

И. Г. БОРИСОВА, Е. В. БУДНИЦКАЯ

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПОКСИГЕНАЗНЫХ ФУНКЦИЙ МИТОХОНДРИЙ ИЗ ОБЛУЧЕННЫХ ПРОРОСТКОВ

(Представлено академиком А. И. Опариным 22 III 1971)

Одним из актуальных вопросов современной биохимии является вопрос стабилизации мембранной структуры клеточных органелл, создающих необходимую среду для пространственной организации биохимических процессов. В литературе накапливаются факты, свидетельствующие о влиянии жирнокислотного состава и степени ненасыщенности фосфолипидов клеточных мембран на их метаболические свойства и проницаемость. Развивающиеся в мембранах субклеточных структур процессы перекисного окисления липидов значительно активируются при воздействии на организмы ионизирующих излучений (¹⁻³). Накопление метаболически активных перекисей липидов приводит к резким изменениям обмена веществ и структурной организации клеток и тканей (⁴⁻⁶). В связи с этим изучение процессов перекисного окисления липидов, развивающихся в липидной фазе клеток при воздействии радиации, приобретает общеприкладное значение.

Обнаруженное нами накопление перекисей липидов, ненасыщенных высших жирных кислот и активация липоксигеназы — фермента окисления непредельных жирных кислот с образованием перекисей наблюдалось на фоне резкого изменения электрических параметров и проницаемости облученных тканей (⁷⁻⁸).

Это привело нас к необходимости исследования взаимосвязи эффекта активации процессов окисления ненасыщенных высших жирных кислот липоксигеназой с изменением внутриклеточной локализации этого фермента в тканях облученных растений.

Литературные сведения о локализации липоксигеназы немногочисленны. Предполагалось, что распространение липоксигеназы ограничено только растворимой частью цитоплазмы, однако показано, что липоксигеназной активностью обладают митохондрии, хлоропласты, хромопласты и лейкопласты, выделенные из различных растений (^{9, 10}).

В настоящей работе проведено изучение действия ионизирующей радиации в дозе 1000 р на внутриклеточную локализацию липоксигеназы в тканях корней и этиолированных листьев проростков гороха сортов «Победитель» и «Неистошимый».

Облучению подвергали 10—12-дневные проростки, выращенные в условиях водной культуры. Источником излучения служила трубка РУП-200-20-5 (210 в, 15 ма), с мощностью излучения 244—258 р/мин. Через 15—30 мин. после облучения материал подвергали исследованию. Изучение локализации липоксигеназы начали с исследования липоксигеназных функций фракции митохондрий и надосадочной фракции, после осаждения митохондрий.

Выделение фракции митохондрий проводили на холоде, методом дифференциального центрифугирования, в условиях, обеспечивающих осаждение митохондрий без примеси пластид, используя в качестве сред для гомогенизации и суспендирования растворы, описанные в ранее опубликованных работах (^{11, 12}). Биохимическим контролем чистоты фракции мито-

хондрий, осаждаемой при 10 000 *g*, являлась активностью сукцинатдегидрогеназы (¹³).

Активность липоксигеназы исследуемых фракций определяли по специфической реакции окисления экзогенной линолевой кислоты двумя методами: газометрическим методом Варбурга (⁷) и спектрофотометрически (¹⁴). Определения проводили в условиях изотонической реакционной среды (0,25 *M* сахараза; 1% линолевая кислота или натриевая соль линолевой кислоты в 0,006 *M* фосфатном буфере при pH 7,2—7,3). Гипотоническая реакционная среда имела тот же состав, без сахаразы. Полученные данные подвергали статистической обработке (¹⁵).

Определение активности липоксигеназы фракции митохондрий и надосадочной жидкости в норме и при воздействии факторов, приводящих к деструкции митохондрий, показало, что активность липоксигеназы зависит от структурной целостности исследуемой фракции (табл. 1, 2).

Таблица 1

Влияние замораживания на активность липоксигеназы субклеточных фракций корней проростков гороха. Спектрофотометрический метод*

Фракция	Активность E_{232}		Статистический показатель		
	контроль	опыт	<i>M</i>	<i>m</i>	<i>P</i>
Митохондрии	0,084	0,073	0,011	$\pm 0,001$	$< 0,01$
Супернатант	0,115	0,154	0,039	$\pm 0,007$	$< 0,05$

* Условия гипотонической реакционной среды

Таблица

Зависимость активности липоксигеназного окисления линолевой кислоты от состава реакционной среды

Фракция	Активность E_{232}			Статистический показатель		
	изотония	гипотония	%	<i>M</i>	<i>m</i>	<i>P</i>
Митохондрии	0,106	0,187	176,4	0,081	$\pm 0,013$	$< 0,05$
Супернатант	1,07	1,300	120,5	0,230	$\pm 0,017$	$< 0,01$
Митохондрии*	4,33	5,200	120,1	0,870	$\pm 0,052$	$< 0,01$

* Приведены данные газометрических определений, $\mu\text{л O}_2$ на 1 мл суспензии.

Из данных табл. 1 видно, что замораживание проростков с последующим оттаиванием вызывает перераспределение липоксигеназы — снижение липоксигеназных функций фракции митохондрий и увеличение активности во фракции супернатанта после осаждения митохондрий.

