

**HOSSZÚ SZÉNLÁNCÚ POLITELÍTETLEN ZSÍRSÁVAK
DINAMIKÁJA A KÖZPONTI IDEGRENSZERBEN, KÜLÖNÖS
TEKINTETTEL A KÖRNYEZETI HATÁSOKRA**

Doktori (Ph.D.) értekezés

SZEPESNÉ KITAJKA KLÁRA

témavezető:

Dr. Farkas Tibor D. Sc.

tudományos tanácsadó

MTA SZBK Biokémiai Intézet

BAY ZOLTÁN Alkalmazott Kutatási Alapítvány

Biotechnológiai Kutatóintézet

1999

Szeged

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|---|----|
| ABSTRACT | 4 |
| RÖVIDÍTÉSEK | 10 |
| BEVEZETÉS | 12 |
| A TÉMÁVAL KAPCSOLATOS HÁTTÉRINFORMÁCIÓK | 13 |
| 1. A központi idegrendszerben előforduló fontosabb lipidosztályok szerkezete.... | 13 |
| 2. A központi idegrendszerben előforduló telítetlen zsírsavak..... | 15 |
| 3. A dokozahexaénsav (22:6 ω -3) eredete az agyban..... | 17 |
| 4. A dokozahexaénsav szerepe és jelentősége az agyban..... | 18 |
| 5. Agyi membránok biofizikai paraméterei és foszfolipidjeinek molekuláris összetétele..... | 19 |
| CÉLKITŰZÉS | 22 |
| ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK | 23 |
| Vizsgált állatfajok..... | 24 |
| Analitikai eljárások..... | 26 |
| <i>Lipidek analízise</i> | 26 |
| <i>Molekulaspecieszek meghatározása</i> | 28 |
| Fluoreszcencia anizotrópia mérése..... | 29 |
| Szinaptikus plazmamembránok készítése..... | 30 |
| EREDMÉNYEK | 31 |
| 1. Foszfolipidek zsírsavösszetétele édesvízi halak központi idegrendszerében..... | 31 |
| 2. Szinaptikus membránok..... | 41 |
| 3. Foszfolipidek molekuláris összetétele..... | 43 |
| 4. Táplálkozási szokás és a foszfolipidek molekuláris összetétele..... | 47 |

| | |
|---|-----------|
| 5. Hőmérséklet hatása agyi foszfolipidekre kísérletes körülmények között..... | 49 |
| 6. Dokozahexaénsav tartalmú molekulaszpeciszek eredete ponty agyban..... | 53 |
| 7. Hőmérséklet hatása agyi foszfolipidek fluiditására..... | 54 |
| 8. Agyi foszfolipidek molekuláris összetétele az evolúciós dimenziókban..... | 57 |
| 9. Éterlipidek az agyban..... | 61 |
| 10. Hőmérséklet hatása az éterlipidekre..... | 61 |
| | |
| EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE..... | 65 |
| | |
| EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA..... | 75 |
| | |
| KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS..... | 77 |
| | |
| IRODALOMJEGYZÉK..... | 78 |

ABSTRACT

Although brain is among the tissues most rich in lipids, function of these compounds is still not well understood. Most of our data on composition and metabolism of lipids in brains of vertebrates concern the mammalian. There is an agreement in the literature that these lipids

1. are components of some membrane structures,
2. they are rich in long chain polyunsaturated fatty acids such as docosahexaenoic acid (22:6 ω 3),
3. composition of fatty acids is very conservative, it will be decided in the intrauterine life and after birth cannot be modified at all.

Knowledge about composition and metabolism lipids present in brains of lower vertebrates, such as fish, is very poor. There are good reasons to believe that metabolism of lipids in fish brain may differ in several respect from that of mammalian. For instance

1. its development is not terminated after hatching, but it grows until the animal reached its final size,
2. being the fish poikilothermic animals brain is exposed to fluctuation of the environmental temperature which may bring about adaptational responses in fatty acid compositions,
3. because it grows continuously it maybe altered by differences in lipid compositions of the diet.

Based on scarcity of these data on fish it seemed worth to carry out comprehensive studies on fish brains and relate these results to that obtained on mammals and birds in this

laboratory or published by others. It is hoped that these results will contribute to better understanding at least of some aspects of role of lipids in this important organ.

EXPERIMENTAL APPROACHES

To this end fatty acid and molecular species composition of phospholipids in brains of 11 species of fish, inhabiting water bodies at the boreal, temperate and subtropic regions, 4 species of mammals and 3 species of birds was investigated in relation of body temperature and possible fatty acid composition of diet. In addition fluidity of phospholipid vesicles was also investigated in fish under steady state (seasonal adaptation) or under experimental conditions.

Lipid were extracted using chloroform: methanol (2:1), fatty acids were obtained by acidic transesterification and segregated by gas-liquid chromatography. Molecular species composition of phosphatidilcholines and phosphatidilethanolamines was determined by HPLC chromatographic technique of anthroyloxy derivatives of diglycerides obtained after digestion by phospholipase C. Moreover, fluidity of phospholipid vesicles was assessed by fluorescence polarization technique using either diphenylhexatriene or different anthroyloxy fatty acids.

OBSERVATIONS

1. Brains of fish, similar to mammals, are rich in docosahexaenoic acid.
2. Seasonal changes of temperature do not affect fatty acid composition of total phospholipids in brain of fish sampled from temperate regions, but evolutionary adaptation to extreme temperatures (+5°C,+25°C) brought about a decrease in level of docosahexaenoate in subtropic fish. However, fatty acid composition of certain membrane structures, such as synaptic plasma membranes, show seasonality or dependency on body temperature.
3. Fatty acid composition of ingested food does not seem to affect brain fatty acid composition in fish.
4. 20-25 different phospholipid molecular species were identified from brains of all investigated species. Among them species containing a monounsaturated fatty acid (18:1) in position sn-1 and a polyunsaturated fatty acid (22:6, 20:4) in position sn-2 responded most sensitively to body temperature throughout the evolutionary chain in a way that its level the highest in fish seasonally or evolutionarily adapted to low temperature and lowest in birds. Actually there was an inverse relationship between the body temperature and level of 18:1/22:6 phosphatidylethanolamin (18:1/22:6 PE).

5. Phospholipid vesicles from brains of cold adapted fish were more fluid than those from warm adapted fish seasonally adapted to extreme temperatures. Effect of temperature, both on fluidity of phospholipid vesicles and on level of 18:1/22:6 PE could be demonstrated also under experimental conditions. Vesicles from cold adapted fish were more fluid close to polar head group than those from warm adapted fish due to higher amount of 18:1/22:6 PE species which have larger surface area than its saturated analogue (18:0/22:6).
6. Ether lipid content of fish brains was comparable to that of mammals and was almost identical in cold and warm adapted carp. Despite this, at least the carp, responded with a drastic accumulation of ethanolamine plasmalogens to sudden decrease of temperature and vice versa.
7. Level of 18:1/22:6 PE increased from liver through serum lipoproteins to brain.

EVALUATION

The results presented in this dissertation underline the importance of long chain polyunsaturated fatty acids (22:6) in vertebrate brains. It has been shown that similar to mammals, fish brain also maintains a high level of this fatty acid which is rather resistant to dietary influences as well as to changes of the ambient temperature.

Although level of 22:6 is rather constant in vertebrate brains certain molecular species of constituent phospholipids respond to seasonal or evolutionary changes of body temperature. 18:1/22:6 PE with their increased conicity and larger surface area may play a role in control of membrane fluidity over the evolutionary scale as well as during seasonal or sudden variation of ambient temperature. Besides they may be necessary for activity of enzymes requiring non bilayer structures.

Mechanism of accumulation of 18:1/22:6 PE is not known. Several possibilities are discussed in this dissertation. A possibility is that this species is formed within the brain (neurons) either by in situ desaturation of 18:0/22:6 species to 18:1/22:6. This possibility is supported by finding that $\Sigma 18:0/22:6 + 18:1/22:6$ is identical during thermal adaptation, (and throughout the evolutionary chain) but contradicted by fact that enzyme desaturating phospholipids in situ has not been identified as yet. Another hypothesis is that 18:0/22:6 PE is first deacylated, the liberated 18:0 is then desaturated to give 18:1 and then reacylated to form 18:1/22:6 PE. A third hypothesis is based on the observed successive accumulation of this species from liver to brain. According to this concept the source of 18:1/22:6 is the liver. Lipoproteins would anchor on proper receptors (such as Apo E)

present on the surface of brain microcapillaries, exchange their phospholipids with the endothelial membranes via fusion processes (18:1/22:6 PE is due to its conic shape are very fusogenic). From endothelial cells these species would move to glial cells and neurons again by fusion of surface membranes. Although this approach also requires experimental support it has to be mentioned that presence of lipoprotein receptors has been reported from surface of brain microcapillaries as well as from glial cells of mammals.

Whatever is the way of formation and accumulation of 18:1/22:6 PE (and also PC) from the results presented in this work it is evident that this molecular species with its specific biophysical properties play a key role in maintaining structural and functional integrity membranes in vertebrate brains.

RÖVIDÍTÉSEK

Lipidek:

| | |
|-----------|-----------------------|
| PC | foszfatidilkolin |
| PE | foszfatidiletanolamin |
| PL | foszfolipid |

Zsírsavak:

| | |
|------------------------------|---|
| 16:0 | palmitinsav |
| 16:1 | palmitoleilsav |
| 18:0 | sztearinsav |
| 18:1 | olajsav |
| 18:2 | linolsav |
| 18:3 | linolénsav |
| 20:4 | arachidonsav |
| 20:5 | eikozapentaénsav |
| 22:6 | dokozahexaénsav |
| UFA | telítetlen zsírsav |
| PUFA | politelítetlen zsírsav |
| ω-3 | a zsírsavlánc metil végétől számított harmadik szénatomnál található az első kettőskötés |
| ω-6 | a zsírsavlánc metil végétől számított hatodik szénatomnál található az első kettőskötés |
| ω-9 | a zsírsavlánc metil végétől számított kilencedik szénatomnál található az első kettős kötés |

Fluoreszcens és spínjelzett próbák:

| | |
|--------------|--------------------------------|
| 2-AS | 2-(9-anthroyloxy) sztearinsav |
| 12-AS | 12-(9-anthroyloxy) sztearinsav |
| 16-AP | 16-(9-anthroyloxy) palmitinsav |
| DPH | 1,6-difenil-1,3,5-hexatrién |

Egyéb rövidítések:

| | |
|------------------------|--|
| BHT | butilált hidroxi – toluol |
| HPLC | nagyteljesítményű folyadék – kromatográfia |
| PKC | protein kináz C |
| PLA₂ | foszfolipáz A ₂ enzim |
| PLC | foszfolipáz C enzim |
| <i>sn-1</i> | glicerinváz 1-es pozíciója |
| <i>sn-2</i> | glicerinváz 2-es pozíciója |

BEVEZETÉS

A központi idegrendszer zsírokban az egyik leggazdagabb szervünk, azonban minden más szövettel szemben ezek a zsírok kizárólag szerkezeti elemként fordulnak elő. Ezek a szerkezetek funkciójukhoz (jelátvitel, kognitív funkciók stb.) specifikus összetételű lipidmolekulákat igényelnek. Amennyiben az ezek által igényelt lipidösszetétel nem áll rendelkezésre, az idegrendszer működésében zavarok lépnek fel.

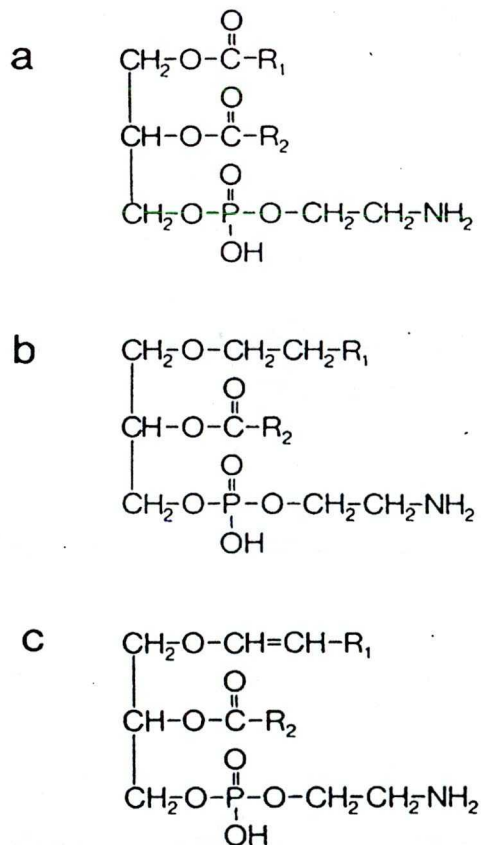
A központi idegrendszer lipidösszetételéről és dinamikájáról alkotott ismereteink túlnyomórészt az emlős állatokra, kisebbrészt pedig madarakra vonatkoznak, azonban még ma sem teljesek. Alacsonyabbrendű gerincesek ritkábban képezték a vizsgálatok tárgyát. Ezekben a szervezetekben az emlősöknél még bonyolultabb viszonyokra számíthatunk, minthogy testhőmérsékletük változó és a lipidek ill. belőlük felépített szerkezetek biofizikai paramétereit hozzá kell igazítsák a változó környezeti viszonyokhoz.

Ebben a disszertációban erőfeszítéseket teszünk a központi idegrendszer lipidjeinek összehasonlító tanulmányozására, különös figyelmet fordítva a diéta zsírsavösszetételének és a természeti környezet hőmérsékletének hatására.

A TÉMÁVAL KAPCSOLATOS HÁTTÉRINFORMÁCIÓK

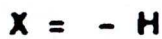
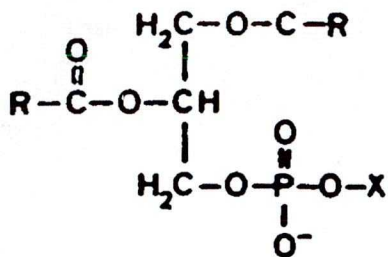
1. A központi idegrendszerben előforduló fontosabb lipidosztályok szerkezete

A legfontosabb szerkezeti lipidek az sn-glicerol-3-foszfát zsírsavészterei. Attól függően, hogy a glicerolnak sn-3 hidroxilcsoportját milyen aminoalkohol (kolin, etanolamin) vagy sav (szerin) észterezi, valamint az sn-1 hidroxilcsoportjához egy zsírsav észter kötéssel vagy egy hosszú szénlancú alkohol éterkötéssel kapcsolódik, beszélünk diacil, alkilacil és alkenilacil formákról. Az alkenilacil formákban egy viniléter kötés alakul ki. Ezeknek a formáknak a szerkezeti képletét szemléletesen a 1. ábra szemlélteti.



1. **Ábra.** Etanolamin foszfogliceridek: 1,2-diacil etanolamin foszfoglicerid vagy foszfatidiletanolamin (a); 1-alkil-2-acil etanolamin foszfoglicerid (b); 1-alkenil-2-acil etanolamin foszfoglicerid v. etanolamin plazmalogén (c).

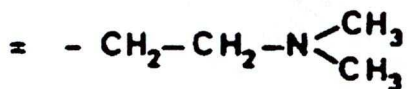
A poláros fejcsoport szerint ezek a foszfolipidek lehetnek kolin, etanolamin, szerin vagy inozitol glicerofoszfolipidek (2. ábra).



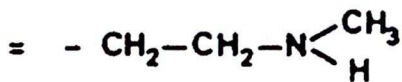
foszfatidsav



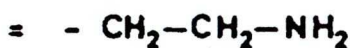
foszfatidilkolin v. lecitin



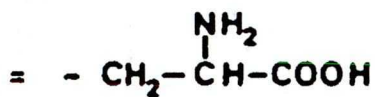
foszfatidil (N-dimetil)-etanolamin



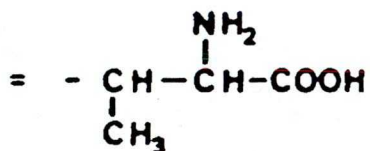
foszfatidil (N-metil)-etanolamin



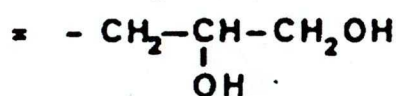
foszfatidil etanolamin



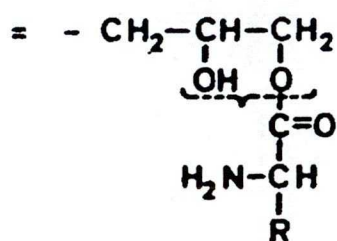
foszfatidil szerin



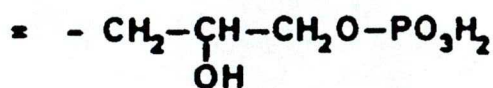
foszfatidil treonin



foszfatidil glicerol



foszfatidil glicerol O-aminosav észter



foszfatidil glicerofoszfát

2. Ábra. Foszfogliceridek szerkezete

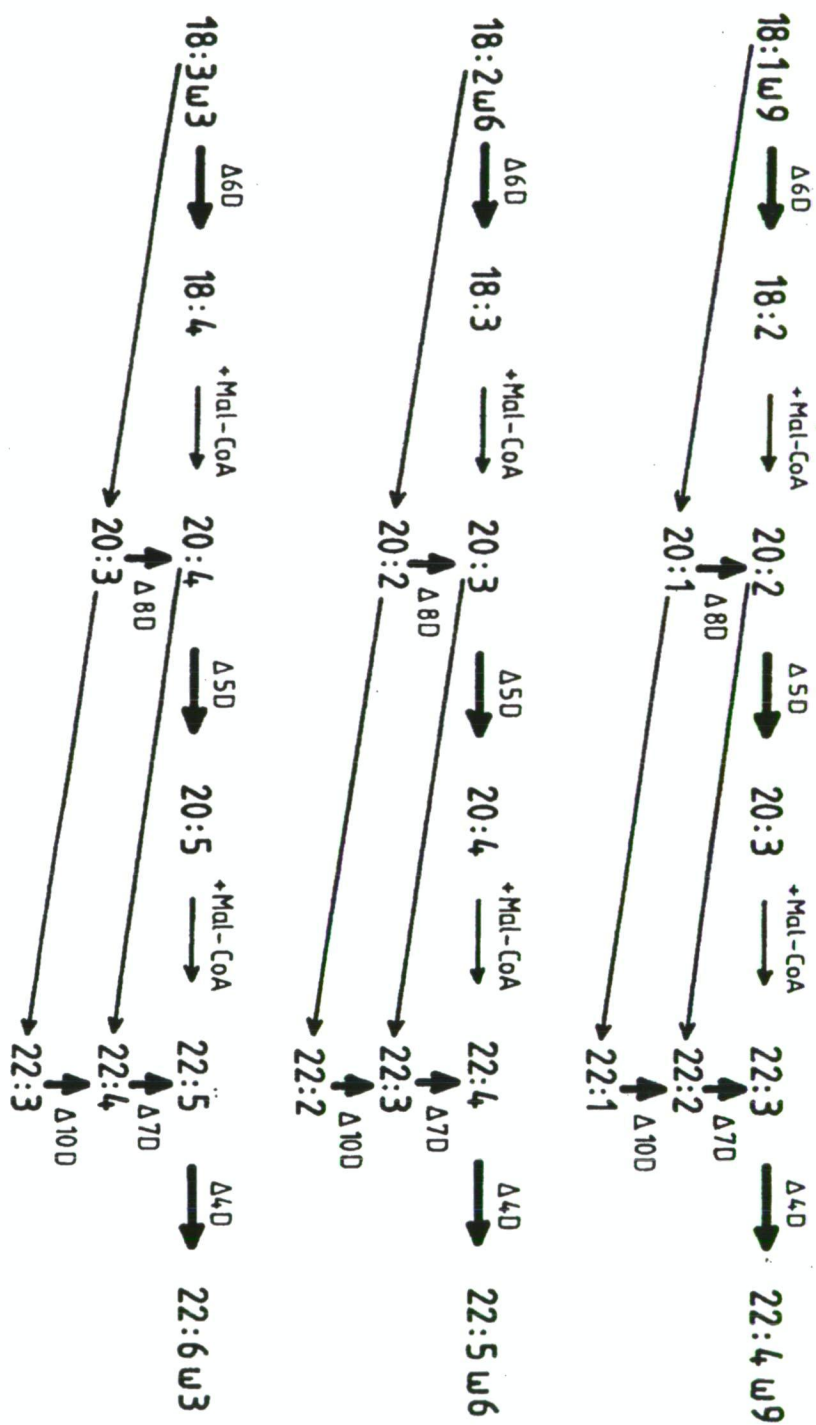
A foszfatidiletanolamin alkenilacil formáját etanolamin-plazmalogénnek is nevezik. Ezek az etanolamin-plazmalogének az emlősagy összes etanolamin foszfogliceridjeinek 35-45%-át is kitehetik (1). Érdekes, hogy a kolinfoszfoglicerideknek csak jelentéktelen hányadát teszik ki az alkenilacil formák. Hidegvérű szervezetekre nézve sokkal hiányosabbak az ismereteink, annyi azonban biztos, hogy a megvizsgált szervezetek központi idegrendszerében is magas az etanolamin-plazmalogének aránya és összetételük változhat a környezet hőmérsékletével (2).

2. A központi idegrendszerben előforduló telítetlen zsírsavak

A központi idegrendszer telített zsírsavai (palmitinsav, sztearinsav) nem mutatnak semmiféle specifitást és így jóformán "kozmozopoliták", ezek a zsírsavak nem képezték vizsgálataink tárgyát.

