

УДК 577.3

БИОХИМИЯ

Ю. П. КОЗЛОВ, В. Б. РИТОВ, В. Е. КАГАН

ТРАНСПОРТ Ca^{2+} И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ МЕМБРАН САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

(Представлено академиком Г. М. Франком 7 V 1973)

В качестве объекта для изучения связи свободнорадикального окисления липидов со структурно-функциональной целостностью биологических мембран (¹⁻⁴) в настоящей работе выбраны фрагменты саркоплазматического ретикулума (ф.с.р.) скелетных мышц, в мембраны которых встроена Ca^{2+} -зависимая АТФаза, осуществляющая транслокацию Ca^{2+} внутрь везикул ф.с.р. (^{5, 6}).

Методы и материалы. Фрагменты саркоплазматического ретикулума выделяли из белых скелетных мышц кролика по методу (⁷). Липиды экстрагировали по модифицированной методике Фолча (⁸). Реактивы: АТФ- Na_2 , гистидин, трис — «Reanal», ЭГТА — фирмы «Schuchardt»; хроматографически чистая линоленовая кислота получена из препарата квалификации х.ч. («Союзреактив»). Гидроперекись линоленовой кислоты выделена из продуктов окисления линоленовой кислоты в тонкой пленке кислородом воздуха при 37° по методике (⁹). Остальные реактивы — марки х.ч. («Союзреактив»). Поглощение Ca^{2+} и АТФазную активность регистрировали по изменению рН в результате гидролиза АТФ Ca^{2+} -зависимой АТФазой (¹⁰). Для регистрации транспорта Ca^{2+} применялось также нефелометрическое определение содержания оксалата кальция в везикулах ф.с.р. (¹¹). Среда инкубации для измерения поглощения Ca^{2+} и АТФазной активности ф.с.р.: 100 мМ NaCl, 2 мМ MgCl_2 , 1,9 мМ АТФ, 5 мМ оксалат натрия, 42 мМ CaCl_2 , 10 мМ трис, рН 7,2, 37°, ~100 мкг белка ф.с.р. в 1 мл, объем среды инкубации 4 мл.

Белок определяли по биуретовой реакции. О накоплении гидроперекисей полиненасыщенных жирных кислот в мембранах ф.с.р. судили по величине поглощения раствора липидов ф.с.р. в этаноле — гептане (2 : 1) при 234 мμ (¹²); количественный анализ продуктов свободнорадикального окисления липидов ф.с.р. проводили методом полярграфии со ртутно-капельным электродом (¹³).

Результаты и обсуждение. В качестве индукторов свободнорадикального окисления липидов в мембранах ф.с.р. были использованы аскорбиновая кислота и ионы Fe^{2+} (^{1, 2}). Преинкубация ф.с.р. с аскорбиновой кислотой в присутствии 2—6 мМ FeSO_4 приводит к резкому снижению скорости поглощения Ca^{2+} . Как видно из рис. 1, степень ингибирования поглощения Ca^{2+} увеличивается по мере увеличения времени преинкубации ф.с.р. с аскорбиновой кислотой и FeSO_4 , и через 10—30 мин. (в зависимости от концентрации FeSO_4) ф.с.р. полностью теряют способность поглощать Ca^{2+} , тогда как скорость гидролиза АТФ под действием Ca^{2+} -зависимой АТФазы остается на достаточно высоком уровне, хотя в некоторых опытах наблюдалось достоверное ингибирование активности АТФазы (табл. 2). Ингибирующее действие аскорбиновой кислоты и ионов железа проявляется только в определенной области их концентраций: оптимальная концентрация аскорбиновой кислоты составляет 0,2—0,4 мМ, а FeSO_4 2—6 мМ.

Обязательность совместного присутствия ионов железа и аскорбиновой кислоты, экстремальный характер концентрационных зависимостей, а так-

же монотонное нарастание их ингибирующего действия во времени характерны для процесса аскорбат-зависимого перекисного окисления липидов (^{1, 2}). Действительно, как видно на рис. 1, параллельно с ингибированием поглощения Ca^{2+} (рис. 1, 4) наблюдается накопление гидроперекисей в полиненасыщенных ацилах мембранных фосфолипидов (рис. 1, 5).

