

УДК 576.35

БИОХИМИЯ

А. В. АЛЕСЕНКО, Е. Б. БУРЛАКОВА

СВЯЗЬ ИЗМЕНЕНИЯ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИПИДОВ С СИНТЕЗОМ ДНК В РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ

(Представлено академиком С. Е. Севериным 19 IV 1972)

Ранее (¹) нами на синхронизированной культуре клеток HeLa было показано, что антиокислительная активность липидов резко изменяется при прохождении клетками фаз жизненного цикла. Было установлено, что в фазе G_1 значение антиокислительной активности максимально, в фазе синтеза ДНК антиокислительная активность резко снижается, а в фазе G_2 антиокислительные свойства липидной вытяжки вновь нарастают.

Наряду с изучением антиокислительной активности липидов по стадиям клеточного цикла в изолированных клетках, мы поставили перед собой задачу изучить изменение этой физико-химической характеристики липидов для клеточного деления в условиях целостного организма.

С определенной степенью синхронности делятся клетки печени на начальных этапах регенерации органа после частичной гепатэктомии (^{2, 3}). Данная модель является особенно удачной в том смысле, что представляет собой популяцию синхронно делящихся клеток, находящихся под контролем организма.

Поэтому регенерирующая печень была использована нами для изучения антиокислительной активности по стадиям клеточного цикла. Поскольку мы придаем определенное значение участию природных антиоксидантов в процессах клеточного деления, то мы считали важным установить связь между изменением антиокислительной активности липидов целой клетки и ее ядер и вступлением клеток в стадию синтеза ДНК.

За процессом синтеза ДНК следили по включению меченого тимидина в клетки регенерирующей печени. Это позволило нам выделить временные интервалы, которые соответствовали нахождению клеток преимущественно в фазе синтеза ДНК, перед и после нее.

Были использованы половозрелые мыши-самцы, гибриды СВА/С₅₇Bl F₁ весом от 18 до 20 г. Мыши перед операцией содержались на общепитательном рационе. Частичную гепатэктомию проводили по методу (⁴). В наших опытах операция проводилась с использованием эфирного наркоза и в стерильных условиях. Контролем служили intactные животные и мыши, которым была проведена ложная операция. Оперирование контрольных и опытных животных проводили с таким расчетом, чтобы исключить влияние суточного ритма митозов (⁵), синтеза ДНК (⁷) и антиокислительной активности липидов (⁸) на исследуемые нами закономерности. После операции в течение 12 час. мыши для питья получали физиологический раствор, что способствует восстановлению кровопотери.

В каждом опыте было использовано 130 животных. Опыт был повторен дважды.

За синтезом ДНК следили по накоплению меченых ядер в клетках регенерирующей печени. Животным за час до забоя вводили 10 μ C тимидина на мышь. Суспензию клеток, полученную при гомогенизации ткани печени на пестиковом гомогенизаторе в 0,1 M растворе цитрата Na, наносили на предметное стекло, фиксировали в смеси абсолютный

спирт : уксусная кислота 3 : 1 и покрывали фотоэмульсией типа М. Экспонирование препаратов проводили в течение 3—4 недель. Подсчитывали процент меченых клеток на 1000 клеток. Данный способ подсчета индекса метки дает возможность определить суммарное количество всех типов клеток печени, синтезирующих ДНК в данный отрезок времени. Поскольку мы извлекали липиды из гомогената цельной печени, то имело смысл определять долю меченых клеток именно этим способом.

Ядра из клеток печени выделяли из предварительно измельченной печени, которую гомогенизировали на пестиковом гомогенизаторе в растворе: сахаразы 0,41 М, трис 0,01 М, $MgCl_2$ 0,0045 М при pH 7,8. Ткань и раствор брали в соотношении, равном 1 : 5. Полученный гомогенат фильтровали через 4 слоя марли. Осадок на марле промывали двумя объемами раствора сахаразы. Суспензию центрифугировали при 1000 g в течение 15 мин. Осадок, полученный в результате этого центрифугирования, гомогенизировали на гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в растворе сахаразы, $d = 1,294$, и центрифугировали в течение 30 мин. при 38 000 об/мин. на роторе SW-39 с подслонкой из сахаразы, $d = 1,295$. Чистоту ядерной фракции определяли микроскопически, окрашивая мазки метиловым зеленым пиронином.

Липиды из гомогената печени и ядер клеток печени извлекали смесью хлороформ : эфир 1 : 1. Антиокислительную активность липидов определяли на метилолеатной модели (⁹).