A telítetlen zsírsavak eredetük ill. szerkezetük szerint három csoportba tartoznak. Vannak zsírsavak, melyekben az első telítetlen kötés az ún. omega-9 (ω -9) pozícióban (pl. olajsav) van. Ezek a zsírsavak a megfelelő telített zsírsavból (pl. sztearinsav) képződnek az adott helyen történő dehidrogénezéssel. Más telítetlen zsírsavakban az első telítetlen kötés az ún. ω -6 helyzetben van. Ezek a zsírsavak a linolsavból képződnek a karboxilcsoport irányában történő dehidrogénezéssel ill. lánchosszabbítással. A telítetlen zsírsavak egy további csoportjában az első telítetlen kötés az ω -3 helyzetben van. Ezek a zsírsavak a linolénsavból képződnek a linolsavhoz hasonló módon. Sem a linolsavat, sem a linolénsavat gerincesek nem tudják szintetizálni, így ezek beszerzése külső forrásból történik. Az olaj, linol és linolénsav átalakulásait a 3. ábra mutatja. A központi idegrendszer sajátossága, hogy igen magas a leghosszabb szénláncú ω -3 zsírsav, a

dokozahexaénsav (22:6 ω -3) tartalma, szemben más szövetekkel, ω -6 szerkezetű telítetlen zsírsavak csak alárendeltebb mennyiségben fordulnak elő. Alacsonyabbrendű gerincesekre nézve csak szerény adataink vannak.



3. Ábra. Telítetlen zsírsavak átalakulásai

3. A dokozahexaénsav (22:6 ω -3) eredete az agyban

A 3. ábrán bemutatott átalakulások majdnem minden szövetféleségben lejátszódnak, csupán a felnőtt állatok központi idegrendszerében nem. Sem a neuronok, sem pedig az agyi mikropillárisok nem képesek 18:3 ω -3-at 22:6 ω -3-á alakítani. Az emlős agyba, beleértve az embert is, a 22:6 ω -3 az embrionális élet során, az agyvelő intenzív fejlődésének idején kerül be, elsősorban a májból (3, 4). Az egyetlen neurális elem, mely képes erre a konverzióra az asztrocita, mind emlősökben, mind halakban. Emlős agyból izolált ilyen sejtek tenyésztési körülmények között deszaturálták a jelzett 18:3 ω -3-at (5), hasonlóképpen a *Scophthalmus maximus* tengeri hal asztrocitái is (6, 7). Madarakban hasonló a helyzet azzal a kivétellel, hogy a tojásból kikelt kiscsirkék agya a kelés után három héttel még képes volt 22:6 ω -3-at felvenni a táplálékból (8).

Sem az emlősökben, sem a madarakban a születés ill. a kikelés után néhány nappal ill. héttel már nincs mód az agy 22:6 ω -3 szintjét változtatni. Ezen idő után már az asztrociták is elveszítik jelentőségüket, mivel a megfelelő prekursor, a 18:3 ω -3 nem jut át a vérágygáton. Adatok vannak viszont arra nézve, hogy legalábbis a fenti tengeri hal agyában a posztlárvális állapotban 22:6 ω -3 halmozódik fel (9, 10). A 22:6 ω -3 felhalmozódásának ideje ezekben a halakban egybeesik a központi idegrendszer intenzív fejlődésével és analóg azokkal a folyamatokkal, melyek az emlősök agyában az embrionális élet harmadik harmadában játszódik le.

Az emberben - a májból az embrió agyába - a 22:6 ω -3 fő szállítója a vörösvértestek PE-je. Kimutatták, hogy a 22:6 ω -3 szintje az anyai vérben a legalacsonyabb, majd feldúsul a köldökvénában, az embrionális agyban pedig igen magas szintet ér el. Ezt a nagymérvű felhalmozódást "biomagnifikációnak" nevezték el (11). Azt is feltételezték, hogy a

neurális elemek valamilyen jelzést küdenek a májnak a növekvő 22:6 ω -3 igényük kielégítésére a posztnatális élet első néhány napjában. Erre a jelre a máj növeli a 22:6 ω -3 szintézisét és elválasztását, melyet a központi idegrendszer felvesz (4).

4. A dokozahexaénsav szerepe és jelentősége az agyban

Még ma sem világos, hogy a 22:6 ω -3 milyen szerepet tölt be az agyban és más neurális elemekben. Feltételezhető volt, hogy magas kettős kötés tartalma miatt esetleg növelhetné a membránok "fluiditását". Ez a hipotézis azonban nem állja meg a helyét: pl. a 16:0/18:1 foszfatidilkolin termotróp fázisváltózási hőmérséklete alacsonyabb (12), mint a 18:0/22:6 foszfatidilkoliné (13) és hasonlóképpen a 18:0/20:4, 18:0/20:5 és a 18:0/22:6 foszfatidilkolin DPH-val mért anizotrópia paramétere (fluiditása) közel azonos (14), vi. a fluiditás szabályozása szempontjából bármelyik szóba jöhetne. Vannak azonban utalások arra nézve, hogy azok a sejtek, melyekben magas a 22:6 ω -3 szintje, metabolikusan igen aktívak.

Kimutatták azt is, hogy az agy ω -3 poliénsavakkal való ellátottsága és az adott szervezet tanulási képessége között kapcsolat van (15, 16, 17). Miután a legtöbb adat arra utal, hogy a 22:6 ω -3 fő tömege az intrauterin élet során kerül az agyba, feltételezik, hogy a mentális apparátus teljesítőképessége az anyaméhben dől el és attól függ, hogy a magzat hozzájut-e elegendő ω -3 poliénsavhoz, elsősorban 22:6 ω -3-hoz (18). Ilyen adatok, természetesen emlősöknél alacsonyabbrendű gerincesekre nézve nincsenek. A helyzet azonban ennél sokkal komplikáltabb: a hidegadaptált halak (ponty) szinaptikus plazmamembránjaiban több 22:6 van, mint a patkányokéban ill. madarakéban, mégsem tekinthetjük a halakat intelligensebb állatoknak, mint a madarakat vagy az emlősöket.

5. Agyi membránok biofizikai paramétereinek és foszfolipidjeinek molekuláris összetétele

A membránok fluiditása vagy az ún. szerkezeti rendje alapvetően befolyásolja a membrán-folyamatokat és -funkciókat (19). A membrán mozgási sajátosságai és folyadékkristályos állapota befolyásolhatja a membránkötött fehérjék konformációját és flexibilitását, a permeabilitási folyamatokat és enzimaktivitásokat. Következésképpen elvárható, hogy a membránok fizikai állapota érzékeny szabályozás alatt álljon. Sinensky volt az első, aki megfigyelte, hogy a különböző hőmérsékleteken tenyésztett *E. coli* lipidjeinek termotróp fázisváltási hőmérséklete érzékenyen követte a tenyésztési hőmérséklet változásait oly módon, hogy minél alacsonyabb volt a tenyésztési hőmérséklet, annál alacsonyabb lett a fázisváltási hőmérséklet is, de a különbség a két hőmérséklet között konstans maradt (20). Ezt a jelenséget "homeoviszkozus adaptációnak" nevezte el és azóta is így használják.

Roy és mtsai két szélsőséges (18°C, 35°C) hőmérsékletre adaptált hal (*Channa punctata*) agyi membránjainak (mielin, szinaptoszóma, mitokondrium) fluiditását vizsgálva azt mutatta ki, hogy azok az alacsony hőmérsékletre adaptált halakban lényegesen fluidabbak voltak, mint azokban, melyek a magasabb hőmérsékleteken éltek (21).

Behan – Martin és mtsai (22) különböző testhőmérsékletű gerinces állatok (antarktiszi, mérsékelt égövi és szubtrópusi halak, galambok, patkányok) agyi szinaptikus plazmamembránjainak fluiditását vizsgálta és kimutatta, noha a galamb membránjai voltak a legmerevebbek, az a testhőmérsékleten mérve majdnem teljesen azonos volt. Ez azt jelenti, hogy ezek a szervezetek majdnem tökéletesen képesek a hőmérséklet

“membránrendező” hatását kompenzálni. Ez a kompenzáció meglehetősen gyors: ha Cossins és mtsai (23) két szélsőséges hőmérsékletre (5°C, 25°C) adaptált aranyhalat az ellenkező hőmérsékletre tett, a szinaptikus plazmamembrán fluiditás szinte azonnal változni kezdett. A maximális válasz kiváltásához azonban kb. húsz nap volt szükséges. Hasonlóképpen viselkednek hideghez és meleghez adaptált halak agyából izolált neuronok plazmamembránjai is (24). Feltűnő volt viszont, hogy a membránok zsírsavösszetételében nem volt logikus változás, vi. alacsony hőmérsékleten nem növekedett pl. a 22:6 ω -3 szintje egyik fontos foszfolipidben sem. Csupán az olajsav szintje emelkedett a hidegstresszelt halak foszfolipidjében, elsősorban a foszfatidiletanolaminban. Valószínűleg a poliénsavak össz mennyisége nem játszik olyan fontos szerepet a membránok fluiditásának szabályozásában, mint azt korábban hitték.

Felmerült a lehetőség, hogy a membránalkotó foszfolipidek molekulaspeciesz összetétele sokkal fontosabb ebből a szempontból. Agyi foszfolipidek molekulaspeciesz összetételét többen tanulmányozták, édesvízi (24, 25) és tengeri halak (26, 27), de emlősök esetében is (28). Ezek a vizsgálatok egyértelműen igen bonyolult összetételről tanuskodnak. Az agyban a lehetséges foszfolipid molekulaspecieszek (diacil-, alkilacil-, alkenilacil-, -foszfatidilkolin, -etanolamin, -szerin, - inozitol) száma messze több, mint száz.

Ezen specieszek biofizikai paramétereinek eredője a membránok “fluiditása”, melyet természetesen az ott levő fehérjék és szterolok tovább alakítanak. Mégis az eddigi vizsgálatokból az tűnik ki, hogy vannak kitüntetett foszfolipid molekulaspecieszek, melyek ilyen szempontból különösen fontosak. Buda és mtsai (24) egy HPLC technikát alkalmazva kimutatták, hogy az “evolúciósan” vagy szezonálisan hideghez ill. meleghez adaptált halak agyában az sn-1 monoén, sn-2 polién foszfatidiletanolaminok szintje jellegzetesen

különbözik oly módon, hogy a hideghez adaptált halakban szintjük magasabb, mint a meleghez adaptált halak esetében. Hasonló következtetésre jutottak Roy és mtsai (29) a *C. batrachus* esetében, de ezek a szerzők teljesen más megközelítést alkalmaztak (az izolált foszfolipidekből PLA₂ enzim segítségével lehasították az sn-2 helyzetben levő zsírsavakat és a kapott lizofoszfolipideket külön vizsgálták).

CÉLKITŰZÉS

Az értekezésben tanulmányozni kívántuk a törzsfajlás különböző szintjein álló gerincesek központi idegrendszerének lipidösszetételét, lipidjeinek és membránjainak molekuláris architektúráját és azok biofizikai paramétereit abban a reményben, hogy olyan információkhoz jutunk, melyek közelebb visznek a lipidek szerepének megértéséhez, ebben a nagyon specializált szövetféleségben.

A vizsgálatokat két vonalon indítottuk el:

1. Megvizsgáltuk, hogy a táplálék zsírsavösszetétele milyen hatással van a neurális elemek zsírsavösszetételére.
2. Továbbá, hogy a környezet/testhőmérséklet milyen hatással van a membránok (szinaptikus plazmamembrán) ill. az agyból kinyert összes foszfolipid molekuláris összetételére és egyes biofizikai paramétereire.

Ennek érdekében megpróbáltuk:

- A/ kimutatni a membrán lipidkomponenseinek adaptációját, a hőmérséklet membránszerkezetre kifejtett hatását
- B/ a membrán lipidösszetételében bekövetkező hőmérséklet indukálta változásokat azonosítani
- C/ a hőmérséklet adaptáció hatékonyságát megfigyelni
- D/ specifikálni azon molekuláspecieket, melyek létfontosságú szerepet játszanak a környezet hőmérsékletének változásához történő adaptálódás regulációjában
- E/ megkísérelni megérteni a hőmérsékletadaptáció háttérében álló folyamatokat

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgált állatfajok:

Az 1. táblázat tartalmazza e tanulmány tárgyát képező fajok nevét, eredetét ill. testhőmérsékletét.

Minden esetben a helyszínen történt a vizsgálandó szervek kivétele a frissen megölt állatokból. A májakat és agyakat folyékony nitrogénbe helyezve juttaták el laboratóriumunkba.

A hőmérséklet-aklimatizációs vizsgálatok során az 1-1.5 kg-os pontyokat előzőleg 25°C-os ill. 5°C-os jól átlevégőztetett, cirkuláltatott vízzel töltött kádban tartottuk.

A hideghez szokott halak esetében a víz hőmérsékletét fokozatosan 5°C-ról 25°C-ra növeltük, a meleghez szokott halak esetében fordítva jártunk el, 25°C-ról 5°C-ra csökkentettük a víz hőmérsékletét.

További vizsgálatok során ezt folytatva újra lehűtöttük 5°C-ra ill. újra felmelegítettük 25 °C-ra a vízfürdő hőmérsékletét.

1. Táblázat

VIZSGÁLT FAJOK

| FAJ | EREDET | TESTHŐMÉRSÉKLET |
|------------------------------------|----------------|------------------------|
| Halak: | | |
| <i>Ctenopharyngodon idella</i> | Magyarország | 5°C |
| <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> | Magyarország | 5°C, 25°C |
| <i>Hypophthalmichthys nobilis</i> | Magyarország | 5°C |
| <i>Cyprinus carpio</i> | Magyarország | 5°C, 25°C |
| <i>Esox lucius</i> | Finnország | 5°C |
| <i>Acerina cernua</i> | Finnország | 5°C |
| <i>Coregonus alba</i> | Finnország | 5°C |
| <i>Abramis brama</i> | Finnország | 5°C |
| <i>Rutilus rutilus</i> | Finnország | 5°C |
| <i>Clarias batrachus</i> | India | 25°C |
| <i>Catla catla</i> | India | 25°C |
| <i>Channa punctata</i> | India | 25°C |
| <i>Hilsa ilisa</i> | India | 25°C |
| Madarak: | | |
| <i>Branta canadensis</i> | Pasco, WA, USA | 41°C |
| <i>Anas platyrhynchos</i> | Canada | 41°C |
| <i>Gallus domesticus</i> | Magyarország | 41°C |

Emlősök:

| | | |
|--------------------------|--------------|------|
| <i>Bos taurus</i> | Magyarország | 37°C |
| <i>Sus domesticus</i> | Magyarország | 37°C |
| <i>Ovis aries</i> | Magyarország | 37°C |
| <i>Rattus norvegicus</i> | Magyarország | 37°C |

Analitikai eljárások

Lipidek analízise

Lipidek kinyerése

A lipideket Folch és mtsai szerint nyertük ki (30). Az extrahálás során kloroform/metanol 2:1 (v/v) arányú elegyét használtuk. A homogenizálást Ultra-Torrax típusú késes homogenizátorral végeztük. Végző lépésként Rotadest bepárló készülékkel pároltuk be a mintát, majd a totál lipid frakciót antioxidánsként BHT-t tartalmazó adott térfogatnyi benzolban vettük fel és -20° C-on tároltuk további feldolgozásig.

Lipidek elválasztása kromatográfias technikákkal

Oszlopkromatográfia

Az egyéb lipidektől való megtisztítás legcélszerűbb módja a kovasavas oszlopkromatográfias eljárás, mellyel jól definiált frakciókra lehet bontani a lipidek elegyét. Az eluáló szolvensek megfelelő megválasztásával elérhető a foszfolipidek elválasztása az egyéb lipidektől.

Esetünkben az eljárás a következőképpen történt: a feltöltött oszlop kloroformmal való többszöri átmosása után öntöttük rá az adott mennyiségű totál lipidet. Ezután ismét kloroform következett, mely a foszfolipideken kívül jóval apolárosabb összes egyéb lipidet oldja (neutrális lipidek, gliceridek). Végül a metanolos fázist Rotadest vákumos bepárló készülékkel pároltuk be és a későbbi felhasználás céljából BHT-t tartalmazó benzolban tároltuk.

Vékonyréteg kromatográfia

A foszfolipidek alosztályainak elválasztására leginkább a vékonyréteg kromatográfias eljárás alkalmas. Ennek szükségességét az indokolja, hogy a későbbi gázkromatográfias vizsgálatokhoz a foszfolipidek alosztályai elengedhetetlenül szükségesek, hogy valóban összehasonlítható és reális eredményeket kapjunk a zsírsavösszetételről.

A foszfatidilkolin (PC) és foszfatidiletanolamin (PE) elválasztás során G-60 szilikagél lapokat (Merck) használtunk. A futató elegy kloroform/metanol/víz, 65:15:4 arányú keveréke volt. A foszfolipidek detektálására a következő módszert alkalmaztuk. 8-anilino-1-naftalin szulfonsav (ANS) 0,5%-os metanolos oldatával tettük UV fényben láthatóvá, majd kloroform/metanol (2:1) elegyével oldottuk le a szilikagélről. Bepárlást követően a PC-t és PE-t -20°C -on tároltuk további feldolgozásig BHT-t tartalmazó kloroformban.

Gázkromatográfia

A foszfolipidek zsírsavösszetételét egy lángionizációs detektorral felszerelt Hitachi Model 260-80 GC-on határoztuk meg, miután metilészterré alakítottuk a lipideket 5 % HCl-t tartalmazó metanollal 80°C -on két és fél óráig. A zsírsavak egy 10 % FFAP (free fatty acid phase) borítású Supelcoport oszlopon váltak szét. A kvantitálást a gázkromatográfhoz kapcsolt Hitachi 260-80 integrátorral végeztük. Az azonosítást standart zsírsavak segítségével történt.

Molekulaspecieszek meghatározása

Az izolált PC és PE molekulaspeciesz összetételének meghatározására kezdetekben Takamura és mtsai (31) leírása szerint került sor, melynek során a diacil-glicerolok dinitrobenzoil származékait analizáltuk egy UV-detektorral felszerelt Merck-Hitachi HPLC rendszeren. A továbbiakban lehetőségünk nyílt egy fluoreszcencia detektor beszerzésére, melynek segítségével körülbelül két nagyságrenddel kevesebb mennyiségből is meg lehet mérni a lipidek molekulaspeciesz összetételét (27).

Dinitro-benzoil származékok készítése

A körülbelüli 2 mg PC-t és PE-t bepároltuk és feloldottuk 1 ml dietil-éter és 1 ml 30 mM H_3BO_4 -t tartalmazó 10 mM Tris-HCl pufferben (pH 7.5), majd 200 egység PLC-t (*Bacillus cereus*-ból, Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) adtunk hozzá és két órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. A keletkező diradil-glicerolokat dietil-éterrel extraháltuk, bepároltuk és 25 mg 3,5-dinitro-benzoil-kloridot adtunk hozzá 0.5 ml vízmentes piridin kíséretében, majd 60° C-on 10 percig inkubáltuk. A dinitro-benzoil származékokat n-hexánban oldottuk és mostuk 0.1 M HCl-, 0.1 M $NaHCO_3$ - és 1 M NaCl-oldattal. Az így nyert termékből a diacil-DNB származékokat fluoreszkáló TLC lapon (F254, G-60 Merck) tisztítottuk toluol/n-hexán/dietil-éter (50:45:4) futtató elegyben. A diacil foltokat lekapartuk, kloroform/metanol (3:1 v/v) elegyben oldottuk, majd szűrés, bepárlás után acetonitrilben tároltuk (-20°C-on) a HPLC analízis idejéig.

A molekulaspecieszeket folyadék-kromatográfiásan (HPLC) választottuk el Merck-Hitachi egy Nucleosil C-18 5 μ m, 4mm i.d. x 250 mm oszlopon acetonitril/propan-2-ol (80:20 v/v) eluenst használva, 1 ml/perc áramlási sebességgel. A detektálás 254 nm-en

történt. A csúcsok azonosításához használatos standartokat (16:0/22:6, 18:0/22:6, 16:0/20:4, 18:0/20:4, 16:0/18:1, 16:0/16:0, 18:1/18:1, 18:0/18:1) a Sigma Chemicals-tól szereztük be és a relatív retenciós idők alapján Bell és mtsai (26) szerint végeztük.

Antroil származék készítése

Ebben az esetben a PLC-vel történő emésztés végtermékéig megegyezik a preparálás a fentiekben leírtakkal, annyi különbséggel, hogy jóval kevesebb, körülbelül 50 μg PC és PE elegendő.

A kapott diradil-glicerolokat 200 μl antroil-klorid acetonitriles oldatával (előre elkészített Takamura és Kito (32) szerint) inkubáltuk 60° C-on fél óráig. A reakciót 3 ml hideg 100 mM NH_4OH -oldat hozzáadásával állítottuk meg, majd többszöri mosás és tisztítás után HPTLC-n választottuk el a diacil-glicerol antroil származékait az előzőekben említett futtató elegyben.

A molekulaszékek szeparálását ez esetben egy Merck-Hitachi F-1050 fluoreszcens spektrofotométerrel felszerelt Merck-Hitachi HPLC rendszeren végeztük kétféle oszlopon: az eluens vagy acetonitril/propan-2-ol (7:3 v/v), (Supelcosil LC-18) vagy metanol/ propan-2-ol (4:1 v/v) izokratikus elegye (C-8 oszlop) volt. Az oszlop és az áramlási sebesség megegyezett a fentiekben ismertetettel.

