотами в составе N-ацилфосфатидилэтанолamina, накапливающегося в ишемической зоне при инфаркте миокарда. При этом количество ацилэтанолaminов с длинными цепями также резко увеличивается (от 10 пмоль/г в контроле до 400—500 пмоль/г в ткани после ишемии) [4].

Обнаруженный нами эффект зависит от дозы N-ацилэтанолaminов и максимален в пределах  $5 \cdot 10^{-5}$ — $5 \cdot 10^{-6}$  М. Следует подчеркнуть, что в этих же дозах N-пальмитоил- и N-стеароилэтанолamины снимали и другой эффект вератрина недавно, описанный нами, а именно — появление в клетках значительного (до 3 %) количества лизофосфатидилхолина с одновременным повышением количества свободных жирных кислот и эфиров холестерина. В клетках нейробластомы, инкубированных в присутствии вератрина и N-ацилэтанолaminов, лизофосфатидилхолин практически не накапливался [24]. Эппс и другие описали торможение с помощью N-ацилэтанолaminов зависимо от проницаемости митохондриальных мембран выхода  $\text{Ca}^{2+}$  [23]. Они показали снижение проницаемости внутренней мембраны митохондрий и высказали предположение, что эти соединения, по-видимому, могут оказывать аналогичный эффект не только на митохондриальные, но и другие клеточные мембраны.

Наши данные подтверждают это предположение. Известно, что накопление лизофосфатидилхолина в клетках приводит к повышению неспецифической проницаемости, а при высоких концентрациях и к лизису их мембран, а N-ацилэтанолламины, предотвращая накопление лизофосфатидилхолина, способствуют стабилизации клеточных мембран.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в клетках мышинной нейробластомы содержатся N-ацилфосфатидилэтанолламины. Вероятно, они служат предшественниками физиологически активных N-ацилэтанолламинов с длинной углеродной цепью, которые могут тормозить транспорт ионов через активированные быстрые натриевые каналы.

*N. M. Gulaya, V. E. Vaskovsky, M. V. Vysotsky,  
G. L. Volkov, N. N. Gouseeva, I. P. Artemenko*

DETECTION OF N-ACYLETHANOLAMINE PHOSPHOLIPIDS  
IN CELLS OF NEUROBLASTOMA C 1300

Summary

Phospholipids with high chromatographic mobility are detected in cells of murine neuroblastoma C 1300. One of them is identified (proceeding from data of successive chemical degradation) as N-acylphosphatidylethanolamine. It may be a precursor of physiologically active N-acylethanolamines. N-palmitoyl and N-stearoylethanolamines are shown to inhibit the transport of ions through the veratrine-activated fast sodium channels as well as remove the effect of lysophospholipids accumulation in cells under the effect of veratrine.

A. V. Palladin Institute of Biochemistry,  
Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev

1. Гулая Н. М. Культура клеток нейробластомы в биохимических исследованиях // Укр. биохим. журн.—1986.—58, № 1.— С. 101—110.
2. Изменение липидного состава клеток нейробластомы мыши C1300 в процессе дифференцировки / Н. М. Гулая, Г. Л. Волков, Н. Н. Говсева и др. // Там же.—1984.—56, № 6.— С. 677—681.
3. Зависимость функциональных характеристик быстрых натриевых каналов от липидного состава клеток нейробластомы C1300 / Н. М. Гулая, Г. Л. Волков, В. К. Лишко и др. // Там же.—1986.—58, № 1.— С. 44—48.
4. N-acylethanolamine accumulation in infarcted myocardium / D. E. Epps, P. C. Schmid, V. Natarajan, H. H. O. Schmid // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1979.—90, N 2.— P. 628—633.
5. Accumulation of N-acylethanolamine glycerophospholipids in infarcted myocardium / D. E. Epps, V. Natarajan, P. C. Schmid, H. H. O. Schmid // Biochim. et biophys. acta.—1980.—618, N 3.— P. 420—430.
6. Васьковский В. Е., Высоцкий М. В. N-ацилфосфатидилэтанолламин в мозге рыб // Химия природ. соединений.—1985.—№ 3.— С. 326—329.
7. Occurrence of N-acylethanolamine phospholipids in fish brain and spinal cord / V. Natarajan, P. C. Schmid, P. V. Reddy et al. // Biochim. et biophys. acta.—1985.—835, N 3.— P. 426—433.
8. Транспорт  $Rb^+$  через активированные натриевые каналы клеток нейробластомы клона N18 Ф1 / Н. М. Гулая, В. К. Лишко, Г. Л. Волков, Н. Н. Говсева // Укр. биохим. журн.—1983.—55, № 6.— С. 657—661.
9. Bligh E. G., Dyer W. I. A rapid method of total lipid extraction and purification // Can. J. Biochem. Physiol.—1959.—37, N 8.— P. 911—917.
10. Svetashev V. I., Vaskovsky V. E. A simplified technique for thin layer microchromatography of lipids // J. Chromatogr.—1972.—67, N 2.— P. 376—378.
11. Применение пластинок со слоем микрофракционированного силикагеля, закрепленного золем кремневой кислоты, для анализа липидов / Б. Г. Беленький, Э. С. Ганкина, Л. С. Литвинова и др. // Биоорг. химия.—1984.—10, № 2.— С. 244—250.
12. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin I. M. A universal reagent for phospholipid analysis // J. Chromatogr.—1975.—114, N 1.— P. 123—141.
13. Vaskovsky V. E., Latyshev N. A. Modified Jungnickels reagent for detection of phospholipids and other phosphorus compounds on thin layer chromatograms // Ibid.—1975.—115, N 1.— P. 246—249.
14. Vaskovsky V. E., Dembitzky V. M. Determination of plasmalogen contents of phospholipid classes by reaction of micro-thin-layer chromatography // J. Chromatogr.—1975.—115, N 2.— P. 645—647.
15. Clarke N. G., Dawson R. M. C. Alkaline O-N transacylation — a new method for the quantitative deacylation of phospholipids // Biochem. J.—1981.—195, N 1.— P. 301—306.