Результаты эксперимента и их обсуждение. На рис. 1, 1 представлено изменение процента меченых ядер клеток печени на ранних стадиях ее регенерации. В течение первых двадцати часов после операции уровень синтеза ДНК в регенерирующей печени не отличается от контроля и лишь через 26 час. небольшое количество клеток (около 6%) начинает синтез ДНК. Далее число меченых ядер стремительно нарастает, достигая максимума к 38 час. Максимальное число клеток, одномоментно синтезирующих ДНК, равно 50%. Таким образом, в наших экспериментах фаза $G_0 + G_1$ занимает интервал времени до 28 час., затем с 30 до 60 час. значительное количество клеток синтезирует ДНК.

Начиная с 18 час. после операции и далее до 72 час. мы исследовали изменение антиокислительной активности липидов, извлеченных из гомогената печени. Полученные данные представлены на рис. 1, 2, из которого видно, что антиокислительные свойства липидной вытяжки претерпевают значительные изменения. Начиная от 20 до 28 час. после операции наблюдается резкое повышение антиокислительных свойств липидной вытяжки. В момент, когда появляется заметное количество клеток, синтезирующих ДНК, антиокислительная активность липидов быстро снижается. Липидные вытяжки, извлеченные из клеток печени в эти интервалы времени, не только не задерживают окисление метилолеата, но ускоряют процесс его окисления. Поэтому антиокислительная активность принимает отрицательные значения. По мере продвижения клеток по фазе S происходит постепенное повышение антиокислительных свойств липидной вытяжки, которое достигает положительных значений в самом конце этой фазы и при переходе в G_2 -фазу. Антиокислительная активность липидов, извлеченных из печени интактных и ложнооперированных (на 30 и 48 час. после операции) животных и регенерирующей печени через 18 час. (кривая 3), практически совпадает.

Таким образом, мы получили, что антиокислительная активность липидов клеток регенерирующей печени максимальна в конце фазы G_1 . В момент синтеза ДНК ее значения минимальны. При переходе в фазу G_2 уровень антиокислительной активности вновь повышается.

Поскольку основной целью нашей работы явилось выяснение связи изменения антиокислительной активности липидов с процессами клеточной пролиферации, то, на наш взгляд, принципиально важно было уста-

новить, сохраняются ли закономерности изменения антиокислительной активности липидов, полученные для целой клетки и для ядерной фракции клеток регенерирующей печени.

На рис. 2 представлено изменение антиокислительной активности липидов, извлеченных из ядер регенерирующей печени (кривая 1) и гомогената через 18, 28 и 44 час. после операции. Оказалось, что, как и для целой печени, липиды ядер обладают наибольшим антиокислительным действием через 28 час. после операции. В этот интервал времени

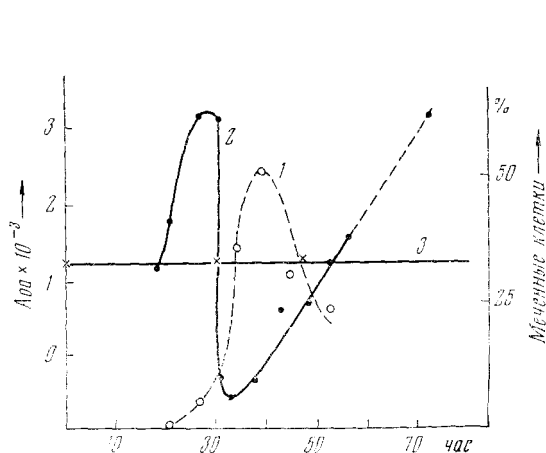


Рис. 1

Рис. 1. Процент меченых клеток (1) и изменение антиокислительной активности (а.о.а.) липидов (2) в регенерирующей печени мышей. 3 — контроль

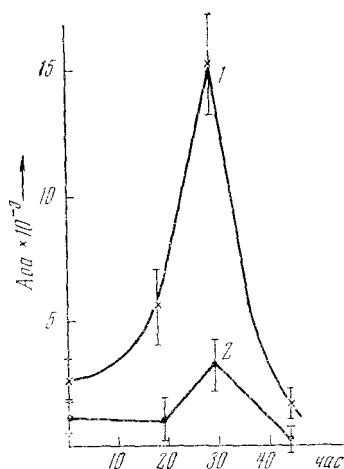


Рис. 2

Рис. 2. Изменение антиокислительной активности липидов, извлеченных из ядер регенерирующей печени мышей (1) и гомогената регенерирующей печени (2)

клетки печени находятся в пресинтетической фазе цикла. Минимальное значение антиокислительной активности по-прежнему было получено для фазы синтеза ДНК. Уровень антиокислительной активности липидов контрольных ядер (из клеток печени интактных животных) и ядер, полученных через 18 час. после операции, практически совпадает. Следует отметить, что общий уровень антиокислительной активности липидов ядер значительно выше, чем в целой клетке. По всей вероятности, в ядре сосредоточены значительные количества антиоксидантов липидной природы. Но на основании настоящих данных мы не можем утверждать, что все природные антиоксиданты сосредоточены в ядре, поскольку мы не измеряли антиокислительную активность липидных вытяжек, извлеченных из других субклеточных фракций.