Fluoreszcencia anizotrópia mérése

A fluoreszcens jelölőket tartalmazó vezikulák elkészítése a következőképpen történt: A 250 μg -nak megfelelő foszfolipidet 500 μl benzolban vettük fel, majd hozzáadtunk 10 μl tetrahidrofuranban oldott 1 μM 2- és 12-(9-anthrolyoxy) sztearinsavat

(2- és 12-AS) ill. 16-(9-anthroyloxy) palmitinsavat (16-AP) (Molecular Probes Inc. OR, USA). Alapos vortexelés után az adott szolvenst bepároltuk és vezikulákat készítettünk (33). A méréseket és a steady-state anizotrópia kialakulását Dey és mtsai (34) szerint végeztük.

A szinaptikus plazmamembránok fluiditás vizsgálatakor az adott membránokat 10 μ l DPH-val (1,6-difenil-1,3,5-hexatrién) (Molecular Probes) jelöltük a mérés kezdete előtt 15 perccel. A fluoreszcencia anizotrópia méréseket 2° C és 30°C ill. 5°C és 45°C között végeztük 2°C-ként egy komputerezált, termosztált Hitachi MPF-2A spektrofotofluoriméterrel Dey és Farkas (35) szerint, 360 nm gerjeszési ill. 430 nm emissziós hullámhosszon.

Szinaptikus plazmamembránok készítése

A szinaptikus plazmamembrán frakciót az alábbiak szerint készítettük el. 6-7 g-os agyakat homogenizáltunk teflon homogenizátort alkalmazva 0.32 M-os (pH 7.1) cukor oldatban (1 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 50 mM TRIS HCl). Az így kapott homogenizátumot 1000 g-vel 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót 13000 g-vel 30 percig ülepítettük, szuszpendáltuk cukor oldatban, majd centrifugáltuk egyszer 10800 g-n 20 percig, majd 14000 g-vel szintén 20 percig. Ezután a pelletet Dounce homogenizátorral szuszpendáltuk és 0°C-on 30 percig lizáltuk. Végül a membránokat egy 10%, 28.5% és 34%-os cukor gradiensre helyeztük és Beckman SW 27 rotor (Beckman Instruments, Fullerton, CA) használatával 60 percig centrifugáltuk. A szinaptikus membránokat a 28.5% és 34 %-os cukor oldatok interfészéből gyűjtöttük össze, majd -80°C-on tároltuk további felhasználásig.

EREDMÉNYEK

1. Foszfolipidek zsírsavösszetétele édesvízi halak központi idegrendszerében.

Édesvízi halak központi idegrendszerére vonatkozóan nagyon kevés adattal rendelkezünk. Chang és Roots (36) az aranyhal (*Charassius auratus*) mitokondriális és mikroszómális lipidjeinek zsírsavösszetételét vizsgálta hőmérsékleti adaptáció során és jellegzetes eltéréseket mutattak ki a polién zsírsavak szintjében. Roy és mtsai (29) azt találták a *Clareas batrachus* agyában, hogy a 22:6 ω -3 szintje változott az adaptációs hőmérséklettel.

Vizsgálatainkat elsősorban a pontyra terjesztettük ki. A 2. táblázat hideghez és meleghez adaptált pontyok agyából nyert összes foszfolipid és az ezekből nyert foszfatidilkolinok és -etanolaminok zsírsavösszetételét mutatja be. Az eredmények alapján a hideghez és meleghez szokott állatok agyi zsírsavösszetétele nem különbözik lényegesen.

Figyelembe véve a pontyok májából nyert foszfolipidek zsírsavösszetételét (3. táblázat), az azonban feltűnik, hogy az agyban (6. táblázat) a 22:6 ω -3 szintje magasabb, mint a májban.

2. Táblázat. Hideg- és meleg-adaptált pontyok agyi foszfolipid zsírsavösszetétele

| Zsírsavak | Nyári halak | | | Téli halak | | |
|----------------|-------------------|--------------------|------------------------|-------------------|--------------------|------------------------|
| | Totál foszfolipid | Foszfátidil -kolin | Foszfátidil-etanolamin | Totál foszfolipid | Foszfátidil -kolin | Foszfátidil-etanolamin |
| 14:0 | 0.15 | 0.91 | 0.17 | 0.53 | 0.76 | 0.17 |
| DMA 16:0 | 2.68 | Tr | 2.29 | 1.15 | Tr | 1.60 |
| 16:0 | 7.45 | 31.50 | 6.19 | 11.49 | 26.23 | 4.80 |
| 16:1 | 8.61 | 7.81 | 5.74 | 9.46 | 10.12 | 7.90 |
| DMA 18:0 | 7.82 | - | 0.88 | 4.65 | - | 5.90 |
| DMA 18:1 | 4.18 | - | 9.52 | 3.52 | - | 1.70 |
| 18:0 | 12.16 | 7.40 | 15.33 | 8.63 | 11.9 | 8.90 |
| 18:1n-9 | 17.61 | 21.57 | 12.83 | 20.00 | 23.14 | 17.60 |
| 18:2n-6 | 0.95 | 0.28 | 0.27 | 0.45 | 0.90 | 0.97 |
| 18:3n-9 | Tr | 0.30 | 0.48 | 0.47 | Tr | 0.30 |
| 20:2n-6 | 0.95 | Tr | 1.26 | 0.57 | 0.80 | 1.79 |
| 20:3n-6 | 1.40 | Tr | 0.30 | 0.44 | 0.60 | 0.83 |
| 20:4n-6 | 9.20 | 3.73 | 8.18 | 7.07 | 3.01 | 11.27 |
| 20:4n-3 | 1.35 | 1.95 | 0.79 | Tr | 0.06 | Tr |
| 20:5n-3 | 0.21 | 3.13 | 0.29 | 1.69 | 0.21 | 0.96 |
| 22:4n-6 | 1.23 | 10.83 | 0.98 | 0.60 | 0.36 | 0.84 |
| 22:5n-6 | 1.27 | Tr | 3.85 | Tr | 0.80 | 1.60 |
| 22:5n-3 | 0.90 | Tr | 0.83 | 1.74 | 0.32 | 0.72 |
| 22:6n-3 | 21.78 | 5.45 | 20.17 | 23.50 | 8.36 | 23.47 |

DMA: dimetilacetát

3. Táblázat. Édesvízi halak máj foszfolipid zsírsavösszetétele

| Zsírsavak | <i>H. molitrix</i> | <i>H. nobilis</i> | <i>C. idella</i> | <i>C. carpio</i> |
|----------------|--------------------|-------------------|------------------|------------------|
| 14:0 | 0.4 | 0.2 | 0.2 | 0.3 |
| 16:0 | 14.5 | 18.2 | 21.9 | 21.8 |
| 16:1 | 2.7 | 2.9 | 7.4 | 6.2 |
| 18:0 | 4.7 | 4.9 | 5.6 | 4.2 |
| 18:1 | 11.4 | 15.1 | 12.0 | 16.2 |
| 18:2n-6 | 0.9 | 0.9 | 3.4 | 3.4 |
| 18:3n-3 | 1.2 | Tr | 0.8 | 0.7 |
| 20:2n-6 | 1.1 | Tr | 1.2 | 2.4 |
| 20:3n-6 | 0.5 | Tr | 0.8 | 4.1 |
| 20:3n-3 | 0.3 | Tr | 2.1 | 1.8 |
| 20:4n-6 | 6.1 | 5.0 | 9.6 | 9.2 |
| 20:5n-3 | 10.1 | 7.4 | 5.4 | 3.7 |
| 22:3n-6 | Tr | Tr | 0.6 | 0.1 |
| 22:4n-6 | 2.1 | Tr | 0.4 | 0.7 |
| 22:5n-6 | 4.1 | 1.7 | 2.4 | 0.6 |
| 22:5n-3 | 2.9 | 6.7 | 5.1 | 4.7 |
| 22:6n-3 | 36.2 | 36.1 | 20.6 | 19.6 |
| ΣLCPUFA | 63.6 | 57.4 | 48.2 | 46.9 |
| SAT/UNSAT | 0.25 | 0.31 | 0.39 | 0.36 |

A két megvizsgált foszfolipid osztály közül a foszfatidiletanolamin sokkal gazdagabb ebben a zsírsavban, mint a foszfatidilkolin (2. táblázat). Egy másik jellegzetes eltérés a hideghez és meleghez adaptált halak között az, hogy az előbbi foszfatidiletanolaminjaiban az olajsav (18:1 ω -9) szintje lényegesen magasabb (17.6% vs. 12.8%). A 22:6 ω -3 szintje is valamivel magasabb a hideghez adaptált halak agyában. Ezek

az eredmények azt fejezik ki, hogy az adaptációs hőmérséklet jelentéktelen hatással van a ponty agyában levő foszfolipidek zsírsavösszetételére.

Természetesen ezek az adatok csupán a kinyert összes foszfolipidre vonatkoznak. Ezek a foszfolipidek azonban számos membránféleségből származnak, melyek közül egyesek választ adhatnak a környezeti hőmérséklet változásaira, mások pedig nem. Ezenkívül az általunk megvizsgált halak nyáron és télen bizonyos hőmérsékleti fluktuációnak vannak kitéve, vagyis nekik olyan zsírsavösszetételt kell fenntartaniuk, melyek ezeknek a viszonyoknak megfelelnek.

Sokkal egyértelműbb választ kaphatunk, ha megvizsgáljuk evolúciósan két szélsőséges hőmérsékleti viszonyhoz (pl. boreális és szubtrópusi) alkalmazkodott halak központi idegrendszerét. Az ilyen halak évmilliók óta élnek konstans hőmérsékleti környezetben és nincsenek kitéve hőmérsékleti fluktuációnak. A 4. táblázat bemutatja az evolúció során különböző hőmérsékletre adaptálódott édesvízi halak (boreális régió- Finnország: *E. lucius*, *A. cernua*, *A. brama* és szubtrópusi régió- India: *H. ilisa*, *C. batrachus*, *C. catla*) agyi foszfolipid zsírsavösszetételét.

A legfontosabb összetevők mindegyik fajban a 14:0, 16:0, 18:0, 18:1, 20:4, 20:5 és 22:6 függetlenül élőhelyük hőmérsékletétől ill. földrajzi elhelyezkedésüktől.

4. Táblázat. Evolúciós úton különböző hőmérséklethez adaptálódott édesvízi halak agyi összes foszfolipid zsírsavösszetétele

| Zsírsavak | Boreális halak ¹ | Szubtrópusi halak ² |
|----------------|-----------------------------|--------------------------------|
| 14:0 | 0.93±0.78 | 0.83±0.74 |
| 16:0 | 13.97±2.20 | 20.26±3.85 |
| 16:1n-7 | 6.51±1.54 | 22.21±0.71 |
| 16:2 | 0.23±0.12 | 1.11±1.08 |
| 16:3 | 0.26±0.19 | 0.91±0.35 |
| 18:0 | 6.35±1.89 | 11.59±0.64 |
| 18:1n-9 | 20.04±3.78 | 23.36±5.64 |
| 18:2n-6 | 0.37±0.36 | 0.82±0.54 |
| 18:3n-3 | 0.07 | 0.28±0.02 |
| 20:1n-9 | 1.07±0.50 | 0.42±0.18 |
| 20:2n-6 | Tr | 0.52±0.19 |
| 20:3n-6 | 0.15±0.07 | 0.70±0.28 |
| 20:4n-6 | 4.96±1.25 | 6.08±2.30 |
| 20:4n-3 | 0.95±0.70 | 1.00±0.75 |
| 20:5n-3 | 4.58±2.05 | 1.49±0.80 |
| 22:4n-6 | 0.52±0.38 | 2.27±1.32 |
| 24:1 | 5.21±1.25 | 3.57±1,21 |
| 22:5n-3 | 1.73±1.25 | 1.08±0.47 |
| 22:6n-3 | 28.71±3.39 | 19.80±3.06 |

¹: E. lucius, A. cernua, A. brama; ²: H.ilisa, C. batrachus, C. catla.

Ebben az esetben már igen jól megfigyelhető az evolúciósan szélsőséges hőmérsékletekhez való adaptálódás, mely geográfiai méretekben valóban megjelenik. A zsírsavösszetételt tekintve valószínűleg általános válaszról lehet szó.

A fontosabb zsírsavak (palmitinsav, olajsav, dokozaheksaénsav) közül a dokozaheksaénsav fordul elő a legnagyobb mennyiségben a hideghez akklimatizált halak esetében. A boreális régióban élő halakban e zsírsav aránya lényegesen magasabb, mint a szubtrópusiakban. Érdekes, hogy a mérsékelt égövben élő ponty agyi zsírsavösszetétele (2. táblázat) a kétféle hal adatai közé esik.

A telített és telítetlen zsírsavak aránya magasabb a szubtrópusi halakban, mint a boreális eredetűekben (32,68 ill. 21,25), ugyanis a meleghez szokott halak esetében nagyobb a telített formák mennyisége.

A fent bemutatott zsírsavösszetételek azonban a diéta hatását is tükrözhetik, bár ez kevésbé valószínű: A boreális halak közül *E. lucius* ragadozó, *A. Brama* zoobentoszt, míg az *A. cernua* zooplanktonokat fogyaszt.

A kérdés további tanulmányozása során azt vizsgáltuk, hogy az egymástól igen különböző táplálék hatása megfigyelhető-e a mi klimatikus viszonyaink között élő állatok agyi foszfolipidjeinek zsírsavösszetételében.

Négy különböző táplálkozási típusba tartozó halfajt vizsgáltunk meg a tanulmány során. Ezek közül *H. molitrix* (fehér busa) többségében fitoplanktonokkal táplálkozott, a *H. nobilis* (pettyes busa) zooplanktonokat fogyasztott, míg a *C. idella* (amur) magasabbrendű növényekkel, a közönséges ponty a *C. carpio* pedig kukoricával és gabonafélékkel ill. zoobentosz szervezetekkel táplálkozott.

A különböző halfajok által elfogyasztott táplálék lényeges eltérést mutat zsírsavösszetételét tekintve. A magasabbrendű növények igen szegények hosszú szénláncú politelítetlen zsírsavakban, a fito- és zooplanktonok ezen zsírsavakat változó arányban tartalmazzák.

5. Táblázat. Édesvízi halak természetes táplálékának zsírsavösszetétele

| Zsírsavak | ALGÁK | | RÁKOK | |
|-----------|-------------------------|---------------------------|---|--|
| | Zöld algák ¹ | Kovamoszatok ² | Cladocera ³ (ágascsapú rákok) | Copepoda ⁴ (evezőlábú rákok) |
| 14:0 | - | 4.94 | 4.38 | 2.96 |
| 16:0 | 46.6 | 12.20 | 11.77 | 18.50 |
| 16:1 | 2.6 | 15.28 | 11.57 | 8.79 |
| 18:0 | 6.3 | 3.75 | 4.81 | 5.92 |
| 18:1n-9 | 9.7 | 5.30 | 12.89 | 10.97 |
| 18:2n-6 | 13.2 | 3.74 | 5.74 | 6.68 |
| 18:3n-3 | 21.48 | 1.42 | 7.59 | 7.18 |
| 20:2n-6 | - | 0.27 | 0.21 | 0.23 |
| 20:3n-6 | - | 0.17 | 0.90 | 1.00 |
| 20:4n-6 | - | 1.54 | 3.06 | 3.35 |
| 20:4n-3 | - | Tr | 0.48 | 0.78 |
| 20:5n-3 | - | 15.34 | 9.15 | 5.29 |
| 22:4n-6 | - | 0.34 | 0.76 | 0.89 |
| 22:5n-6 | - | 0.32 | 0.56 | 1.86 |
| 22:5n-3 | - | 0.28 | 0.28 | 1.17 |
| 22:6n-3 | - | 2.13 | 1.46 | 5.23 |

¹:3 faj átlaga (37), ²: 8 faj átlaga (38), ³: 15 faj átlaga (38), ⁴: 5 faj átlaga (38).

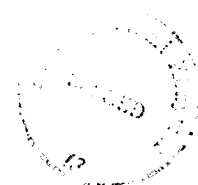
Az 5. táblázat adatai többségében az irodalomból (37, 38) származnak, kivétel a kovamoszatra vonatkozóak, melyek a Balatonból erednek és laboratóriumunkban lettek analizálva.

A táblázatban szereplő zöldalgák lipidjei meglehetősen gazdagok a kloroplasztok típusos zsírsavjaiban, 18:2 ω -6 ill. 18:3 ω -3-ban, míg a kovamoszatok szegények ezen zsírsavakban, de gazdagabbak hosszú láncú politelítetlenekben, különösen 20:5 ω -3-ban. Dokozaheksaénsav hiányzik a zöldalgákból, de a kovamoszatokban jelen van kis mennyiségben.

Az ágascsapú rákok (cladocera) és az evezőlábú rákok (copepoda) mérsékelt mennyiségben tartalmaznak linol-, linolén-, eikozapentaén- ill. dokozaheksaénsavat. Nem áll rendelkezésünkre adat a *C. idella* által fogyasztott magasabbrendű vízinövények zsírsavösszetételére, de az hasonló lehet a zöldalgákhoz. A kukorica és búza is hasonló lehet a zöldalgához, mindkettő gazdag linol- és linolénsavban.

A 6. táblázat négyféle hal agyi zsírsavösszetételét mutatja. Feltűnő, hogy a felvett táplálék zsírsavösszetétele nem tükröződik az agyi lipidek zsírsavösszetételében. A 22:6 aránya majdnem azonos mind a négy halféleségben.

Mindezek alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy igen különböző minőségű táplálék fogyasztása ellenére a megfigyelt állatok agyi foszfolipid zsírsavösszetétele meglehetősen állandó (22:6 ω -3: 21%, 22%, 18%, 23%; 18:1 ω -9: 26%, 21%, 24%, 20%) vagyis az agy homeosztázisát fenntartva kompenzálja a táplálék minőségéből adódó különbségeket, biztosítva így összetételének állandóságát.



6. Táblázat. Hideg-adaptált édesvízi halak agyi foszfolipid zsírsavösszetétele

| Zsírsavak | H. molitrix | H. nobilis | C. idella | C. carpio |
|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 14:0 | 0.57 | 0.90 | 0.59 | 0.53 |
| DMA16:0 | 1.10 | 0.93 | 1.62 | 1.15 |
| 16:0 | 16.32 | 15.86 | 16.43 | 11.49 |
| 16:1 | 6.10 | 7.26 | 5.36 | 9.46 |
| DMA18:0 | 3.15 | 2.59 | 3.55 | 4.65 |
| DMA18:1 | 2.12 | 1.45 | 2.49 | 3.52 |
| 18:0 | 10.00 | 7.63 | 9.05 | 8.63 |
| 18:1n-9 | 26.97 | 21.83 | 24.54 | 20.00 |
| 18:2n-6 | 0.19 | 0.38 | 0.42 | 0.45 |
| 18:3n-3 | 0.14 | 0.16 | 0.49 | - |
| 20:1n-9 | 0.47 | 0.91 | 1.81 | - |
| 20:2n-6 | Tr | 0.06 | 0.15 | 0.57 |
| 20:3n-6 | 1.52 | 0.05 | 0.91 | 0.44 |
| 20:3n-3 | 0.30 | 0.35 | 0.50 | - |
| 20:4n-6 | 4.17 | 4.02 | 6.14 | 7.07 |
| 20:5n-3 | 1.71 | 1.89 | 1.16 | 1.69 |
| 22:3n-3 | 0.08 | 0.51 | 0.21 | - |
| 22:4n-6 | 0.92 | 2.24 | 0.68 | 0.60 |
| 22:5n-3 | 2.24 | 2.88 | 2.17 | 1.74 |
| 22:6n-3 | 21.05 | 22.13 | 18.85 | 23.50 |

DMA: dimetilacetát

Az 5. és 6. táblázatban szereplő adatok csak durva tájékoztatást adnak a felvett zsírsavak lehetséges zsírsavösszetételéről, további információk szerzése céljából megvizsgáltuk a zsírszövetek zsírsavösszetételét is abból a megfontolásból kiindulva, hogy a depó zsírok zsírsavösszetétele jól mutatja a felvett zsírok zsírsavösszetételét. Az adatok a 7. táblázatban láthatók.

