

УДК 576.343 + 547.953

БИОХИМИЯ

Э. В. ДЯТЛОВИЦКАЯ, Н. П. ГОРЬКОВА, Б. Д. МАЛЕРЕ, Н. Г. ТИМОФЕЕВА,
член-корреспондент АН СССР Л. Д. БЕРГЕЛЬСОН

КАРДИОЛИПИНЫ МИТОХОНДРИЙ И МИКРОСОМ САРКОМЫ ИЕНСЕНА

В клетках нормальных тканей млекопитающих кардиолипин (дифосфатидилглицерин) локализован избирательно в митохондриях, тогда как микросомная фракция практически не содержит кардиолипина (¹). Нами было найдено, что в микросомах, выделенных из ряда экспериментальных опухолей, кардиолипин присутствует в значительных количествах (^{2, 3}). Было показано, что P^{32} -фосфат включается в кардиолипин микросом опухолей медленнее, чем в кардиолипин митохондрий (⁴). Однако вопрос о том, идентичны ли кардиолипины митохондрий и микросом в химическом отношении, оставался открытым. Кроме того, оставалось невыясненным, содержат ли митохондрии и микросомы опухолей наряду с кардиолипином фосфатидовую кислоту и фосфатидилглицерин, являющиеся промежуточными продуктами его биосинтеза (⁵).

В настоящем сообщении описаны результаты, полученные при исследовании содержания этих трех фосфолипидов (обозначенных далее как «полиглицерофосфатиды») в митохондриях и микросомах саркомы Иенсена.

Для исследования была использована ткань саркомы Иенсена, взятая на 14 день после перевивки опухоли. Митохондрии и микросомы выделяли из 540 г ткани (80 крыс) с помощью дифференциального центрифугирования (^{2, 3}). Чистоту изолированных субклеточных фракций проверяли, как указано в (^{2, 3}). Полученные митохондрии и микросомы трижды экстрагировали смесью хлороформ — метанол (2 : 1) и количество фосфолипидов определяли по содержанию фосфора (⁶). Кардиолипин выделяли из суммарного липидного экстракта хроматографией на колонке с силикагелем КСК (100—150 меш), отмытого от катионов; соотношение адсорбент : липиды 100 : 1. Фракция, содержащая кардиолипин, элюировалась смесью хлороформ — метанол (9 : 1). Кардиолипин идентифицировали тонкослойной хроматографией: а) на силикагеле КСК (150—200 меш) в системе хлороформ — метанол — концентрированный аммиак (14 : 6 : 1), б) на силикагеле, импрегнированном 0,1 М NaHCO_3 , в системе хлороформ — метанол — 1 М аммиак (80 : 36 : 2) (⁷), в) на силикагеле, импрегнированном 0,001 М Na_2CO_3 , в системе хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода (50 : 25 : 7 : 3) (⁷). Мягкий щелочной гидролиз фосфолипидов проводили по методу (⁸) и полученные продукты дезацилирования идентифицировали хроматографией на бумаге «Фильтрак № 3» в системах: 1) пропанол — концентрированный аммиак — вода (6 : 3 : 1) и 2) 1 М ацетат аммония — этанол (35 : 65) (⁷). Для сравнения использовали кардиолипин, фосфатидилглицерин и фосфатидовую кислоту печени крыс, продукты их дезацилирования и глицеро-3-фосфат. Перевод кардиолипина в Na-форму проводили трехкратной обработкой его раствором натриевой соли этилендиаминотетрауксусной кислоты (⁹). Фосфолипиды обнаруживали на бумаге реагентом Хейнса и Ишервуда (¹⁰), на пластинках — реагентом Васьяковского (¹¹).

Таблица 1

Тонкослойная хроматография фракций полиглицерофосфатидов
митохондрий и микросом саркомы Иенсена (R_f)

Системы	Митохондрии		Микросомы			Свидетели			Литературные данные (?)	
	кардиолипин	фосфатидовая кислота	кардиолипин	фосфатидовая кислота	фосфатидил-глицерин	кардиолипин	фосфатидовая кислота	фосфатидил-глицерин	кардиолипин	фосфатидил-глицерин
Хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода (50 : 25 : 7 : 3)	0,93	Фронт	0,94	Фронт	0,69	0,94	Фронт	0,70	Фронт	0,72
Хлороформ — метанол — 1M аммиак (80 : 36 : 2)	0,55	0,78	0,58 0,62	0,80	0,40	0,55	0,78	0,39	0,56	0,36
Хлороформ — метанол — аммиак (14:6:1)	0,40	0,62	0,40	0,63	0,25	0,40	0,59	0,28	—	—

При тонкослойной хроматографии фракции полиглицерофосфатидов, полученной из митохондрий саркомы Иенсена, было обнаружено два компонента, которые были идентифицированы как кардиолипин и фосфатидовая кислота (табл. 1). Их строение подтверждено бумажной хроматографией продуктов дезацилирования (табл. 2). Ранее было показано, что митохондрии печени крыс ⁽⁷⁾ и морских свинок ⁽¹²⁾ способны синтезировать фосфатидилглицерин из α -глицеро-3-фосфата и ЦДФ-*D*-диглицерида, но его содержание в митохондриях печени крыс очень мало ⁽¹³⁾. Полученные нами данные показывают, что в митохондриях саркомы Иенсена фосфатидилглицерин отсутствует или содержится лишь в крайне незначительных количествах.