Однако, хотя величины антиокислительной активности липидов клеток и ядер оказались существенно различными, характер же изменения антиокислительной активности липидов ядерной фракции совпадает с характером изменения антиокислительной активности липидов целой клетки.

Таким образом, если сравнить полученные закономерности по изменению антиокислительной активности липидов в культуре клеток с данными об изменении антиокислительной активности липидов в регенерирующей печени, то видно, что они носят аналогичный характер. В обоих случаях эта величина повышается перед синтезом ДНК, в процессе синтеза она принимает минимальные значения и вновь нарастает, когда синтез ДНК закончен.

По-видимому, полученные закономерности изменения антиокислительной активности липидов *in vitro* и *in vivo* по стадиям клеточного цикла являются характерными для делящейся клетки.

Каким образом могут быть объяснены представленные данные, исходя из предположения, что антиокислительная активность липидов является отражением тех биосинтетических процессов, которые протекают в клетке при подготовке ее к митозу?

В последнее время началось интенсивное изучение роли клеточных мембран в процессе биосинтеза белка и нуклеиновых кислот. В связи с этим пристальное внимание исследователей стали привлекать липиды, поскольку они наряду с белками являются основными элементами клеточных мембран.

Физико-химические свойства липидов могут изменять физико-химические свойства мембраны в целом и в определенной степени влиять на скорость синтетических процессов, происходящих на мембране. Поскольку антиокислительная активность является отражением именно физико-химических свойств липидных компонентов, то ее изменение может быть связано с теми процессами в клетке, которые происходят на мембранных структурах.

В многочисленных работах показано, что в бактериальной клетке место репликации ДНК всегда связано с мембраной (¹⁰⁻¹²). В клетках млекопитающих также обнаружен ДНК-гистоно-липопротеидный комплекс (¹³⁻¹⁵), существование которого, как предполагают авторы, целиком определяется процессом комплексобразования ДНК с компонентами ядерной мембраны. Наличие свободной валентности в мембранных липидах может прямо или опосредованно влиять на процесс образования этого комплекса.

В наших экспериментах *in vitro* и *in vivo* было получено, что в фазе синтеза ДНК происходит понижение антиокислительной активности липидов по сравнению с другими фазами клеточного цикла. Таким образом, в фазе S наиболее благоприятными являются условия радикалообразования в липидах, и это, в свою очередь, может отразиться на прочности комплекса ДНК с мембраной в момент ее репликации.

Дальнейшие исследования изменения антиокислительной активности липидов мембран клеточных органелл и связь ее с функциональной и пролиферативной способностью клетки позволит уточнить роль липидов в механизмах клеточного деления.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
19 IV 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. В. Алесенко, Е. Б. Бурлакова, А. А. Вайнсон, ДАН, **202**, № 4 (1972). ² И. Д. Беляева, Бюлл. эксп. биол. и мед., **71**, № 5, 99 (1971). ³ З. А. Рябинина, В. Ф. Сидорова, Е. М. Лейкина, В сборн. Регенерация печени у млекопитающих, 1967. ⁴ Е. Б. Бурлакова, Биофизика, **12**, 82 (1967). ⁵ G. M. Higgins, R. M. Anderson, Arch. Biochem. and Biophys., **35**, 340 (1952). ⁶ I. I. Jaffe, Anat. Record, **120**, 935 (1954). ⁷ A. M. Brues, B. V. Marble, J. Exp. Med., **65**, 15 (1937). ⁸ А. В. Алесенко, Н. И. Дубинская, Е. Б. Бурлакова, Биофизика, **16**, в. 3, 476 (1971). ⁹ Е. Б. Бурлакова, Н. М. Дзюба, Н. П. Пальмина, Биофизика, **10**, 766 (1965). ¹⁰ A. Ryter, Y. Hirota, F. Jacob, Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., **33**, 669 (1968). ¹¹ A. Ryter, O. Landman, J. Bacteriol., **88**, 457 (1964). ¹² N. Chai, K. G. Lark, J. Bacteriol., **94**, 415 (1967). ¹³ D. E. Comings, T. Kakefuda, J. Mol. Biol., **33**, 255 (1968). ¹⁴ V. Jackson, J. E. Earnhardt, R. Chalkley, Biochem. Biophys. Res. Commun., **33**, 253 (1968). ¹⁵ A. R. Lehmann, M. G. Ormerod, Biophys. Soc. Program and Abstr. 15th Ann. Meet., New Orleans, 1971, p. 149.