7. Táblázat. Különböző táplálkozású halfajok zsírszövetének zsírsavösszetétele

| Zsírsavak | H. molitrix | H. nobilis | C. idella | C. carpio |
|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 14:0 | 4.51 | 4.24 | 2.60 | 0.89 |
| 14:1 | 1.23 | 1.13 | 0.31 | 0.11 |
| 15:0 | 1.05 | 1.22 | 0.20 | 0.10 |
| 16:0 | 15.49 | 15.75 | 22.07 | 14.01 |
| 16:1 | 12.43 | 12.82 | 17.69 | 6.82 |
| 16:2 | 0.91 | 1.45 | 0.15 | 0.13 |
| 16:3 | 1.76 | 1.13 | 0.30 | 0.12 |
| 16:4 | 0.93 | 0.85 | - | - |
| 18:0 | 3.43 | 2.63 | 2.31 | 5.15 |
| 18:1 | 20.49 | 21.34 | 34.04 | 53.57 |
| 18:2 | 3.40 | 3.30 | 9.89 | 7.86 |
| 18:3 | 6.12 | 6.12 | 1.55 | 1.15 |
| 18:4 | 0.87 | 1.27 | - | 0.20 |
| 20:1 | 1.68 | 1.90 | 0.84 | 3.18 |
| 20:2 | - | 0.53 | 0.25 | - |
| 20:3 | 0.43 | 0.54 | 0.72 | 0.20 |
| 20:3 | 0.48 | 0.53 | 0.40 | 0.77 |
| 20:4 | 2.49 | 2.33 | 0.58 | 1.17 |
| 20:4 | 0.45 | 0.75 | - | 0.67 |
| 20:5 | 2.00 | 1.91 | - | 0.26 |
| 20:5 | 7.35 | 5.92 | 0.26 | 0.30 |
| 22:3 | - | - | - | - |
| 22:4 | - | 0.38 | - | - |
| 22:5 | 0.86 | 1.02 | - | 0.10 |
| 22:5 | 1.68 | 1.83 | - | - |
| 22:6 | 5.86 | 4.89 | - | 0.11 |

Meglepő, hogy a spekulált és a deponált zsír zsírsavösszetétele lényeges vonalakban megjelenik pl. a *H. nobilis* esetében, melyről közismert, hogy tápláléka linol-, linolén- ill. eikozapentaénsavat mérsékelt mennyiségben (5.74, 7.59, 5.29) tartalmaz, e zsírsavak megjelenését is hasonló arányban (3.3, 6.12, 5.92) figyelhetjük meg. Említésre érdemes még az ágascsapú rákokban 4.38, 11.77 ill. 11.57 arányban előforduló 14:0, 16:0 ill. 16:1 zsírsavak, melyek zsírszövetbeni mennyiségükkel (4.24, 15.75 ill. 12.82) egyértelműen tükrözik a fenti arányokat. Kiemelendő, hogy az evezőlábú rákokban előforduló 22:6 mennyisége 5.23, pontosan tükröződik a zsírszövetben láthatóval, azaz 4.89-el. A *H. molitrix* esetében is megfigyelhetjük, hogy a kovamoszatokbeli zsírsavösszetétel arányok (14:0 4.94; 16:0 12.20; 16:1 15.28; ...stb) mennyisége majdnem azonos a zsírszövetben találhatókkal (14:0 4.51; 16:0 15.49; 16:1 12.43;...stb). A *C. idella* zsírszövetében nem találhatók hosszú láncú politelítetlen zsírsavak, ami abból adódik, hogy azok a táplálékul szolgáló magasabbrendű növényekben is csak csekély mennyiségben fordulnak elő.

Ebből egyrészt arra lehet következtetni, hogy a halak agyi zsírsavösszetétele meglehetősen független a táplálékként felvett zsírsavak összetételétől, másrészt, hogy agyi zsírsavösszetételük igen stabil.

2. Szinaptikus membránok

Az összes foszfolipid zsírsavösszetétele csak hozzávetőleges választ ad az individuális membránok zsírsavösszetételéről. A probléma finomítására vizsgálatainkat a szinaptikus plazmamembránokra is kiterjesztettük, mégpedig a hőmérsékleti evolúció vonatkozásában.

8. Táblázat. Gerinces fajok (hideg-adaptált halak, meleg-adaptált halak, patkányok ill. madarak) agyi összes lipid szinaptikus plazmamembrán zsírsavösszetétele

| Zsírsavak | Hideg-adaptált hal | Meleg-adaptált hal | Patkány | Madár |
|----------------|--------------------|--------------------|--------------|--------------|
| 12:0 | 2.02 | 7.91 | 1.40 | 6.52 |
| 14:0 | 1.69 | 9.94 | 1.64 | 9.48 |
| 14:1 | 2.26 | 4.44 | 0.79 | 0.10 |
| 15:0 | 0.30 | 2.52 | 0.74 | 0.14 |
| 15:1 | 0.17 | 0.62 | - | - |
| 16:0 | 20.59 | 20.05 | 20.30 | 23.39 |
| 16:1 | 1.94 | 2.42 | 0.51 | 1.14 |
| 16:2 | 0.14 | 1.65 | 0.22 | 1.76 |
| 16:3 | 0.26 | 1.38 | 2.69 | - |
| 18:0 | 11.64 | 10.64 | 19.81 | 20.90 |
| 18:1n-9 | 16.98 | 14.84 | 17.35 | 13.71 |
| 18:2n-6 | 6.01 | 2.57 | 2.31 | 0.46 |
| 18:3n-3 | 0.46 | - | 0.80 | 0.45 |
| 18:4n-3 | 1.76 | 0.60 | - | - |
| 20:2n-6 | 0.23 | - | 0.80 | 1.00 |
| 20:3n-3 | - | 0.54 | 0.55 | 0.58 |
| 20:4n-6 | 6.09 | 3.02 | 9.82 | 7.04 |
| 20:5n-3 | 0.66 | 1.38 | - | - |
| 22:4n-6 | 0.26 | 0.63 | 0.96 | 1.80 |
| 22:5n-6 | 0.94 | 0.54 | 3.27 | 0.24 |
| 22:5n-3 | 1.23 | 1.35 | 3.11 | 0.24 |
| 22:6n-3 | 24.14 | 12.90 | 12.61 | 10.69 |

A 8. táblázat hideghez (5°C), meleghez (25°C) adaptált halak, patkányok (37°C) és madarak (41°C) agyi totál lipid szinaptikus plazmamembrán zsírsavösszetételét mutatja be. Szembetűnő, hogy a 22:6 zsírsav szintje fordított arányban van a test/környezet

hőmérséklet változásaival (hideg-adaptált hal 24.14 %, meleg-adaptált hal 12.9 %, patkány 12.61 %, madár 10.69 %).

3. Foszfolipidek molekuláris összetétele

A továbbiakban finomabb szerkezeti összetételében voltunk kíváncsiak az eltérő hőmérséklet hatására indukálódott változásokra, ezért elválasztottuk a foszfolipidek számunkra fontos alosztályait (PC és PE) megfelelő vékonyréteg kromatográfiás technikával, majd alcsoportjai diacil-, alkilacil-, ill. alkenilacil-foszfátidiletanolamin és -foszfátidilkolin közül elsősorban a diacilfoszfátidiletanolamin és diacilfoszfátidilkolin molekulaszpecisz összetételét vizsgáltuk.

Míthogy az egyes foszfolipidekben a glicerolvázhoz két zsírsav kapcsolódik, így a biológiai membránokban található nagyszámú zsírsav segítségével a kombináció rengeteg molekulaszpecisz létrejöttét eredményezi.

A 9. táblázat a különböző hőmérsékletekhez szokott halak agyi diacil-foszfátidiletanolamin és diacilfoszfátidilkolin molekulaszpecisz összetételét tükrözi.

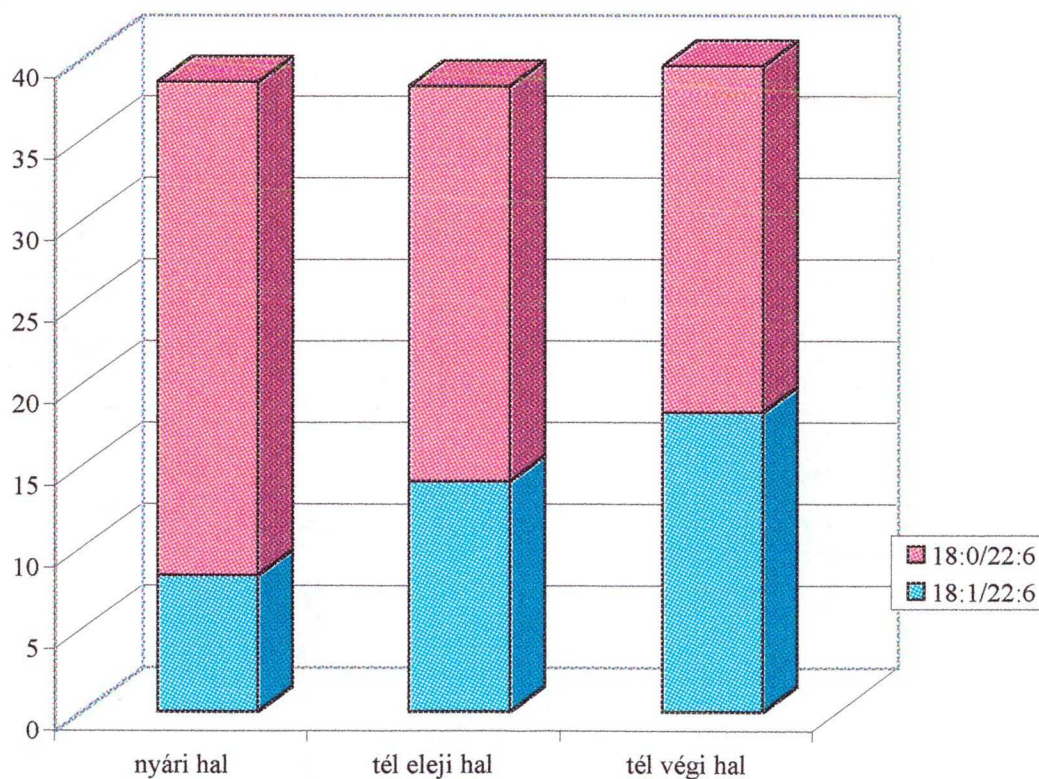
A feltüntetett fontosabb molekulaszpeciszek közül a 18:1/22:6 PE az, melynek mennyisége érdekesen változik, megfigyelhető, hogy nyár végén 8.35, tél elején 14.15, tél végére pedig 18.36-ra nő. Ellentétben a másik szintén figyelemre méltó 18:0/22:6 PE molekulaszpecisszel, mely az előzőhöz viszonyítva, csökkenő tendenciát mutat. A 16:0/22:6 PE szintje állandó az egész év folyamán, de a 16:1/22:6 PE specisz szintjében történt változást nem tudjuk kimutatni, valószínűleg nem a technika alkalmatlansága miatt, hanem mennyisége a detektálhatóság határán lehetett. Tőkehal (26) és szivárványos pisztráng (25) agyban ez a specisz nem fordul elő.

9. Táblázat. Különböző hőmérsékletekhez adaptált pontyok agyi diacilfoszfatidiletanolamin és diacilfoszfatidilkolin molekulaszétszerkezeti összetétele

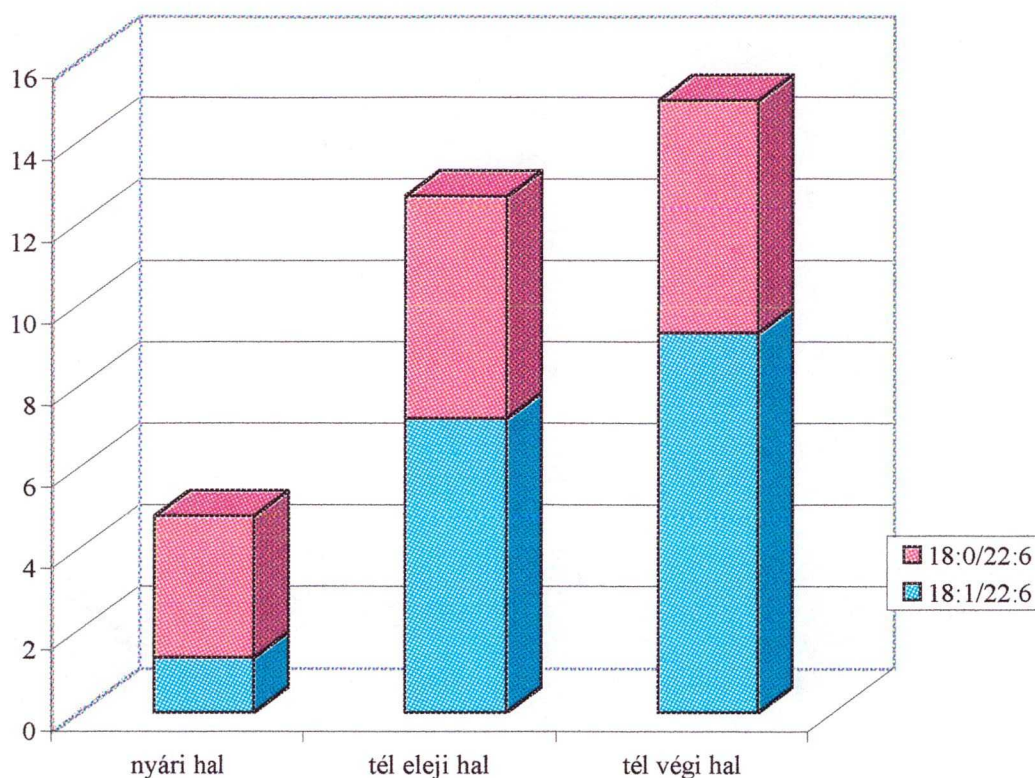
| Molekula-specieszek | Diacilfoszfatidiletanolamin | | | Diacilfoszfatidilkolin | | |
|---------------------|-----------------------------|-----------------|----------------|------------------------|-----------------|----------------|
| | Nyári halak | Tél eleji halak | Tél végi halak | Nyári halak | Tél eleji halak | Tél végi halak |
| 20:5/22:6 | - | 0.20 | 0.20 | - | 0.04 | 0.05 |
| 22:6/22:6 | - | 2.60 | 6.43 | - | 1.97 | 1.24 |
| 20:4/20:5 | - | - | - | - | - | - |
| 16:1/20:5 | - | - | - | - | - | - |
| 20:4/20:4 | 1.36 | 6.00 | 3.31 | 0.11 | 2.56 | 3.48 |
| 18:1/20:5 | 0.16 | 0.50 | 0.35 | 0.30 | 0.65 | - |
| 18:1/22:6 | 8.35 | 14.15 | 18.36 | 1.35 | 7.21 | 9.32 |
| 16:0/22:6 | 12.86 | 12.48 | 12.98 | 6.20 | 23.87 | 30.11 |
| 18:1/22:5 | 0.78 | 3.16 | 3.66 | 0.10 | 0.15 | 1.13 |
| 18:1/20:4 | 4.10 | 7.13 | 5.13 | 1.54 | 4.11 | 2.80 |
| 16:0/20:4 | 5.5 | 2.4 | 2.0 | 2.8 | 3.94 | 2.5 |
| 18:0/20:5 | 0.22 | 1.65 | 0.25 | - | 1.48 | 0.42 |
| 18:0/22:6 | 30.27 | 24.22 | 21.22 | 3.47 | 5.47 | 5.70 |
| 16:0/18:2 | 1.60 | 3.90 | 3.90 | 16.80 | 5.24 | 0.44 |
| 18:0/20:4 | 10.88 | 9.43 | 7.43 | 3.14 | 10.28 | 12.01 |
| 18:0/16:1 | - | - | - | 1.19 | 0.10 | 0.16 |
| 18:1/18:1 | 1.48 | 6.04 | 0.64 | 3.56 | 5.00 | 5.27 |
| 16:0/18:1 | 4.73 | 4.00 | 3.80 | 34.12 | 12.84 | 14.16 |
| 16:0/16:0 | 6.26 | 0.31 | 0.81 | 8.65 | 0.21 | 0.57 |
| 18:0/18:1 | 7.8 | 2.0 | 1.5 | 7.6 | 3.5 | 2.4 |
| 16:0/18:0 | 0.04 | 1.72 | 1.72 | 0.77 | 0.19 | 2.57 |
| 18:0/18:0 | 0.51 | 0.54 | 0.54 | 0.85 | 0.90 | 0.90 |

A hosszú szénláncú politelítetlen molekulaspecieszek a nyári halakban hiányoznak, mennyiségük pl. 22:6/22:6 PE esetében tél elején 2.6-ra nő, tél végére pedig eléri a 6.43-t. A PC specieszeket tekintve a nyári halakban a 16:0/18:1 speciesz dominál, s kisebb mennyiségben 16:0/18:2 speciesz is megfigyelhető, mennyisége a hőmérséklet csökkenésével párhuzamosan változik.

Ha az előzőekben említett két molekulaspeciesz, 18:1/22:6 PE és 18:0/22:6 PE összegét tekintjük, látható (4. ábra), hogy megközelítőleg azonos, azaz nyár végén 38.62, tél elején 38.37 tél végén pedig 39.58 volt összegük. Ugyanezt a PC esetében nem lehet kimutatni. A 18:1/22:6 és 18:0/22:6 PC molekulaspecieszek összegének szintje emelkedik az adaptáció előrehaladtával (5. ábra).



4. Ábra. A 18:1/22:6 PE és 18:0/22:6 PE molekulaspecieszek mennyisége illetve összege a hőmérséklet változás függvényében



5. Ábra. A 18:1/22:6 PC és 18:0/22:6 PC molekulaszpeciszek mennyisége illetve összege a hőmérséklet változás függvényében

A 10. táblázat szubtrópusi halak agyi diacilfoszfátidilkolin és diacilfoszfátidiletanolamin molekulaszpecisz összetételét mutatja be. A táblázatban megfigyelhető molekulaszpecisz összetétel hasonló megoszlást tükröz, mint a meleghez szokott halaink esetében. A 18:0/22:6 PE molekulaszpecisz mennyisége a *Clareas sp.*-ben 21.78, a *Channa sp.*-ben 17.33, a meleghez adaptált halak esetében pedig 21.53. A 18:1/22:6 PE szintje viszont lényegesen alacsonyabb a két szubtrópusi hal agyában, mint a meleg-adaptált pontyében. Az evolúciósan különböző hőmérsékletre szokott halakban ezen molekulaszpecisz mennyisége közel azonos.

10. Táblázat. Szubtrópusi halak agyi diacilfoszfatidilkolin és diacilfoszfatidiletanolamin molekulaszpecisz összetétele

| Molekula-specieszek | Diacilfoszfatidilkolin | | Diacilfoszfatidiletanolamin | |
|---------------------|------------------------|------------|-----------------------------|------------|
| | Clarias sp. | Channa sp. | Clarias sp. | Channa sp. |
| 20:5/22:6 | 7.02 | - | - | - |
| 22:6/22:6 | 1.83 | 0.65 | 0.91 | 0.78 |
| 18:1/22:6 | 1.94 | 0.65 | 0.91 | 0.70 |
| 16:0/22:6 | 1.76 | 4.39 | 5.16 | 7.14 |
| 18:1/20:4 | Tr | 1.68 | 2.04 | 1.57 |
| 16:0/20:4 | 3.51 | 2.00 | 3.25 | 2.49 |
| 18:0/22:6 | 35.10 | 18.79 | 21.78 | 17.33 |
| 16:0/18:2 | 2.61 | 4.47 | 5.97 | 1.96 |
| 18:0/20:4 | 16.72 | 11.32 | 5.59 | 4.98 |
| 18:0/16:1 | 5.02 | 3.88 | 3.98 | 2.17 |
| 18:1/18:1 | 2.55 | 5.25 | 5.16 | 3.32 |
| 18:0/18:2 | - | 6.80 | - | 11.82 |
| 16:0/18:1 | 6.77 | 13.85 | 26.25 | 33.10 |
| 16:0/16:0 | 1.69 | 8.20 | 5.29 | 4.12 |
| 18:0/18:1 | 13.36 | 7.00 | 10.84 | 7.83 |
| 16:0/18:1 | - | 0.79 | 0.52 | - |

4. Táplálkozási szokás és a foszfolipidek molekuláris összetétele

A 11. táblázatban szereplő halak ugyan táplálékukban jelentős mértékben eltérnek, individuális molekulaszpecieszek hidegadaptáció után is megközelítőleg azonos értéket képviselnek.

11. Táblázat. Különböző táplálkozású hideg-adaptált halak agyi diacilfoszfatidilkolin ill.

diacilfoszfatidiletanolamin molekulaszpecisz összetétele

| Molekula- specieszek | Diacilfoszfatidilkolin | | | | Diacilfoszfatidiletanolamin | | | |
|-------------------------|------------------------|---------------|--------------|--------------|-----------------------------|---------------|--------------|--------------|
| | H. molitrix | H. nobilis | C. idella | C. carpio | H. molitrix | H. nobilis | C. idella | C. carpio |
| 20:5/22:6 | 0.74 | 0.40 | 0.63 | 0.04 | 1.45 | 3.47 | 6.98 | 0.20 |
| 22:6/22:6 | 0.20 | 0.62 | 0.23 | 1.97 | 7.45 | 7.20 | 2.11 | 2.60 |
| 20:4/20:5 | 0.12 | - | 0.10 | - | 0.89 | - | 1.35 | - |
| 16:1/20:5 | - | - | - | - | 0.35 | - | - | - |
| 20:4/20:4 | 1.32 | 1.65 | 1.52 | 2.56 | 3.04 | 4.77 | 4.31 | 6.00 |
| 18:1/20:5 | 0.40 | 0.55 | 0.11 | 0.25 | 0.50 | 1.05 | 1.71 | 0.50 |
| 16:0/20:5 | - | 0.37 | 0.46 | - | - | - | - | - |
| 18:1/22:6 | 5.02 | 3.95 | 3.32 | 3.54 | 16.52 | 16.18 | 11.83 | 14.15 |
| 16:0/22:6 | 15.10 | 15.34 | 13.85 | 11.28 | 15.34 | 15.78 | 13.28 | 12.48 |
| 18:1/22:5 | 1.33 | - | 2.89 | 1.13 | 0.52 | 0.51 | - | 3.16 |
| 18:1/20:4 | 2.65 | 2.80 | 3.45 | 4.59 | 4.81 | 4.62 | 9.09 | 7.13 |
| 16:0/20:4 | 2.34 | 2.48 | 1.33 | 3.12 | 3.50 | 3.27 | 6.69 | 2.35 |
| 18:0/20:5 | 0.28 | 0.32 | 3.15 | 0.98 | 1.18 | 1.56 | 0.10 | 1.65 |
| 18:0/22:6 | 6.34 | 6.49 | 2.66 | 15.70 | 20.75 | 18.50 | 16.22 | 24.22 |
| 16:0/18:2 | 8.57 | 12.63 | 13.68 | 2.58 | 1.32 | 1.52 | 2.78 | 3.90 |
| 18:0/20:4 | 2.61 | 1.77 | 0.44 | 15.19 | 5.87 | 5.54 | 9.82 | 9.43 |
| 18:0/16:1 | 1.47 | - | 0.22 | 0.11 | 1.38 | 0.16 | - | - |
| 18:1/18:1 | 5.07 | 4.50 | 4.82 | 3.41 | 0.24 | 5.49 | 0.48 | 6.04 |
| 16:0/18:1 | 28.11 | 26.74 | 28.82 | 23.16 | 6.28 | 3.05 | 5.93 | 4.00 |
| 16:0/16:0 | 3.90 | 4.21 | 3.72 | 1.57 | 2.76 | 0.10 | 2.84 | 0.31 |
| 18:0/22:4 | 0.78 | 0.92 | 0.90 | 0.58 | 0.90 | 0.62 | 0.75 | 0.40 |
| 16:0/18:1 | 7.36 | 6.21 | 6.23 | 5.55 | 2.57 | 2.29 | 1.79 | 2.05 |
| 16:0/18:0 | 0.28 | 0.31 | 0.20 | 0.37 | 0.32 | 0.10 | 0.24 | 1.72 |
| 18:0/18:0 | 1.00 | 2.39 | 3.27 | 0.90 | 0.23 | - | 0.19 | 0.54 |

Megvizsgálva az 1-monoén 2-polién PE molekulaszpeciesteket láthatjuk, hogy pl. a 18:1/22:6 PE speciesz mennyisége a *H. molitrix*, *H. nobilis*, *C. idella* és *C. carpio* esetében 16.52, 16.18, 11.83 ill. 14.15. A 18:1/20:4 PE speciesz is közel azonos értékeket mutat, az előző sorrendet követve 4.81, 4.62, 9.09 és 7.13. S ha a fenti két 1-monoén 2-polién molekulaszpeciest összegét vesszük, meglepő, hogy összegük állandó, azaz 21.33, 20.8, 20.92 valamint 21.28.