При тонкослойной хроматографии полиглицерофосфатидов, полученных из микросом саркомы Иенсена, было обнаружено 4 компонента (табл. 1), которые были идентифицированы как фосфатидовая кислота, фосфатидилглицерин и кардиолипин (2 пятна). Недавно было показано, что хроматографическая подвижность кардиолипина зависит от связанных катионов ⁽⁸⁾. Для того чтобы убедиться, что в микросомах саркомы Иенсена кардиолипин присутствует в разных катионных формах, полученную фракцию полиглицерофосфатидов обрабатывали натриевой солью этилендиаминотетрауксусной кислоты, после чего было обнаружено только одно пятно, соответствующее кардиолипину (R_f 0,58). Мягкий щелочной гидролиз и последующая бумажная хроматография продуктов дезацилирования подтвердили данные тонкослойной хроматографии (табл. 2). Содержание полиглицерофосфатидов в микросомах саркомы Иенсена составляет 9,7% от суммы фосфолипидов. Отношение фосфатидовая кислота : фосфатидилглицерин : кардиолипин 7 : 3 : 10.

Тонкослойная хроматография в системе хлороформ — метанол — аммиак (14:6:1), которая применяется нами при двухмерной хроматографии фосфолипидов (2 направление) ^(2, 3), показала, что фосфатидовая кислота, кардиолипин и фосфатидилглицерин имеют несовпадающие значения R_f и взаимно не перекрываются. Следовательно, полученные нами ранее данные о количественном содержании кардиолипина в субклеточных фракциях печени и опухолей ^(2, 3) относятся к собственно кардиолипину. Фосфатидилглицерин и фосфатидовая кислота ранее не были обнаружены, так как их количества значительно меньше.

Хроматография на бумаге продуктов дезацилирования фракции
полиглицерофосфатидов митохондрий и микросом саркомы Иенсена (R_f)*

Системы	Митохондрии		Микросомы			Свидетели			Литературные данные (?)		
	ГФ	ГФГФГ	ГФ	ГФГ	ГФГФГ	ГФ	ГФГ	ГФГФГ	ГФ	ГФГ	ГФГФГ
Пропанол — аммиак — вода (6:3:1) 1M ацетат аммония— этанол (35:65)	0,26	0,40	0,28	0,50	0,40	0,26	0,51	0,39	0,20	0,43	0,31
	0,34	0,63	0,33	—	0,62	0,32	—	0,62	0,31	—	0,61

* ГФ — глицерофосфат, ГФГ — диглицерофосфат, ГФГФГ — триглицерофосфат; некоторые расхождения с литературными данными в величинах R_f , видимо, объясняются разными сортами бумаги.

Таким образом, установлено, что кардиолипины митохондрий и микросом саркомы Иенсена отличаются друг от друга только количеством катионных форм. Не исключено, что метаболическая активность этих форм различна. Опухолевые микросомы содержат (в отличие от митохондрий) значительное количество фосфатидилглицерина.

Способность синтезировать фосфатидилглицерин была ранее продемонстрирована для микросом сердца быка (¹⁴) и печени крыс (¹⁵). Наши данные, однако, показывают, что в микросомах нормальной печени крыс фосфатидилглицерин в заметных количествах не содержится (^{2, 3}). Наличие относительно больших количеств фосфатидилглицерина и кардиолипина в микросомах саркомы Иенсена показывает, что последние способны синтезировать оба фосфолипида, но превращение фосфатидилглицерина в кардиолипин осуществляется опухолевыми микросомами медленнее, чем митохондриями.

Институт химии природных соединений
им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР
Москва

Поступило
13 I 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. Fleischer, G. Rouser, J. Am. Oil Chem. Soc., **42**, 588 (1965). ² Э. В. Дятловицкая, Т. И. Торховская, Л. Д. Бергельсон, ДАН, **186**, 948 (1969). ³ L. D. Bergelson, E. V. Dyatlovitskaya et al., Biochim. et biophys. acta, **210**, 287 (1970). ⁴ Э. В. Дятловицкая, В. М. Трусова и др., Биохимия, **37**, 607 (1972). ⁵ N. Z. Stanacev, Y. Y. Chang, E. P. Kennedy, J. Biol. Chem., **242**, 3018 (1967). ⁶ G. R. Bartlett, J. Biol. Chem., **234**, 466 (1959). ⁷ K. Y. Hostetler, H. van den Bosch, L. L. M. van Deenen, Biochim. et biophys. acta, **239**, 113 (1971). ⁸ Y. Y. Chang, E. P. Kennedy, J. Biol. Chem., **242**, 516 (1967). ⁹ H. Nielsen, Biochim. et biophys. acta, **231**, 370 (1971). ¹⁰ C. S. Haynes, F. A. Isherwood, Nature, **164**, 1107 (1949). ¹¹ V. E. Vaskovsky, G. Y. Kostetsky, J. Lipid Res., **9**, 396 (1968). ¹² J. B. Davidson, N. Z. Stanacev, Canad. J. Biochem., **49**, 1117 (1971). ¹³ G. M. Gray, Biochim. et biophys. acta, **84**, 35 (1964). ¹⁴ L. Stuhne-Sekalec, N. Z. Stanacev, Canad. J. Biochem., **48**, 1214 (1970). ¹⁵ L. M. G. van Golde, B. Fleischer, S. Fleischer, Biochim. et biophys. acta, **249**, 318 (1971).