В связи с этим при исследовании эффекта радиации на липоксигеназную функцию митохондрий определение активности липоксигеназы проводили в условиях, способствующих стабилизации структур (изотоническая реакционная среда), и в условиях, вызывающих деструкцию (гипотоническая среда). В контрольных опытах было обнаружено, что при определении активности липоксигеназы митохондрий из этиолированных листьев проростков гороха в условиях изотонической среды (0,25 *M* сахараза) интенсивность окисления экзогенной линолевой кислоты за 3 мин. значительно ниже, нежели в условиях гипотонии (табл. 2).

На основании проведенных данных мы делаем заключение о существовании скрытой формы липоксигеназы, проявляющейся в результате развития в клетках деструктивных процессов, одним из факторов которых можно рассматривать ионизирующее излучение.

Исследование действия рентгеновского облучения на липоксигеназные функции субклеточных фракций показало статистически достоверное изменение активности липоксигеназы митохондрий и супернатанта (табл. 3).

Из приведенных в табл. 3 данных явствует, что эффект радиации при облучении *in vivo* проявляется в активации липоксигеназы надосадочной жидкости, при снижении ее активности во фракции митохондрий.

Сопоставляя приведенные данные с нашими исследованиями по влиянию ионизирующей радиации на структуру растительных тканей (⁸), мы рассматриваем инактивацию липоксигеназы фракции митохондрий как результат повреждения их мембранной организации, сопровождающийся высвобождением фермента в цитоплазму клеток.

Таблица 3

Активность липоксигеназы субклеточных фракций из проростков гороха через 30 мин. после облучения *in vivo* в дозе 1000 р

Реакционная среда	Объект	Активность E_{32}			Статистический показатель		
		контроль	облучение	%	M	m	P
Митохондрии Изотония 0,25 M сахараза	Корень	0,072	0,046	60,5	0,026	$\pm 0,007$	$< 0,05$
	Лист	0,105	0,082	78,5	0,023	$\pm 0,002$	$< 0,01$
Гипотония 0,02 M сахараза Супернатант	Корень	0,082	0,071	86,5	0,011	$\pm 0,002$	$< 0,05$
	Лист	0,303	0,346	114,2	0,043	$\pm 0,007$	$< 0,05$
Изотония 0,25 M сахараза Гипотония	Корень	0,340	0,351	103,4	0,011	$\pm 0,002$	$< 0,05$
	Корень	0,240	0,280	116,7	0,040	$\pm 0,007$	$< 0,05$

Таблица 4

Активность липоксигеназы фракции митохондрий через 30 мин. после облучения *in vitro**

Объект	Доза, р	Активность		Статистический показатель		
		$\mu\text{лO}_2$ на 1 мг белка	%	M	m	P
Корень	Контроль	6,91	100,0	1,41	$\pm 0,070$	0,01
	1000	8,32	120,0			
Лист	Контроль	11,4	100,0	2,10	$\pm 0,140$	0,02
	500	11,6	101,7			
	1000	13,5	118,4			

* Определения в условиях изотонической среды.

При определении активности липоксигеназы митохондрий, облученных *in vitro* в дозе 500 и 1000 р, через 30 мин. после облучения обнаружена статистически достоверная активация липоксигеназы при определении в условиях изотонической реакционной среды (табл. 4).

Изменений в активности липоксигеназы при определении в условиях гипотонической реакционной среды не показано. Не обнаружено также изменений и во фракции надосадочной жидкости после осаждения митохондрий. Поэтому эффект активации липоксигеназы *in vitro* при определении в условиях изотонической среды рассматривается как показатель начальной стадии структурной деградации митохондрий, в результате которой создаются условия более свободного доступа экзогенного субстрата к локализованному на структурах ферменту и его видимая активация.

Таким образом, результаты настоящего исследования свидетельствуют о зависимости реакции липоксигеназного окисления ненасыщенных выс-

пих жирных кислот от структурной целостности митохондрий, изменяемой при действии ионизирующего излучения.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
16 III 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Е. В. Будницкая, И. Г. Борисова, ДАН, 126, № 1, 195 (1959). ² E. D. Wills, I. Rotblat, Intern. J. Radiat. Biol., 8, № 6, 551 (1964). ³ E. D. Wills, A. E. Wilkinson, Radiation Res., 31, № 4, 732 (1967). ⁴ P. O'Brien, R. Green, Biochem. J., 103, 32 (1967). ⁵ О. Н. Воскресенский, А. П. Левицкий, Вопр. мед. хим., 16, в. 6, 563 (1970). ⁶ J. Desai, A. Tappel, J. Lipid Res., 4, № 2, 204 (1963). ⁷ Е. В. Будницкая, И. Г. Борисова, А. Г. Пасынский, Биохимия, 23, в. 6, 849 (1958). ⁸ Е. В. Будницкая, Н. В. Маслов и др., Радиобиология, 1, в. 1, 37 (1961). ⁹ Н. М. Сисакян, А. М. Кобякова, Биохимия, 22, в. 3, 516 (1957). ¹⁰ O. L. Gamburg, S. Zalik, Canad. J. Biochem. Physiol., 36, № 11, 1149 (1958). ¹¹ И. М. Мосолова, Н. М. Сисакян, Биохимия, 26, в. 3, 549 (1961). ¹² W. Vonner, Methods of Enzymology, 10, 126 (1967). ¹³ Н. М. Сисакян, Р. М. Бекина, И. М. Мосолова, ДАН, 112, № 3, 481 (1957). ¹⁴ A. M. Siddiqi, A. L. Tappel, Arch. Biochem. and Biophys., 60, № 1, 91 (1956). ¹⁵ И. А. Ойвин, Патол. физиол. и эксп. терапия, 4, № 4, 76 (1960).