Összehasonlítva a PC-vel, az említett 1-monoén 2-polién molekulaszpeciestek jóval kisebb mennyiségben fordulnak elő, mint a PE-ben, ellentétben a 16:0/18:1 speciesszel.

5. Hőmérséklet hatása agyi foszfolipidekre kísérletes körülmények között

Felmerült a kérdés, vajon képesek e az individuális molekulaszpeciestek szintjüket gyorsan változtatni például hőmérsékleti stressz hatására.

A 12. és 13. táblázat téli és nyári halakból nyert diacilfoszfatidiletanolamin ill. diacilfoszfatidilkolin molekulaszpeciest összetételének változását szemlélteti különböző hőmérsékleti hatásokra.

Kísérleteink során három napra 5°C-ról 25°C-ra melegítettük a vízfürdő hőmérsékletét, majd szintén három nap múlva visszahűtöttük eredeti hőmérsékletre. A molekulaszpeciest összetételt elemezve kitűnik, hogy a 18:1/22:6 PE speciesz mennyisége felmelegítéskor a 18.36-ról 11.48-ra csökkent, de nem változott az aránya visszahűtéskor (11.16). S minthogy viszont választ nem tapasztaltunk, ezért megpróbáltuk nyári halakon elvégezni a fenti kísérletet, azaz 25°C-ról 5°C-ra, majd újból 25°C-ra változtattuk a vízfürdő hőmérsékletét. A táblázat alapján ebben a kísérletsorozatban is a 18:1/22:6 PE speciesz mennyisége fordítottan arányos a környezeti hőmérséklet változásával.

A kiindulási 25°C-on 8.35-ről 5°C-ra való lehűtéskor aránya 10.8-ra nőtt, majd a visszamelegítéskor az eredetit megközelítő értékre 8.78 állt vissza. A fenti 1-monoén 2-polién molekulaszpeciest mennyiségében jellegzetes különbségek voltak összhangban az akklimatizációs hőmérséklettel.

Mint ahogy a mérési hiba kisebb, mint 10%, ezek az eredmények elfogadhatóak és arra mutatnak, hogy az ilyen típusú szpeciestek szerepet játszanak az adaptációs folyamatokban. A foszfatidilkolinok esetében ez a fajta gyors reakció nem jelentkezik.

A PC-ben a 16:0/22:6, 16:0/18:1, és a 18:0/22:6 és szpeciest dominált, ehhez hozzájárult még a PE-ben a 18:1/22:6, 18:1/20:4. A 18:0/22:6 nagyobb mennyiségben volt jelen meleghez adaptálódott halak PE-ben, mint az alacsony hőmérséklethez szokottakban. Karakterisztikus különbségek jelentkeztek a 18:1/22:6 szpeciest esetében, ami jelentősen magasabb volt a PE-ben mind a hideg, mind a meleg adaptált halaknál. A 18:1/20:4 PE molekulaszpeciest szintje is magasabb volt a hideghez adaptálódott szervezetekben, mint a meleghez szokottakéban.

12. Táblázat. Hőmérsékleti stressz hatása téli halak agyi diacilfoszfatidilkolin és diacilfoszfatidiletanolamin molekulaszpecisz összetételére

| Molekula-specieszek | Diacilfoszfatidilkolin | | | Diacilfoszfatidiletanolamin | | |
|---------------------|------------------------|--------------|--------------|-----------------------------|--------------|--------------|
| | 5/5°C | 5/25°C | 5/25/5°C | 5/5°C | 5/25°C | 5/25/5°C |
| 20:5/22:6 | 0.09 | - | 0.04 | 0.20 | - | 0.02 |
| 22:6/22:6 | 1.24 | 1.53 | 1.05 | 6.43 | 4.33 | 5.26 |
| 22:5/22:6 | - | - | - | 1.94 | 0.90 | 1.76 |
| 16:1/20:5 | - | - | - | - | - | - |
| 20:4/20:4 | 3.48 | 3.00 | 2.57 | 3.31 | 1.97 | 1.61 |
| 18:1/20:5 | - | - | 1.00 | 0.35 | - | 0.54 |
| 18:1/22:6 | 9.32 | 6.32 | 4.63 | 18.36 | 11.48 | 11.16 |
| 16:0/22:6 | 30.11 | 20.76 | 16.48 | 12.98 | 11.95 | 12.53 |
| 18:1/22:5 | 1.13 | 2.00 | 0.57 | 3.66 | 1.33 | 1.20 |
| 18:1/20:4 | 2.90 | 3.74 | 2.42 | 5.13 | 4.72 | 5.78 |
| 16:0/20:4 | 2.04 | 5.84 | 4.71 | - | - | - |
| 18:0/20:5 | 0.42 | 0.41 | 0.42 | 0.25 | 0.16 | 2.19 |
| 18:0/22:6 | 9.70 | 8.89 | 7.33 | 21.22 | 21.53 | 23.13 |
| 16:0/18:2 | 0.44 | 0.21 | 8.06 | 3.90 | 3.54 | 4.26 |
| 18:0/20:4 | 12.01 | 12.07 | 5.27 | 7.43 | 9.37 | 10.37 |
| 18:0/16:1 | 0.16 | 2.11 | 1.43 | - | 4.56 | - |
| 18:1/18:1 | 5.27 | 4.53 | 4.71 | 0.64 | 5.31 | 0.31 |
| 16:0/18:1 | 14.61 | 18.67 | 24.90 | 3.80 | 4.59 | 5.98 |
| 16:0/16:0 | 0.57 | 0.88 | 1.84 | 0.81 | 0.85 | 1.60 |
| 18:0/20:4 | - | - | - | - | - | - |
| 18:0/22:4 | 0.09 | 0.05 | 0.03 | - | 0.54 | 2.34 |
| 16:0/18:1 | 1.48 | 1.20 | 1.43 | 2.39 | 1.75 | 2.66 |
| 16:0/18:0 | 2.57 | 3.16 | 5.28 | 1.72 | 2.11 | 3.08 |
| 18:0/18:0 | 0.90 | 0.90 | 1.17 | 0.54 | 0.47 | - |

13. Táblázat. Hőmérsékleti stressz hatása nyári halak agyi diacilfoszfatidilkolin és diacilfoszfatidiletanolamin molekulaszpeciesz összetételére

| Molekula- specieszek | Diacilfoszfatidilkolin | | | Diacilfoszfatidiletanolamin | | |
|-------------------------|------------------------|-------------|-------------|-----------------------------|--------------|--------------|
| | 25/25°C | 25/5°C | 25/5/25°C | 25/25°C | 25/5°C | 25/5/25°C |
| 20:5/22:6 | - | - | - | - | - | - |
| 22:6/22:6 | - | - | - | - | - | - |
| 22:5/22:6 | - | - | - | - | - | - |
| 16:1/20:5 | - | - | - | - | - | - |
| 20:4/20:4 | 0.11 | 0.14 | 0.26 | 1.36 | 2.54 | 1.07 |
| 18:1/20:5 | 0.30 | 0.42 | 0.59 | 0.16 | 1.55 | 0.27 |
| 18:1/22:6 | 1.35 | 1.87 | 1.92 | 8.35 | 10.80 | 8.78 |
| 16:0/22:6 | 6.20 | 7.89 | 6.67 | 12.86 | 10.64 | 15.95 |
| 18:1/22:5 | 0.10 | 0.07 | 0.52 | 0.78 | - | 1.07 |
| 18:1/20:4 | 1.54 | 1.65 | 0.96 | 4.10 | 7.31 | 4.14 |
| 16:0/20:4 | 2.79 | 2.84 | 2.03 | 5.27 | 7.11 | 5.48 |
| 18:0/20:5 | - | 0.05 | 0.10 | 0.22 | 0.15 | 0.23 |
| 18:0/22:6 | 3.47 | 3.30 | 4.38 | 30.27 | 11.11 | 25.44 |
| 16:0/18:2 | 16.70 | 10.30 | 8.96 | 1.60 | 4.83 | 1.62 |
| 18:0/20:4 | 3.14 | 8.08 | 1.52 | 10.88 | 10.80 | 10.88 |
| 18:0/16:1 | 1.19 | 0.40 | 1.42 | - | 1.43 | 0.30 |
| 18:1/18:1 | 3.56 | 3.52 | 3.38 | 1.48 | 5.25 | 4.33 |
| 16:0/18:1 | 34.12 | 36.00 | 32.54 | 4.73 | 5.15 | 7.41 |
| 16:0/16:0 | 8.65 | 6.80 | 7.31 | 6.26 | 0.91 | 0.71 |
| 18:0/20:4 | - | - | - | 1.01 | 1.10 | 0.70 |
| 18:0/22:4 | 0.36 | 0.30 | 0.36 | - | - | - |
| 16:0/18:1 | 7.60 | 7.42 | 10.53 | 3.73 | 2.97 | 3.49 |
| 16:0/18:0 | 0.77 | 0.60 | 1.02 | 0.04 | 0.03 | 0.10 |
| 18:0/18:0 | 0.85 | 0.94 | 2.58 | 0.51 | 0.04 | 0.20 |

6. Dokozahexaénsav tartalmú molekulaszpeciestek eredete ponty agyban

A dokozahexaénsav linolénsavból képződik fokozatos lánchosszabbítás és dehidrogénezés révén (3. ábra). Kétséges azonban, hogy ez a reakció halak agyában lejátszódna, mivel a prekursor szintje igen alacsony (6. táblázat). Az emlősök analógiája alapján elképzelhető azonban, hogy a dokozahexaénsav fő tömege a májban képződik és innen kerül az agyba. A keringési rendszerben a lipidek fő szállítói a lipoproteinek. Kimutatták, hogy a halak vérében a lipoproteinek szintje magasabb, mint az emlősökben (39) és zsírsavösszetétele, legalábbis a szivárványos pisztráng esetében (40) tükrözi a környezet hőmérsékletét. A 14. táblázatban ponty májból, szérumból és agyból izolált diacilfoszfatidiletanolamin és -kolin molekulaszpeciestek összetételét hasonlítottuk össze. A táblázat adataiból kitűnik, hogy a 18:1/22:6 PC és a 18:0/22:6 PC szintje szinte ugyanaz a májban, szérumban és agyban, ezzel szemben az agyban a PE gazdagabb mind a 18:1/22:6 mind a 18:0/22:6 speciestekben a májhoz ill. a szérumhoz képest.

Az előbbi PE speciestek mennyisége az agyban majdnem kétszerese mind a májbeli, mind a szérumbeli szinthez képest. Utóbbi mennyisége is igen magas, a szérumhoz képest kb kétszeres mennyiségben fordul elő.

14. Táblázat. Ponty máj, szérum és agy diacilfoszfatidiletanolamin és diacilfoszfatidilkolin molekulaszpecisz összetétele

| Molekula-specieszek | Foszfatidiletanolamin | | | Foszfatidilkolin | | |
|---------------------|-----------------------|-------------|-------------|------------------|-------------|-------------|
| | Máj | Szérum | Agy | Máj | Szérum | Agy |
| 22:6/22:6 | - | 2.4 | 2.6 | - | 1.6 | 1.2 |
| 20:4/20:4 | 2.0 | 1.7 | 3.3 | 7.2 | 1.5 | 3.5 |
| 18:4/20:5 | 0.9 | 0.8 | 0.3 | 4.7 | 1.0 | 0.6 |
| 18:1/22:6 | 10.2 | 9.0 | 18.4 | 6.9 | 7.4 | 7.2 |
| 16:0/22:6 | 15.8 | 13.7 | 13.0 | 23.5 | 12.8 | 25.9 |
| 18:1/22:5 | 1.8 | 1.9 | 3.6 | 1.1 | 1.6 | 0.4 |
| 18:1/20:4 | 17.4 | 7.4 | 3.7 | 8.2 | 6.2 | 4.1 |
| 16:0/20:4 | 15.9 | 5.5 | 5.1 | 11.4 | 4.7 | 4.0 |
| 18:1/18:2 | - | 2.8 | - | 0.6 | 0.6 | - |
| 18:0/20:5 | 4.3 | - | 0.2 | - | - | 0.5 |
| 18:0/22:6 | 6.2 | 13.0 | 21.2 | 6.7 | 6.9 | 5.5 |
| 16:0/18:2 | 3.4 | 7.3 | 3.9 | 9.1 | 8.2 | 5.2 |
| 18:0/20:4 | 5.7 | 6.8 | 7.4 | 1.9 | 5.0 | 10.3 |
| 18v1/18:1 | 0.6 | 4.4 | 0.6 | 3.0 | 5.4 | 5.1 |
| 16:0/18:1 | 1.1 | 8.4 | 3.8 | 11.8 | 10.3 | 12.9 |
| 16:0/16:0 | 0.3 | 0.6 | 0.8 | 0.8 | 0.9 | 0.3 |
| 18:0/18:1 | - | 2.2 | 1.7 | 1.7 | 2.5 | 2.2 |
| 16:0/18:0 | - | 0.8 | 0.5 | - | 2.4 | 0.1 |

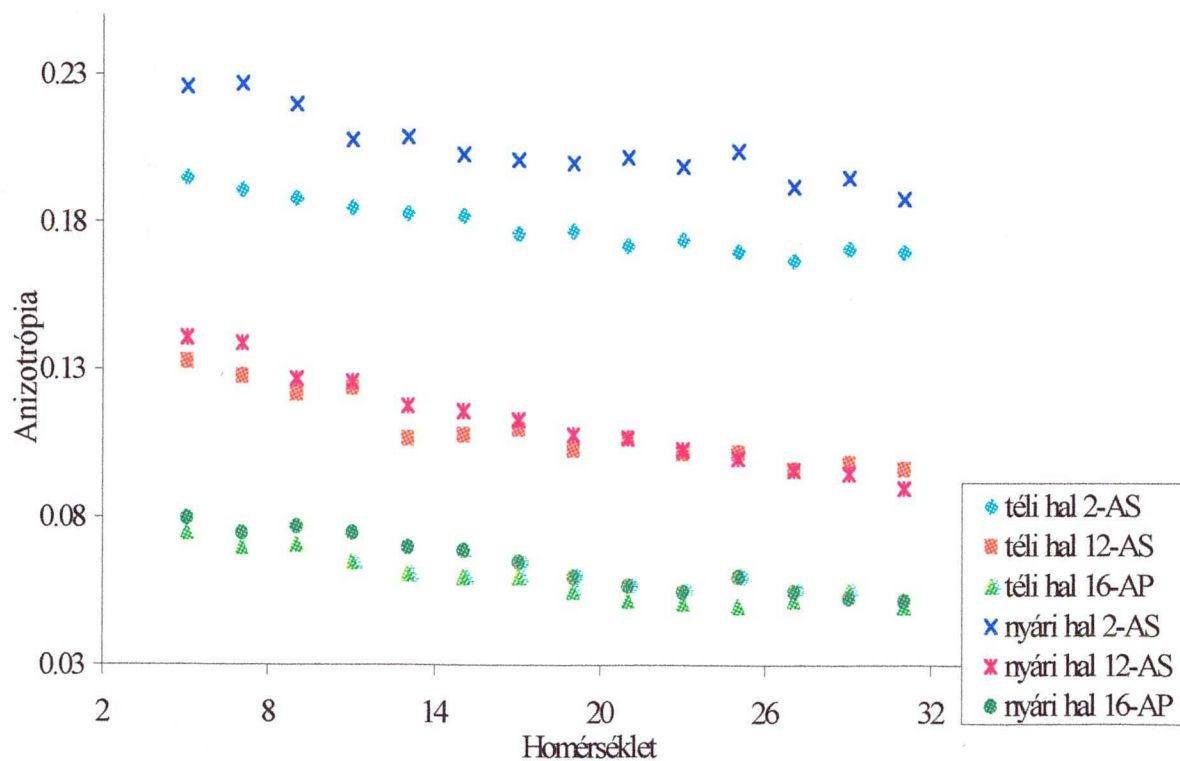
7. Hőmérséklet hatása agyi foszfolipidek fluiditására

A hideghez és meleghez adaptált halak agyi foszfolipid molekuláris összetételében észlelt eltérések várhatóan realizálódnak az ezekből képzett vezikulák rendezettségében

(fluiditásában) is.

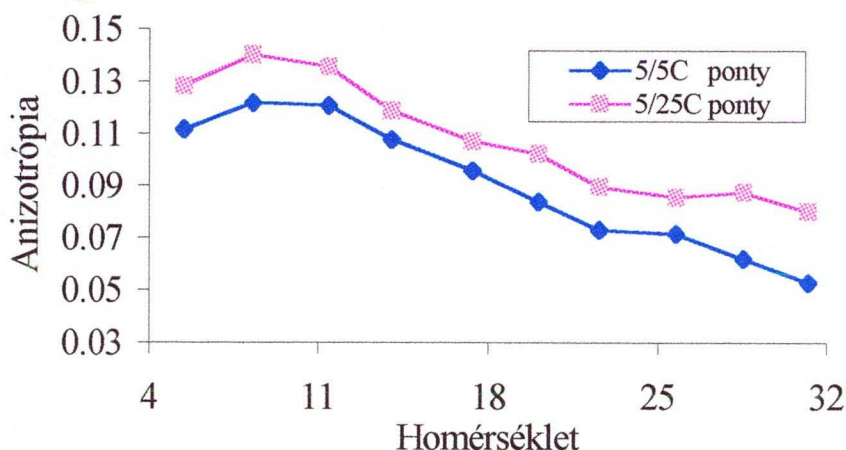
Ez annál is inkább valószínű, mert korábbi modellkísérleteinkben kimutattuk, hogy a 18:1/22:6 foszfatidiletanolamin, a 16:0/22:6 foszfatidiletanolaminnal szemben fluidizálja a mesterséges membránokat, különösen a fejcsoport közelében.

Ennek megfelelően az agyi foszfolipidekből készített vezikulák valóban fluidabbak a fejcsoport közeli régióban a hideghez adaptált halak esetében, a meleghez adaptáltakhoz képest. A méréseinkhez különböző anthroyloxy zsírsavakat (2-, 12-AS, 16-AP) használtunk, melyek a membránok eltérő régiójából (C-2, C-12, C-16) adnak információt (6. ábra).

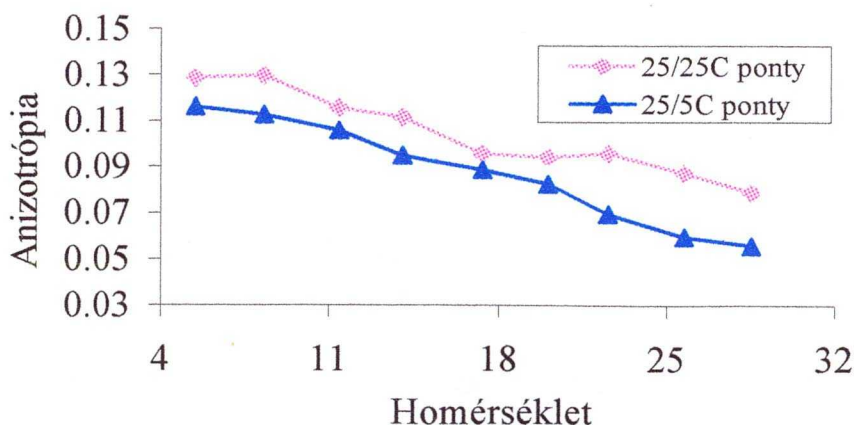


6. Ábra Agyi foszfolipid vezikulák fluiditása hideghez és meleghez adaptált halak esetében

A 7. és 8. ábrán a hőmérséklet változásnak kísérletes körülmények között kitett halak agyából nyert foszfolipidekből készített vezikulák fluiditását mutatjuk be, DPH jelölőt alkalmazva. Az ábrák összehasonlítása azt mutatja, amint várható volt, különbség van a meleghez ill. hideghez szokott halak fluiditása között. Ezen túlmenően mindkét esetben a fluiditások a hőmérséklet változásával párhuzamosan változtak kísérletes körülmények között: a hideghez szokott halakban (7. ábra) merevebbek lettek, ha az állatokat 25°C-ra tettük három napra és fordítva (8. ábra). Ebben a válaszban az 1-monoén 2-polién PE specieszek szintjének változása nyilvánvalóan szerepet játszik (13. táblázat).



7. **Ábra.** Hőstressz hatása agyi foszfolipid vezikulák fluiditására pontyokban



8. **Ábra** Hideg-stressz hatása agyi foszfolipid vezikulák fluiditására pontyokban

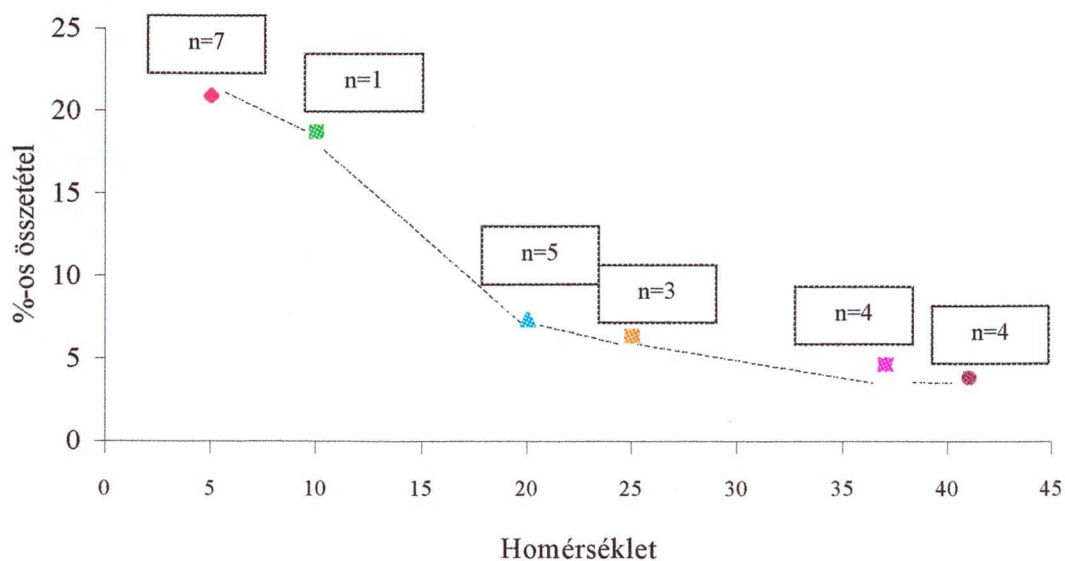


8. Agyi foszfolipidek molekuláris összetétele az evolúciós dimenziókban

Annak eldöntésére, hogy az 1-monoén 2-polién PE specieszek aránya az evolúciós skálán mutat-e összefüggést a testhőmérséklettel, megvizsgáltuk emlősök (szarvasmarha, sertés, juh) és szárnyasok agyi molekulaspeciesz összetételét (15. táblázat).

A 18:1/22:6 speciesz szintje igen alacsonynak bizonyult a 18:1/20:4 speciesszel együtt, ellenben a 16:0/16:0 speciesz mennyisége több volt, különösen a PC-ben.

Nyilvánvaló, hogy korreláció áll fenn az 1-monoén 2-polién (18:1/20:4, 18:1/22:6) molekulaspeciesz mennyisége és a test/környezet hőmérséklet között és általános jelenség lehet (9. ábra). A 9. ábra elkészítéséhez az összes saját és rendelkezésre álló irodalmi adatot felhasználtuk.

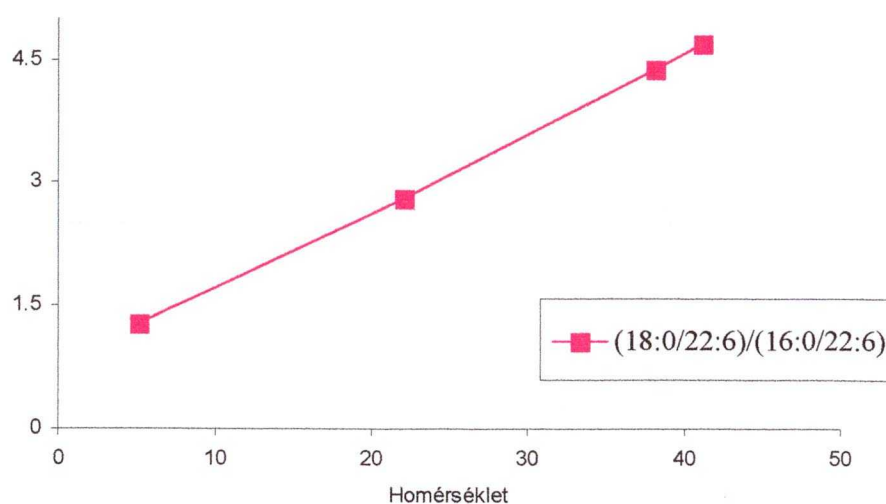


9. Ábra Az 1-monoén 2-polién foszfatidiletanolamin molekulaspeciesz a test/környezet hőmérséklet függvényében gerincesek agyában

A 4. ábra azt mutatta, hogy a 18:1/22:6 foszfatidiletanolamin szintje folyamatosan növekszik pontyan a hőmérséklet adaptáció során, miközben a 22:6 tartalmú molekulaspecieszek összege állandó. Ez az összefüggés érvényes szinte az összes gerincesre, halaktól a madarakig egyaránt (15. táblázat).

Ez a tény hozzájárulhat a membránok megfelelő fluiditásának biztosításához, mivel a 18:1/22:6 PE specieszek nagyobb térigényűek, mint 18:0/22:6 homológjuk (102.6 Å vs. 79.6 Å, (41)), így fluidabb szerkezeteket is képeznek.

Mások méréseiből (42) az is kiderült, hogy azok a foszfolipidek, amelyekben az sn-1 pozíciót 16:0 foglalja el a 18:0 helyett, nagyobb térigényűek. Ha összehasonlítjuk a 18:0/22:6 és 16:0/22:6 arányát a gerinces evolúció során pl. a foszfatidiletanolaminokban, azt tapasztaljuk (10. ábra), hogy ez az arány szinte lineárisan követi a testhőmérséklet növekedését. Más szóval a halak, de minden gerinces függetlenül a testhőmérséklettől kihasználja ezt a lehetőséget membránjaik fluiditásának szabályozásában.

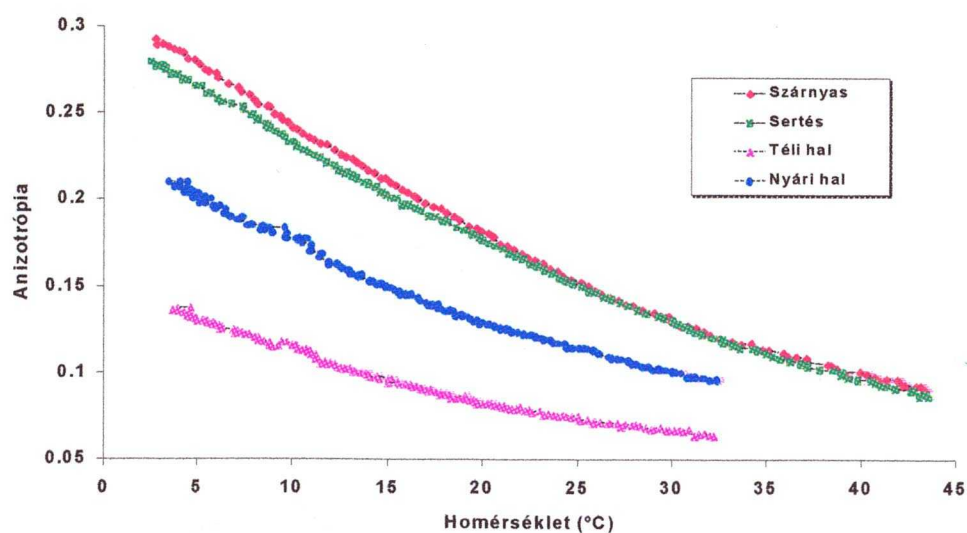


10. Ábra A 18:0/22:6 és 16:0/22:6 PE molekulaspecieszek aránya a testhőmérséklet függvényében

15. Táblázat. Melegvérű gerincesek agyi foszfatidilkolin és foszfatidiletanolamin molekulaszpecifikus összetétele

| Molek. spec. | Szarvasmarha | | Sertés | | Juh | | Szárnyas | |
|--------------|--------------|-------|--------|-------|-------|-------|----------|-------|
| | PC | PE | PC | PE | PC | PE | PC | PE |
| 20:4/20:4 | 0.64 | 0.23 | 0.24 | 0.28 | - | - | - | - |
| 16:1/20:4 | 1.67 | 0.28 | 0.70 | 0.27 | 0.85 | - | - | - |
| 18:1/20:5 | 0.27 | - | - | 0.07 | 0.58 | - | 1.80 | 0.18 |
| 16:1/16:1 | 0.46 | 0.07 | 0.23 | 0.08 | - | - | 0.83 | - |
| 18:1/22:6 | 0.26 | 1.49 | 0.26 | 1.23 | 0.86 | 4.37 | 5.71 | 1.38 |
| 16:0/22:6 | 1.62 | 5.64 | 1.92 | 6.52 | 0.69 | 7.62 | 10.80 | 6.11 |
| 18:1/20:4 | 0.51 | 2.46 | 0.75 | 2.77 | 0.96 | 2.65 | 1.41 | 1.10 |
| 16:0/20:4 | 1.33 | 2.10 | 1.53 | 2.25 | 1.36 | 1.67 | - | 2.42 |
| 20:1/20:5 | 0.44 | - | 0.37 | - | - | - | - | - |
| 18:0/20:5 | 0.29 | 1.41 | 0.18 | 0.51 | - | 0.57 | - | 2.00 |
| 18:0/22:6 | 11.45 | 29.08 | 11.41 | 27.74 | 4.35 | 31.54 | 24.46 | 32.72 |
| 16:0/18:2 | 0.22 | - | 0.22 | - | 3.70 | 1.44 | 2.32 | 1.32 |
| 16:0/22:4 | 0.43 | - | - | - | - | 0.57 | - | - |
| 16:1/18:1 | 2.60 | 1.00 | 2.27 | 0.94 | 2.82 | 1.57 | - | - |
| 18:0/20:4 | 2.16 | 13.65 | 2.49 | 14.98 | 0.76 | 18.16 | 12.97 | 21.50 |
| 18:0/16:1 | 2.16 | 6.04 | 0.57 | 2.23 | - | 0.40 | - | 1.89 |
| 18:1/18:1 | 3.30 | 7.25 | 3.80 | 8.12 | 1.87 | 5.77 | 4.34 | 4.04 |
| 16:0/18:1 | 30.68 | 6.49 | 32.88 | 6.57 | 43.98 | 7.05 | 20.48 | 4.72 |
| 16:0/16:0 | 13.46 | 6.98 | 10.88 | 6.44 | 14.70 | 1.14 | 4.94 | 2.80 |
| 18:1/20:1 | 0.39 | 1.03 | - | 0.86 | - | - | - | - |
| 18:0/18:1 | 19.22 | 8.68 | 23.31 | 11.97 | 9.81 | 8.60 | 2.07 | 4.62 |
| 16:0/18:0 | 4.13 | 0.74 | 3.91 | 0.45 | 3.83 | 1.01 | - | - |
| 18:0/18:0 | - | - | - | - | 1.87 | 0.19 | - | - |
| 18:1/22:5 | - | 0.15 | - | - | 0.25 | - | - | - |

Természetesen, mindezek tükröződnek a különböző testhőmérsékletű gerincesek agyi foszfolipidjeiből készített vezikulák fluiditásában is. A 11. ábra egy 5°C-hoz ill. egy 22-23°C-hoz adaptálódott hal (fehér busa), egy emlős és egy madár agyi foszfolipidjein végzett mérésorozat eredményét mutatja. Láthatjuk, hogy legfluidabbak az 5°C -hoz adaptálódott hal foszfolipidjei és legmerevebbek a madaré. Ha viszont megnézzük a testhőmérsékleteken mért anizotrópia értékeket, akkor láthatjuk, hogy azok majdnem teljesen azonosak, vagyis a gerincesek agyi foszfolipidjeik fluiditása szintjén közel 100%-osan képesek kompenzálni a hőmérsékletnek membránok rendezettségére gyakorolt hatását. Behan-Martin és mtsai (22) szinaptikus vezikulákon mértek hasonló mértékű kompenzációt. A két eredmény egybevetése azt sugallja, hogy a membránok fluiditásának meghatározásában a lipideknek nagyobb szerepe lehet, mint a fehérjéknek, ha feltételezzük, hogy a szinaptikus plazmamembránok fehérjeösszetétele nem azonos a gerinces törzsfejlődés során.



11. Ábra Gerincesek agyi foszfolipidjeinek fluiditása evolúciós viszonylatokban

9. Éterlipidek az agyban

A kísérletünk tárgyát képező hal agyakban közel 50-50%-ban találtunk a foszfatidiletanolamint tekintve, diacil ill. alkenilacil formákat. (16. táblázat).

16. Táblázat. Édesvízi halak agyi diacil-, alkilacil-, és alkenilacilfoszfatidiletanolamin és -foszfatidilkolin összetétele

| Agyak | Diacil- | Alkilacil- | Alkenilacil- |
|-----------------------|---------|------------|--------------|
| Pettyes busa 5/5°C PC | 86.5 | 11.9 | 1.6 |
| PE | 44.4 | 4.6 | 51.0 |
| Fehér busa 5/5°C PC | 84 | 11.9 | 4.1 |
| PE | 47.6 | 4.4 | 48.0 |
| Amur 5/5°C PC | 84.4 | 10.8 | 4.8 |
| PE | 53.1 | 4.3 | 42.6 |
| Ponty 5/5°C° PE | 45.8 | 19.8 | 34.7 |

10. Hőmérséklet hatása az éterlipidekre

E kísérlet során kapott eredmények tükrözik, hogy az alkenilacil PE alcsoport mennyisége meleg-adaptáció során kevésbé, hideg-adaptáció esetében fordított arányban követi a hőmérséklet változásait (17. táblázat).

17. Táblázat. Foszfátidiletanolamin alcsoportok aránya hőmérséklet változás hatására

| Hőmérséklet | Diacil PE | Alkilacil PE | Alkenilacil PE |
|-------------|-----------|--------------|----------------|
| 5/5°C | 45.8 | 19.8 | 34.7 |
| 5/25°C | 60.5 | 3.2 | 36.2 |
| 5/25/5°C | 33.0 | 29.1 | 43.2 |
| 25/25°C | 63.7 | 8.5 | 32.8 |
| 25/5°C | 20.0 | 9.2 | 70.8 |
| 25/5/25°C | 42.0 | 4.6 | 53.6 |

A továbbiakban ponty egy alkenilacil PE specieszket vizsgáltunk meg hőmérsékleti változás hatására.

A 18. táblázatban látható, hogy az 1-monoén 2-polién PE plazmalogén szint nyári halak esetében 5°C-ra való hűtéskor 10.2-ről 14.6-ra növekszik, de visszamelegítéskor értéke nem változik jelentős mértékben. Tehát egyfajta növekvő tendenciát figyelhetünk meg. Az alkenilacil PE szintje bizonyos körülmények között hőmérsékleti stressz hatására változhat, azonban érdekes, hogy molekulaspeciesz összetétele nem változik.

Ha megfigyeljük az említett PE plazmalogének viselkedését téli halakban - felmelegítés és visszahűtés hatására - észrevehető valamiféle mozgás. Az individuális specieszket tekintve ez kevésbé nyilvánvaló, de összegüket képezve igen. Ha az 1-monoén 2-polién PE specieszket vizsgáljuk 5°C-ról 25°C-ra való melegítéskor, mennyiségük 9.3-ról 10.7-re nő, eredeti hőmérsékletre való hűtéskor pedig visszaáll közel alapértékre, 7.7-re. Ugyanilyen tendenciát mutatnak a telített/telítetlen PE (16, 21.2, 16.5) specieszek illetve fordítva reagál a ditelített PE változat (27.3, 24.1, és 28).

18. Táblázat. Hőmérsékleti változás hatása téli (5°C) és nyári (25°C) halak (*C. carpio*) agyi etanolamin-plazmalogén molekulaszpeciesz összetételére

| Molekula-specieszek | 5 /5°C | 25 /25°C | 5 /25°C | 25 /5°C | 5 /25 /5°C | 25 /5/25°C |
|---------------------|--------|----------|---------|---------|------------|------------|
| 18:1/22:6 | 6.3 | 6.2 | 6.7 | 9.6 | 4.4 | 9.1 |
| 16:0/22:6 | 0.8 | 2.6 | 1.1 | 3.4 | 0.8 | 3.9 |
| 18:1/20:4 | 3.0 | 4.0 | 4.0 | 5.0 | 3.3 | 4.8 |
| 16:0/20:4 | 0.9 | 3.1 | 2.3 | 3.4 | 1.9 | 3.4 |
| 18:0/22:6 | 8.0 | 10.6 | 8.8 | 12.1 | 6.2 | 12.6 |
| 18:0/20:4 | 6.4 | 7.7 | 9.0 | 8.0 | 7.7 | 8.4 |
| 18:1/18:1 | 14.7 | 10.4 | 12.9 | 10.4 | 14.8 | 8.8 |
| 16:0/18:1 | 13.5 | 12.8 | 12.5 | 10.4 | 13.8 | 10.7 |
| 16:0/16:0 | 6.7 | 6.0 | 7.0 | 6.0 | 7.9 | 5.1 |
| 18:0/18:1 | 13.8 | 10.7 | 11.6 | 8.1 | 14.2 | 8.0 |
| Σmono/poli | 9.3 | 10.2 | 10.7 | 14.6 | 7.7 | 13.9 |
| Σsat/poli | 16.0 | 24.0 | 21.2 | 27.1 | 16.5 | 28.3 |
| Σsat/sat | 27.3 | 23.4 | 24.1 | 18.5 | 28.0 | 18.6 |

Mínt hogy drasztikus változást nem észleltünk, ezért megpróbáltuk vizsgálatainkat evolúciós viszonyokra kiterjeszteni, hideghez, ill. meleghez adaptált halak, emlősök és madarak agyi PE plazmalogén molekulaszpeciesz összetételét elemezve (19. táblázat). Lényegében nem találtunk nagy különbségeket. Igen konzervatív összetételről tanuskodik a gerinces agy PE plazmalogén molekulaszpeciesz összetétele.

19. Táblázat. Agyi etanolamin-plazmalogének molekulaspeciesz összetétele a testhőmérséklet függvényében

| Molekulaspecieszek | 5/5°C | 20/20°C | 26°C | 37°C | 41°C |
|--------------------|-------|---------|------|------|------|
| 18:1/22:6 | 6.3 | 5.9 | 1.4 | 2.7 | 1.1 |
| 16:0/22:6 | 0.8 | 2.6 | 2.1 | 4.0 | 5.5 |
| 18:1/20:4 | 2.9 | 4.1 | Tr | 6.4 | 1.8 |
| 16:0/20:4 | 0.9 | 2.8 | Tr | 2.3 | 4.2 |
| 18:0/22:6 | 8.0 | 10.4 | 15.1 | 12.9 | 12.7 |
| 18:0/20:4 | 6.2 | 7.7 | 2.3 | 6.8 | 8.0 |
| 18:1/18:1 | 17.8 | 10.2 | 10.1 | 15.2 | 10.7 |
| 16:0/18:1 | 13.5 | 12.6 | 13.7 | 11.2 | 16.9 |
| 16:0/16:0 | 6.5 | 5.8 | 10.5 | 7.3 | 2.8 |
| 18:0/18:1 | 13.7 | 10.4 | 35.9 | 8.6 | 15.6 |
| 18:0/18:0 | Tr | Tr | 1.1 | Tr | Tr |

EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Ma már bizonyos, hogy az agy működéséhez a dokozahexaénsav struktúráját igényli. Ezt a zsírsavat semmiféle más zsírsav nem képes helyettesíteni. Elegendő 22:6 ω -3 nélkül károsodnak bizonyos funkciók, például tanulási képesség vagy a retina esetében a látási élesség.

A gerincesek agyának ezt a “különös” sajátosságát evolúciós okokkal magyarázzák, a törzsfajlás során az első tengeri gerincesek táplálékában az ω -3 polién zsírsavak (elsősorban a linolénsav vagy dokozahexaénsav) domináltak. A gerinces állatok ω -6 politelítetlen zsírsavakkal csak a törzsfajlás egy későbbi szakaszában találkozhattak, amikor már, mint szárazföldi állatok áttértek a növényi magvak fogyasztására, melyek gazdagok voltak linolsavban (43).

Meggyőző adatok bizonyítják, hogy az emlősök agyának lipidösszetétele igen konzervatív, például zsírsavösszetételének diétás úton történő változtatásához generációk szükségesek (44, 45). Az evolúciós fejlődés fokán valamivel alacsonyabb szinten levő madarak esetében az agyvelő ezen konzervatizmusa már nem olyan kifejezett. Hat héttel a kikelés után még az agy elveszíti politelítetlen zsírsavait, ha ezek táplálékukból hiányoznak (8).

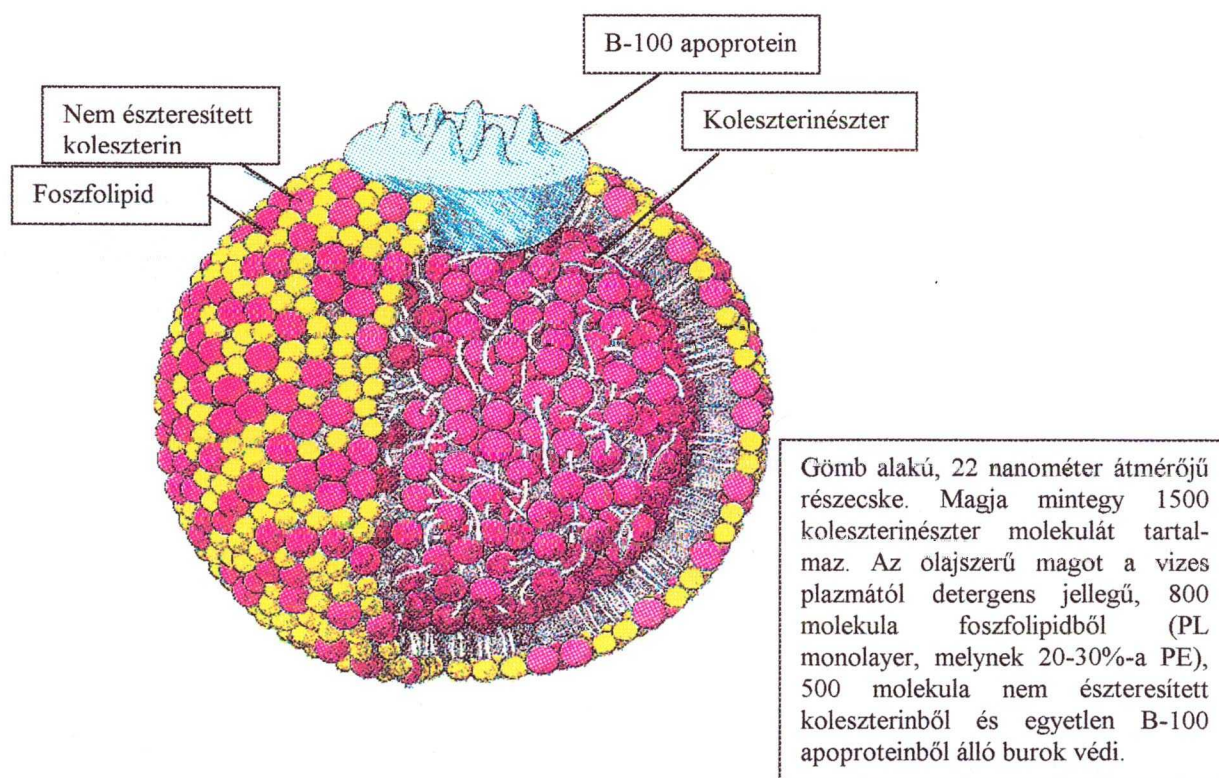
A jelen disszertációban bemutatott vizsgálatok arra utalnak, hogy a halak központi idegrendszerének lipid/zsírsavösszetétele meglehetősen független a felvett táplálék zsírsavösszetételétől, például mind a négy általunk megvizsgált halfaj agyában közel azonos volt a 22:6 ω -3 szintje (6. táblázat). Abból a megfigyelésből, hogy ugyanakkor májukban a 22:6 ω -3 szintje nagyjából tükrözte a diétás viszonyokat (3. táblázat), valamint abból az emlősökre vonatkozó adatból, hogy a központi idegrendszer fő zsírsavforrása a

máj (3, 4), arra lehet következtetni, hogy a halak agyába csupán annyi és olyan zsírsav kerül be, amennyi a kívánt szükségletnek megfelel. Ezzel a feltevéssel megegyezik az a madarakon tett megfigyelés, miszerint az agy politelítetlen zsírsavtartalmának változása párhuzamos volt a máj és a szérum politelítetlen zsírsavszintjének változásával (8). Az emlősöknél a központi idegrendszer zsírsavprofiljának kialakítása még az intrauterin életben megtörténik. A halak embriogenezise az anyaállat testén kívül történik és az agyvelő kifejlődése nyilvánvalóan nem fejeződik be a szikzacskó felszívódásával, hanem ezután még hosszú hónapokig tart. Az emlősök esetében a születést követően az idegsejtek osztódása leáll. Halakra vonatkozóan nincsenek adataink, de mivel a halivadék és a felnőtt állat agyának mérete között jelentős különbség van a neuronok osztódása valószínűleg addig tart, amíg az állat el nem érte a végleges méretét. A *Dicentrachus labrax* nevű tengeri halon végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a szikzacskó felszívódása után is befolyásolható az agy zsírsavösszetétele diétás úton, de ez nem érinti a dokozahexaénsavat, melynek szintje a foszfolipidekben függetlenül a felvett tápláléktól azonos volt (46). A 6. táblázatban bemutatott saját eredményeink lényegében megegyeznek az említett kísérlettel.

Arra nézve, hogy a megvizsgált édesvízi halak agysejtjei képesek e hosszú szénláncú polién zsírsavakat a keringési rendszerből felvett prekursorokból szintetizálni, semmiféle adatunk nincsen. Bizonyos tengeri halak (*Scophthalmus maximus*) asztrogliasejtjei in vitro körülmények között képesek limitált mennyiségű 20:4 ω 3-at 22:6 ω -3-á alakítani, de nem tudják a linolénsavat továbbalakítani hosszú szénláncú polién zsírsavakká. (6, 7). A megvizsgált halak agyában a 18:3 ω -3 szintje olyan alacsony volt (6. táblázat), hogy nem várható, hogy ez a nagy mennyiségben jelenlevő 22:6 ω -3 prekuzora lett volna, ugyanis a prekuzor szintjének magasabbnak kell lennie, mint a produktuménak. Vannak viszont tengeri halakra vonatkozó adataink, melyek azt mutatják,

hogy a szikzacskó felszívódása után még jelentékeny mennyiségű politelítetlen zsírsav épül be az agyba, miközben annak mérete növekszik (10). Így a halak agyi zsírsavösszetételének kialakításában is nagy valószínűséggel a máj zsírsavanyagcseréje játszik döntő szerepet.

A keringési rendszerben a lipidek fő szállítói a lipoproteinek, melyeket a máj választ ki a keringési rendszerbe. A 14. táblázat adataiból arra lehet következtetni, hogy az agyokban levő dokozahexaénsav egyik lehetséges forrása a lipoproteinek diacilfoszfátidiletanolaminja. Amíg pl. a 18:1/22:6 és a 18:0/22:6 PE speciesz aránya azonos a májban és a plazmában, az agyban e specieszek durván kétszeres mennyiségben fordulnak elő. Azt azonban nem tudjuk, hogy az ilyen lipoproteinek vagy foszfolipidek mily módon kerülnek az agyba. Az emlős agyak asztrocitáiban speciális lipoprotein receptorokat mutattak ki (apoB, E), melyek LDL (kis denzitású lipoprotein) részecskéket kötnek. (47) (12. ábra).



12. Ábra. Az LDL részecske

Mint ahogy a ponty lipoproteinjei jelentékeny mennyiségű (kb. 20%) 1-monoén 2-polién PE molekulaspeciest, továbbá kb 30 % etanolamin-plazmalogént tartalmaznak (ezeket az adatokat itt nem mutatjuk be), melyek nem bilayer képző sajátságuk révén erősen fuzogének, feltételezhetjük, hogy a receptorhoz kötődött lipoprotein részecskék a mikrokapillárisok (endotél sejtek) sejt felszínével fuzionálnak, ami a lipoprotein lipidjeinek az endotél sejtek membránjával való keveredését eredményezheti.

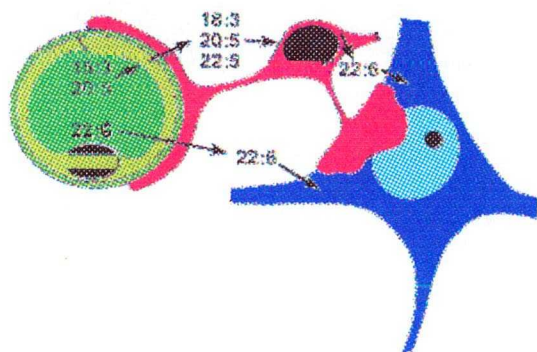
Erre a feltevésre Magret és mtsai (48) vizsgálatai adnak lehetőséget. Kimutatták, hogy izolált marha agy mikrokapillárisaihoz (endotél sejtek) könnyen kötődhetnek lipoprotein részecskék (elsősorban HDL), majd a kapillárisok lumen felületén PC-vé metilálódnak. A fentiekben említettük, lehetséges, hogy a halakban is a lumenbe került lipoprotein részecskék teljesen vagy részlegesen fuzionálnak az endotél sejtekkel. Majd, az így PE-ben feldúsult membránok az asztrocita sejtekkel cserélik ki foszfolipidjeiket. Ily módon az eredetileg a lipoproteinek által szállított 18:1/22:6 PE bekerülhet a neuronok membránjaiba (a membránfúzió lehetséges lépései az 1. függelékben).

További lehetőség az, hogy az endotél sejtek felszínén levő receptorokhoz kötődött LDL részecskék internalizálódnak, endo-ill. exocitotikus módon a sejtől az asztrocitán keresztül a neuronba. Ebben az esetben azonban a neuronok membránjai foszfolipid összetételének azonosnak kellene lennie a lipoproteinekével, ami pedig nem áll fenn (14. táblázat).

Így a 18:1/22:6 PE speciestek a májban képződnének és választódnának ki a keringési rendszerbe. Kimutattuk, hogy a májban e speciestek aránya megemelkedik a hideg-adaptáció során (53). A melegvérűek agyának alacsony 18:1/22:6 szintje (9. ábra) azzal magyarázható, hogy májuk kevés ilyen speciestet képez.

Azt a lehetőséget sem zárhatjuk ki, - mivel a 18:0/22:6 és a 18:1/22:6 PE összege konstans maradt a hőmérsékleti adaptáció során (4. ábra) – hogy a 18:0/22:6 PE in situ (előzetes hidrolízis nélkül) deszaturálódott 18:1/22:6-á a neuronokban. Ilyen deszaturázokat azonban nem ismernek.

Egy alternatív hipotézis az, hogy a lipoproteineket még a kapillárisok lumenjében egy lipoprotein lipáz hidrolizálná és a felszabadult 22:6 ω -3 közvetlenül a neuronokba kerülne, úgy, ahogy Spector és Moore javasolták emlősök esetében (5) (13. ábra).



13. Ábra. A dokozahexaénsav szállítás útvonala az agyban

(Spector, A. A., Moore, S. A., 1992)

Ehhez azonban fel kell tételezni egy deacilációs/reacilációs folyamat lejátszódását, mely során egy már meglévő foszfolipid molekula pl. a 18:1/18:1 PE PLA₂ enzim közreműködésével elveszítené az sn-2 helyzetben levő 18:1-t, s helyére 22:6 kerülne. Ehhez azonban a neuronokban a dokozahexaénsavnak a lizofoszfátidiletanolaminnal hőmérséklet függő módon kellene kombinálnia 18:1/22:6 PE képződéshez, oly módon, hogy hidegben a reakció gyorsabb lenne. Ebben az esetben azonban a hideghez adaptált halak PE-jében a 18:1/18:1 speciesz szintjének alacsonyabbnak kellene lennie, mint a meleghez adaptált halak esetében, ami nem demonstrálható (9. táblázat)

Azt azonban nem tudjuk biztonsággal kizárni, hogy az édesvízi halak központi idegrendszerében mégis nagy intenzitással alakulna át linolénsav, vagy más közvetlen prekursor 22:6 ω -3-á, hiszen az édesvízi halak májában, szemben a tengeri halakkal, ezek a deszaturációs és lánchosszabbítási reakciók lejátszódnak (49, 50).

A hideghez és meleghez adaptált halak agyának foszfolipid molekulaspeciesz összetételében két lényeges különbséget látni (9. táblázat). Egyrészt csökken a 18:0/22:6 szintje a hideghez adaptált állatok agyában, másrészt növekszik a 18:1/22:6 specieszek aránya, különösen a foszfatidiletanolamin frakcióban. Szintetikus foszfolipid molekulaspecieszeken végzett biofizikai vizsgálatok azt mutatták, hogy pl. a 18:0/22:6 foszfatidilkolin termotróp fázisváltási hőmérséklete magasabb, mint a 16:0/22:6 foszfatidilkoliné (-6°C vs. -12°C), (14, 51). Hasonlóképpen a 18:0/22:6 foszfatidilkolin kisebb helyet foglal el a monolayerben, mint a 16:0/22:6 foszfatidilkolin (52). Így a 18:0/22:6 foszfatidilkolin vagy foszfatidiletanolamin szintjének csökkentése hozzájárulhat a membránok rendezetlenségének (fluiditásának) növeléséhez, hiszen az alacsonyabb hőmérsékleten "olvadó" foszfolipidek mozgékonyabbak is pl. a test hőmérsékletén. Így nem lehet véletlen az sem, hogy a gerincesek agyában a 18:0/22:6 szintje magasabb, mint a halakban.

Másrészt növekszik a 18:1/22:6 és a 18:1/20:4 foszfatidiletanolamin szintje a hidegadaptáció során (9. táblázat). Ez a tendencia kísérletes körülmények között is megfigyelhető (13. táblázat) és a válasz meglehetősen gyors. Ezzel a sejtek lényeges fluiditás többletjéhez juthatnak, ugyanis itt nem részletezett biofizikai mérések azt bizonyítják, hogy a molekula által elfoglalt felületben akkor következik be a legdrasztikusabb növekedés, amikor abba az első cisz telítetlen kötés (ebben az esetben 18:1) épül be (52). A 6. ábrán bemutatott mérés, melyben különböző anthroyloxy

zsírsavakat (2, 12-AS, 16-AP) használtunk, összhangban korábbi máj foszfolipideken végzett hasonló méréseinkkel és modellkísérleteinkkel (53) azt mutatja, hogy a 18:1/22:6 foszfatidiletanolamin legdrasztikusabb hatását a bilayer külső régiójában fejt ki. Mivel jelen esetben a fluoreszkáló festék (2-AS) egyenletesen oszlott meg a vezikula külső és belső lemeze között és a foszfatidiletanolamin kb. 80%-a a membránok belső lemezében helyezkedik el (54), natív körülmények között ez az effektus sokkal nagyobb.

Arra a kérdésre viszont, hogy mi teszi ilyen kitüntetetté a dokozahexaénsavat ill. belőle felépített foszfolipideket, nincsen ésszerű magyarázat az irodalomban. Azt a feltevést, hogy a 22:6 ω -3 tartalmú foszfolipidekből felépített membránok biofizikai sajátosságai különböznenek, természetesen óvatossággal kell fogadni, kimutatták ugyanis (14), hogy a 18:0/20:4, 18:0/20:5, 18:0/22:6 foszfatidilkolinból képzett vezikulák fluiditása (DPH fluoreszcens anizotrópia paraméter) közel azonos (0.167 \pm 0.11, 0.165 \pm 0.22 és 0.163 \pm 0.15). Az azonban lehetséges, hogy a 18:1/22:6 PE mennyiségének, továbbá a 18:0/22:6 és 16:0/22:6 arányának (test)hőmérsékletfüggő alakulása jelentősen hozzájárul a fluiditás viszonyok szabályzásához, hiszen a 18:1/22:6 specicszek nagyobb térigényűek a 16:0/22:6 speciesszel együtt (41).

Annak ellenére, hogy a hideghez és meleghez adaptált halak agyi foszfolipidjeinek zsírsavösszetétele majdnem azonos (2. táblázat), beleértve a 22:6 ω -3 szintjét is, a belőlük képzett vezikulák DPH-val mért fluiditása különbözött oly módon, hogy az előbbieké fluidabb volt, oly módon, hogy az adaptációs hőmérsékleteken mért fluidítások közel azonosak maradtak. (7.,8. ábra). Ugyanez érvényes volt az összes gerincesre is (11. ábra). Ez a megfigyelés további adalékot szolgáltat azon korábbi feltevésünkhöz, miszerint nem a hosszú szénláncú polién zsírsavak szintje, hanem azok más zsírsavakkal (18:1, 18:0, 16:0) való speciális kombinációja lehet felelős a foszfolipidek eltérő fluiditásáért (53).

Azon túlmenőleg, hogy az ilyen sn-1 monoén, sn-2 polién foszfatidiletanolaminok hozzájárulnak a membránok rendezetlenségének növeléséhez alacsony hőmérsékleten molekuláris geometriájukkal a membránok stabilitását is eredményezik. Kimutatták ugyanis, hogy alacsony adaptációs hőmérsékleteken a membránok több kónikus foszfolipidet igényelnek, mint magas hőmérsékleteken (55). Az sn-1 helyzetben levő 18:1 cisz kettős kötésével jelentősen növeli a molekula (ebben az esetben a foszfatidiletanolamin) kónicitását is. Ebből a szempontból az sn-2 helyzetet észterező 22:6 ω -3 érdektelen, ez a zsírsav ugyanis pálcika alakú formát vesz fel a molekulában (56). Ezen megfontolásokból kiindulva nem meglepő, hogy az sn-1 monoén sn-2 polién foszfatidiletanolaminok szintje csökken a testhőmérséklet növekedésével a gerinces filogenezis során (9. ábra).

A 7. és 8. ábrán bemutatott kísérletek azt mutatják, hogy az agy meglepően gyorsan hozzáigazítja foszfolipidjeinek fizikai-kémiai sajátosságait az új hőmérsékletekhez. Egy korábbi kísérletben ugyanezt csak az intakt neuronok plazmamembránjairól sikerült kimutatni, abban a kísérletben azonban a rendezettség mérésére spin jelölt zsírsavat használtak a szerzők (24), mely a vezikula csak egy adott szegmenséről adott információt. A jelen kísérletben alkalmazott DPH viszont random helyezkedik el a membránban és így e szerkezet átlagos fluiditását jellemzi. Ez azt mutatja, hogy a halak agyában élénk lipidanyagcsere folyamatok játszódnak le még hidegben is.

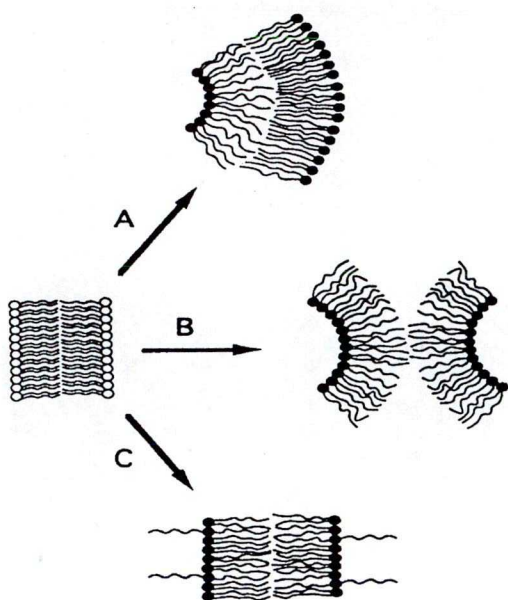
Ámbár az éterlipidek aránya és összetétele pl. az agyban meglehetősen konstans a gerinces filogenezis során (19. táblázat), stressz körülmények között (melegadaptált halakat alacsony hőmérsékletnek kiteve) növekedett az etanolamin plazmalogének aránya (17. táblázat). Ez a tény együtt az sn-1 monoén, sn-2 polién foszfatidiletanolaminok szintjének növekedésével hozzájárulhatott a fluiditás mért növekedéséhez. Kimutatták

ugyanis, hogy az azonos összetételű diacilfoszfatidiletanolamin termotróp fázisváltózási hőmérséklete kb. 10° C-al magasabb, mint az etanolamin plazmalogéné (57).

Mind az sn-1 monoén, sn-2 polién foszfatidiletanolaminok, mind pedig az etanolamin-plazmalogének általában egy másik fizikai sajátosságukkal is hozzájárulnak a membránok működéséhez alacsony hőmérsékleten ill. a testhőmérsékleten: ezek a lipidek könnyen képeznek ún. nem kettősréteg (fordított hexagonális) fázisokat (57) és a mai tudásunk szerint a sejthártyák ill. a sejtek normális működéséhez szükségesek ezek a molekulák. Számos enzim (pl. PLA₂, Ca⁺⁺ATPase, PKC vagy bizonyos G proteinek membránhoz való asszociációja) (58) kimondottan igényli ilyen struktúrák jelenlétét. Elsősorban prokariótákról mutatták ki, hogy ezek a sejtek lipidjeik termotróp és nem kettősréteg fázisátmeneti hőmérséklet közötti régiójában funkcionálnak úgy, hogy a sejt hőmérséklete (tenyésztési hőmérséklet) egy konstans értékkel alatta van a foszfolipidjei nem kettősréteg átmeneti hőmérsékletének (59). Etanolamin plazmalogénekről ismert, hogy a kettősréteg-nem kettősréteg átmeneti hőmérséklete igen alacsony (57), de az utóbbi években derült az is ki, hogy pl. a 18:1/22:6 foszfatidiletanolamin rendkívül könnyen és igen alacsony hőmérsékleten képez ilyen fázist (60). Ha elfogadjuk azt, hogy a gerinceseknél ugyanaz a helyzet, mint a prokariótáknál a kettősréteg-nem kettősréteg fázisátmenetek tekintetében, akkor nyilvánvaló, hogy pl. az alacsony hőmérsékleten élő halak több ilyen foszfolipidet igényelnek, mint pl. a madarak. A 9. ábrán bemutatott adatok összhangban vannak ezzel a feltételezéssel.

A MEMBRÁNFÚZIÓ ELKÉPZELT MOLEKULÁRIS

MECHANIZMUSA (Kinnunen, 1992.)

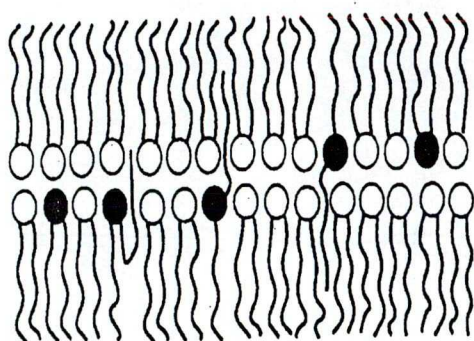


1. Ábra

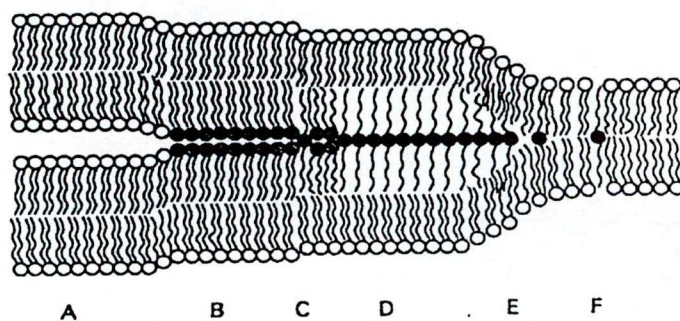
A kónikus alakú molekulák jelenléte egy ún. negatív görbületi feszülést hoz létre, melynek a cilindrikus foszfolipidek ellenállnak.

Az 1. ábra a bilayer membránok lehetséges alakváltozásait mutatja kónikus foszfolipidek jelenlétében.

Nem lehetséges sem az egyik monolayer görbületének növekedésével a másik csökkenése (A), sem a két réteg görbületének egyidejű növekedése (B) a bilayer konfiguráció kialakulása során. Így csak a planáris változat (C) a megfelelő, amikor is ebből a stresszelt állapotból úgy szabadul meg a rendszer, hogy a kónikus foszfolipidek egyik zsírsavláncukat a vizes fázisba nyújtják (frusztrált állapot), mellyel kompenzálják a membrán görbülését. Az ilyen frusztrált állapotú membrán érintkezése egy nem frusztrált állapotú membránnal elősegítheti egyrészt a foszfolipidek kicserélődését a két membrán között (pl. 18:1/22:6 PE speciesz átcsúszik az érintkező membránba) (2. ábra), másrészt a két réteg fúzióját (3. ábra).



2. Ábra



3. Ábra

EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A disszertáció témáját azon munkák alkotják, melyek során arra kerestünk választ, hogy a gerincesek, főképpen a halak központi idegrendszere lipidösszetételének, membránjai molekuláris architektúrájának ill. biofizikai paramétereinek megváltozása különböző környezeti hatásokhoz (diéta, hőmérséklet) való alkalmazkodáskor, milyen relációban áll ezen szerkezeteket alkotó lipidek összetételének megváltozásával.

A részletezett vizsgálataink első részében vizsgáltuk és megállapítottuk egyrészt, hogy a különböző hőmérsékletre adaptálódott halak agyi zsírsavösszetételében nem figyelhető meg számottevő különbség, másrészt, hogy a táplálék zsírsavösszetétele nincs befolyásoló hatással az agy zsírsavösszetételére, mely igen stabil, s diéta hatására sem változik összetétele. Ellentétben a máj ill. zsírszövet zsírsavösszetételével, melyek pontosan tükrözik a táplálék minőségéből adódó különbségeket.

A dolgozat következő részében igyekeztünk rávilágítani az eltérő hőmérsékletekhez adaptálódott szervezetekből izolált membránok (szinaptikus plazmamembrán) ill. ezeket alkotó foszfolipidekből készült vezikulák fluiditása és molekulaspeciesz összetétele közti kapcsolatra. Megállapítottuk, hogy evolúciós vonatkozásban gerinces fajok agyi szinaptikus plazmamembránjaiban a dokozahexaénsav tartalom a test/környezet hőmérsékletével párhuzamosan csökken. Különböző hőmérsékletre adaptált pontyok esetében kiderült, hogy a 18:0/22:6 és 18:1/22:6 foszfatidiletanolamin molekulaspeciesz mennyisége eltérően reagál a hőmérsékletben bekövetkezett változásokra, előbbi csökken a hőmérséklet csökkenésével, utóbbi pedig növekszik, de összegük minden esetben állandó. Ugyanakkor a foszfatidilkolin elemzése alapján az említett két speciesz összege folyamatosan növekszik a hőmérséklet csökkenésével.

Fluiditás vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a hideg- és meleg-adaptált halak agyi foszfolipid molekulaspeciesz összetételében észlelt változások valóban realizálódnak, s fluiditásbeli különbségeket eredményeznek, mind antroliloxi mind DPH próbákkal való jelölés során, kísérletes körülmények között is.

Megfigyeléseinkből kiderült, hogy bizonyos 1-monoén 2-polién PE molekulaspecieszek, az evolúciós skálát tekintve összefüggést mutatnak a test/környezet hőmérséklettel ill. az etanolamin plazmalogének aránya, noha konstans a gerinces törzsfajlás folyamán, hidegstressz hatására megnő. Így együtt az éterlipidek és az 1-monoén 2-polién foszfatidiletanolamin molekulaspecieszek jelentős szerepet kapnak a hőmérséklet változáshoz történő adaptálódás regulációjában.

Végül felvázoltunk egy mechanizmust, mely során a máj által szintetizált 18:1/22:6 PE felhalmozódhat az agyban.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Értekezésemben az 1995-1998 között, az MTA SZBK Biokémiai Intézetében végzett kutatásaink eredményét foglaltam össze.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani elsősorban témavezetőmnek, Dr. Farkas Tibornak, aki irányítása és támogatása nélkül ez a disszertáció nem készülhetett volna el, s akihez mind szakmai, mind emberi kérdésekkel bármikor bizalommal fordulhattam.

Köszönettel tartozom a munkacsoportunkba tartozó kollégámnak Dr. Buda Csabának és kolléganőmnek Fodor Elfriedának, akik a fizikai-kémiai mérések elvégzésével hozzájárultak dolgozatom elkészítéséhez, illetve technikusainknak, Zukic Erikának és Vinczéné Baunoch Juditnak az odaadó laboratóriumi segítségükért és a kellemes légkör biztosításáért.

Köszönetet mondok Dr. Vigh Lászlónak, az MTA SZBK Biokémiai Intézet igazgatójának, aki biztosította számomra az intézeti feltételeket, s egyben munkacsoportja minden tagjának az elmúlt időszakban nyújtott szakmai és baráti segítségért.

A Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány Biotechnológiai Kutatóintézet vezetőinek köszönöm, hogy munkámat lehetővé tették.

Köszönettel tartozom a Tisza Halászati Szövetkezet vezetőjének, aki rendelkezésünkre bocsájtotta a kísérleteinkhez szükséges halakat.

Köszönöm a Soros Alapítvány támogatását dolgozatom elkészítéséhez.

S végül szeretném megköszönni családom támogatását és türelmét.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Sastry, P.S.: Lipids of nervous tissue: Composition and metabolism. -Progr. Lipid. Res. 24, 69-176 (1985).
2. Roots, B.I. & Johnston. P.V.: Plasmalogens of the nervous system and environmental temperature. - Comp. Biochem. Physiol. 26, 553-560 (1968).
3. Nouvelot, A., Delbart, C., & Bourre, J.M.: Hepatic metabolism of dietary alpha-linolenic acid in suckling rat, and its importance in polyunsaturated fatty acid uptake by the brain. - Ann. Nutr. Metab. 30, 316-323 (1986).
4. Scott, B., & Barzan, N.G.: Membrane docosahexaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 2903-2937 (1989).
5. Spector, A.A., & Moore, S.A.: Role of cerebrovascular endothelium and astrocytes in supplying docosahexaenoic acid to the brain. - 100-103 (Essential Fatty Acids and Eicosanoids, Sinclair, Gibson; American Oil Chemists' Society) (1992).
6. Tocher, D.R., Mourente, G., & Sargent, J.R.: Metabolism of [^{14}C]docosahexaenoate (22:6n-3), [^{14}C]eicosapentaenoate (20:5n-3) and [^{14}C]linolenate (18:n-3) in brain cells from juvenile turbot *Scophthalmus maximus*.- Lipids 27, 494-499 (1992).
7. Tocher, D.R.: Elongation predominates over desaturation in the metabolism of 18:3n-3 and 20:5n-3 in turbot (*Scophthalmus maximus*) brain astroglial cells in primary culture. - Lipids 228, 267-272 (1993).
8. Anderson, G.J., Van Winkle, S., & Connor, W.E.: Reversibility of the effects of dietary fish oil on the fatty acid composition of the brain and retina of growing chicks. - Biochim. Biophys. Acta 1126, 237-246 (1992).

9. Mourente, G., Tocher, G., & Sargent, J.R.: Specific accumulation of docosahexaenoic acid (22:6n-3) in brain lipids during development of juvenile turbot *Scophthalmus maximus* L. - *Lipids* 26, 871-877 (1991).
10. Mourente, G., & Tocher, D.T.: Effects of weaning onto a pelleted diet on docosahexaenoic acid (22:6n-3) levels in brain of developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.). - *Aquaculture* 105, 363-377 (1992).
11. Crafword, M.A., Doyle, W., Drury, P., Lennon, A., Costeloe, K., & Leighfield, M.: N-6 and n-3 fatty acids during early human development. *J. Intern. med.* 225 (suppl. 1). 159-169 (1989).
12. Stubbs, C.D., & Smith, A.D.: Essential fatty acids in membrane: physical properties and function.- *Biochem. Soc. Trans.* 18, 779-781 (1990).
13. Niebilsky, Ch.D., & Salem, N.: A calorimetric investigation of a series of mixed polyunsaturated phosphatidylcholines: effect of *sn*-2 chain length and degree of unsaturation. - *Biophys. J.* 67, 2387-2393 (1994).
14. Salem, N., & Niebilsky, Ch.D.: The nervous system has an absolute molecular species requirement for proper function. - *Molecular Biology* 12, 131-134 (1995).
15. Caldwell, D.F., & Churchill, J.A.: Learning impairment in rats administered a lipid free diet during pregnancy.- *Physiol. Rep.* 19, 99-102 (1966).
16. Yamamoto, N., Okaniva, Y., Mori, S., Nommura, M., & Okuyama, H.: Effects of high linolenate and high α -linoleate diet on the learning ability of aged rats, Evidence against an autoxydation-related peroxyde theory of aging. - *J. Gerontol.* 46, 17-22 (1991).
17. Enslin, M., Milon, H., & Malnoe, A.: Effect of low intake of n-3 fatty acids during development on the brain phospholipid fatty acid composition and explanatory behaviour in rats. - *Lipids* 26, 203-208 (1991).

18. Holman, R.T., Johnson, R.T., & Ogburn, P.E.: Deficiency of essential fatty acids and membrane fluidity during pregnancy and lactation. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 4835-4839 (1991).
19. Brenner, R.R.: Effect of unsaturated acids on membrane structure and enzyme kinetics. - Progr. Lipid Res. 23, 69-96 (1984).
20. Sinensky, M.: Homeoviscous adaptation- a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 522-525 (1974).
21. Roy, R., Ghosh, D., & Dash, A.B.: Homeoviscous adaptation of different membranes in the brain of an air-breathing indian teleost, *Channa punctata*, during seasonal variation of environmental temperature. - J. Therm. Biol. 17, 209-215 (1992).
22. Behan-Martin, M.K., Jones, G.R., Bowler, K., & Cossins, A.R.: A near perfect temperature adaptation of bilayer order in vertebrate brain membranes. - Biochim. Biophys. Acta 1151, 216-222 (1993).
23. Cossins, A.R., Friedlander, M.J., & Prosser, C.L.: Correlation between behavioral temperature adaptations of goldfish and the viscosity and fatty acid composition of their synaptic membranes. - J. Comp. Physiol. 120, 109-121 (1977).
24. Buda, Cs., Dey, I., Balogh, N., Horváth, L.I., Maderspach, K., Juhász, M., Yeo, Y.K., & Farkas, T.: Structural order of membranes and composition of phospholipids in fish brain during thermal acclimatization. - Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 8234-8238 (1994).
25. Bell, M.V. & Tocher, D. R.: Molecular species composition of the major phospholipids in brain and retina from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Occurrence of high levels of di-(n-3)polyunsaturated species. - Biochem. J. 264, 909-915 (1989).

26. Bell, M.V. & Dick, J.R.: Molecular species composition of the major diacyl glycerophospholipids from muscle, liver, retina and brain of cod (*Gadus morhua*). - *Lipids* 26, 565- 573 (1991).
27. Bell, M.V. & Dick, J.R.: 1-*O*-Alk-1'-enyl-2-acyl- glycerophosphoethanolamine content and molecular species composition in fish brain. - *Lipids* 28, 19-22 (1993).
28. Wilson, R., & Bell, M.V.: Molecular species composition of glycerophospholipids from white matter of human brain. - *Lipids* 28, 13-17 (1993).
29. Roy, R., Das, A.B., & Ghosh, D.: Regulation of membrane bilayer structure during seasonal variation: a study on the brain membranes of *Clareas batrachus*. - *Biochim. Biophys. Acta* 1323, 65-74 (1997).
30. Folch, J.I. Lees, M., & Sloane -Stanley, G.H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. - *J. Biol. Chem.* 226, 497-509 (1957).
31. Takamura, H., Narita, H., Urade, R. & Kito, H.: Quantitative analysis of polyenoic phospholipid molecular species by high-performance liquid chromatography. - *Lipids* 21, 356-361 (1986).
32. Takamura, H., & Kito, M.: A highly sensitive method for quantitative analysis of phospholipid molecular species by high-performance liquid chromatography. - *J. Biochem.* 109, 436-439
33. Sen, A., Isac, T.V., & Hui, S.: Bilayer packing stress and defects in dilinoleylphosphyletanolamine and palmitoleylphosphatidylcholine and their susceptibility to phospholipase A₂. - *Biochemistry* 30, 4516-4521 (1001).
34. Dey, I., Buda, Cs., Wiik, T., Halver, J.E., & Farkas, T.: Molecular and structural composition of phospholipid membranes in livers of marine and freshwater fish in relation to temperature. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7498-7502 (1993).



35. Dey, I., & Farkas, T.: Temperature shifts induce adaptive changes in the physical state of carp *Cyprinus carpio* L. erythrocyte plasma membranes in vitro. - Fish Physiol. Biochem. 10, 347-355 (1992).
36. Chang, M.C.J., & Roots, B.I.: The effects of temperature- and oxygen acclimation on phospholipids of goldfish (*Charassius auratus*) brain microsomes. - Neurochem. Res. 10, 355-375 (1985).
37. Ahlgren, G., Gustafsson, I-B., & Borerg, M. : Fatty acid content and chemical composition of freshwater microalgae. - J. Phycol. 28, 37-50 (1992).
38. Roy, R., Fodor, E., Kitajka, K., Farkas, T.,: Fatty acid composition of the ingested food only slightly affects physicochemical properties of liver total phospholipids and plasma membranes in cold adapted fresh water fish. – Fish Physiology and Biochemistry 20, 1-11 (1999).
39. Babin, P. J., & Vernier, J. M.: Plasma lipoproteins in fish. – J. Lipid Res. 30, 467-489 (1989).
40. Wallaert, Ch., & Babin, P. J.: Circannual variation in the fatty acid composition of high-density lipoprotein phospholipids during acclimatization in trout. – Biochem. Biophys. Acta 1210, 23-26 (1993).
41. Zabelinskii, S. A., Brovtsyna, N. B., Cheboterova, M. A., Gorbunova, O. B., Krivchenko, A. I.: Comparative investigation of lipids and fatty acid composition of fish gills and mammalian lungs. A model of the membrane lipid component areas. – Comp. Biochem. Physiol. 111b, 127-140 (1995).
42. Ghosh, D., Williams, M. A., Tinoco, J.: The influence of lecithin structure on their monolayer behavior and interactions with cholesterol. – Biochem. Biophys. Acta 291-351 (1973).

43. Crafword, M.A.: The role of dietary fatty acids in biology: their place in the evolution of the human brain. - *Nutr. Rev.* 50, 3-11 (1992).
44. Bourre, J.M., Dumont, O.S., Piciotti, M., Pacal, G.A., & Durand, G.A.: Dietary α -linolenic acid deficiency in adult rats for 7 months does not alter brain docosahexaenoic acid content, in contrast to liver, heart and testes. - *Biochim. Biophys. Acta* 1124, 119-122 (1992).
45. Alsted, A.L. & Hoy, C.E.: Fatty acid profiles of brain phospholipid subclasses of rats fed n-3 polyunsaturated fatty acids of marine and vegetable origin. A two generation study. - *Biochim. Biophys. Acta* 1125, 237-244 (1992).
46. Pagliarani, A., Pirini, M., Trigari, G., & Ventrella, V.: Effect of diets containing different oils on brain fatty acid composition in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) - *Comp. Biochem. Physiol.* 83B 277-282 (1986).
47. Pitas, R. E., Boyles, B. K., Lee, S. H., Hui, D., & Weisgraber, K. H.: Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterisation of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B, E (LDL) in the brain. - *J. Biol. Chem.* 262, 14352-14360 (1987).
48. Magret, V., Elkhailil, L., Nazih- Sanderson, F., Martin, F., Bourre, J., Fruchart, J., Delbart, C.: Entry of polyunsaturated fatty acids into the brain: evidence that high-density lipoprotein-induced methylation of phosphatidylethanolamine and phospholipase A₂ are involved. - *Biochem. J.* 316, 805-811 (1996).
49. Farkas, T., & Csengeri, I.: Biosynthesis of fatty acids by the carp, *Cyprinus carpio* L., in relation to environmental temperature. - *Lipids* 11, 401-407 (1976).
50. Farkas, T., Csengeri, I., Majoros, F., & Oláh, J.: Metabolism of fatty acids in fish III. Combined effect of environmental temperature and diet on formation and deposition of fatty acids in carp *Cyprinus carpio Linneatus 1758*. *Aquaculture* 20, 29-40 (1980).

51. Coolebar, K.P., Beroe, C.B., & Keough, K.M.W.: Gel to liquid-crystalline phase transitions of aqueous dispersions of polyunsaturated mixed acyl phosphatidylcholines. - *Biochemistry* 22, 1466-1473 (1983).
52. Evans, R.W., Williams, M., & Tinoco, J.: Surface areas of 1- palmitoyl phosphatidylcholines and their interactions with cholesterol . - *Biochem. J.*, 245, 455-467 (1987).
53. Fodor, E., Jones, R.H., Buda, Cs., Kitajka, K., Dey, I., & Farkas, T.: Molecular architecture and biophysical properties of phospholipids during thermal adaptation in fish: an experimental and model study. - *Lipids* 30, 1119-1126 (1995).
54. Fontaine, R.N., Haris, R.A., & Schroeder, F.: Aminophospholipid assymetry in murine synaptosomal plasma membranes. - *J. Neurochem.* 34, 269-277 (1980).
55. Wieslander, A., Christiansen, A., Rilfors, A.L., & Lindbrom. H.: Lipid bilayer stability in membranes. Regulation of lipid composition in *Achelopsama laidlawii* as governed by molecular shape. - *Biochemistry* 19, 3650-3655 (1980).
56. Applegate, K.R., & Glomset, J.A.: Effect of acyl chain unsaturation on the packing of model diacylglycerols in simulated monolayers.- *J. Lipid. Res.* 32, 1645-1655 (1991).
57. Lohner, K.: Is the high propensity of ethanolamine plasmalogens to form non-lamellar structures manifested in the properties of biomembranes. - *Chem. Phys. Lipids* 81, 167-184 (1996).
58. Kinnunen, P. K.J.: On the molecular-level mechanism of periferal protein-membrane interactions induced by lipids forming inverted non-lamellar phases. - *Chem. Phys. Lipids* 81, 151-166 (1996).
59. Morein, S., Anderson, A-S., Rilfors, L., & Lindblom, G.: Wild-type *Escherichia coli* cells regulate the membrane lipid composition in a "window" between gel and non-lamellar structures. - *J. Biol. Chem.* 271, 6801-6809 (1996).

60. Giorgione, J., Epan, R.M., Buda, Cs., & Farkas, T.: Role of phospholipids containing docosahexenoyl chains in modulating the activity of protein kinase C. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92, 9767-9770 (1995).

A disszertáció témájával kapcsolatban megjelent ill. elfogadott közlemények:

Fodor, E., Jones, H. R., Buda, Cs., **Kitajka, K.**, Dey, I., Farkas, T.: Molecular architecture and biophysical properties of phospholipids during thermal adaptation in fish: an experimental and model study.- *Lipids* 30, 1119-1126 (1995).

Kitajka, K., Buda, Cs., Fodor, E., Halver, J. E., Farkas, T.: Involvement of phospholipid molecular species in controlling structural order of vertebrate brain synaptic membranes during thermal evolution.- *Lipids* 31, 1045-1049 (1996).

Roy, R., Fodor, E., **Kitajka, K.**, Farkas, T.: Fatty acid composition of the ingested food only slightly affects physicochemical properties of liver total phospholipids and plasma membranes in cold adapted fresh water fish- *Fish Physiology and Biochemistry* 20, 1-11 (1999).