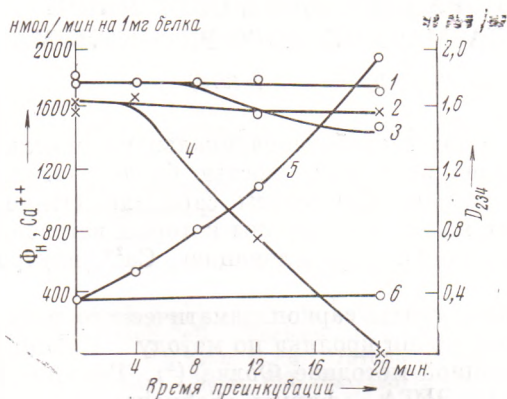


Рис. 1

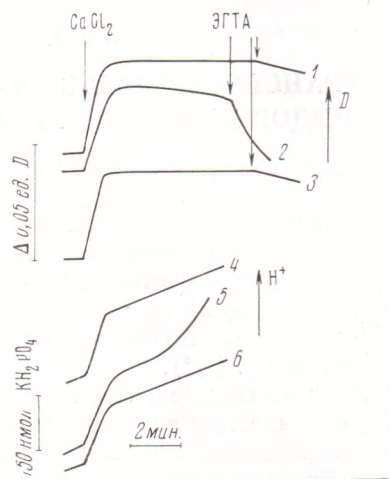


Рис. 2

Рис. 1. Ингибирование поглощения Ca^{2+} при индукции свободнорадикального окисления липидов мембран ф.с.р. аскорбиновой кислотой (0,2 мМ) и FeSO_4 (6 мМ). Ф.с.р. (5 мг/мл) инкубировали при 37° в среде, используемой для регистрации их функциональной активности в отсутствие АТФ, и через различные промежутки времени отбирали пробы для определения АТФазной активности (1, 3) поглощения Ca^{2+} (2, 4) и накопления гидроперекисей (5, 6). 1, 2, 6 — контроль, 3, 4, 5 — преинкубация с аскорбиновой кислотой и FeSO_4 .

Рис. 2. Кинетика транспорта Ca^{2+} (1, 2, 3) и гидролиза АТФ (4, 5, 6) в контроле (1, 4), в присутствии аскорбиновой кислоты (0,2 мМ) и 2 мкмол. FeSO_4 (2, 5) в присутствии аскорбиновой кислоты, FeSO_4 и α -токоферола (10 мМ) или только аскорбиновой кислоты (3, 6). Аскорбиновую кислоту и FeSO_4 добавляли в пробы за 4 мин. до введения CaCl_2 ; 20 мкл раствора α -токоферола в этаноле добавляли непосредственно перед аскорбиновой кислотой. ЭГТА 0,25 мМ, остальные условия см. в тексте

Таким образом, индуцированное в мембранах ф.с.р. свободнорадикальное окисление липидов сопровождается уменьшением эффективности системы транспорта Ca^{2+} (т. е. снижением величины $\text{Ca}^{2+}/\text{АТФ}$), причем уменьшение отношения $\text{Ca}^{2+}/\text{АТФ}$ во времени вполне удовлетворительно коррелирует с регистрируемым полярографически накоплением гидроперекисей в липидах ф.с.р. (табл. 1). Дальнейшим подтверждением взаимосвязи процессов свободнорадикального окисления мембранных липидов и «разобщения» поглощения Ca^{2+} с гидролизом АТФ являются результаты, представленные в табл. 2. Ингибиторы свободнорадикальных реакций (α -токоферол, 4-метил-2,6-дитретбутилфенол) предотвращают индуцируемое липоперекисление в мембранах ф.с.р. и оказывают защитное действие на систему активного транспорта Ca^{2+} .

Естественно предположить, что наблюдаемое в этих условиях уменьшение величины $\text{Ca}^{2+}/\text{АТФ}$ имеет в своей основе увеличение пассивной проницаемости мембран ф.с.р. для ионов Ca^{2+} , тем более, что АТФаза «перекисленных» везикул по-прежнему остается Ca^{2+} -зависимой. На рис. 2 представлены изменения оптической плотности и pH суспензии ф.с.р., отражающие соответственно кинетику транспорта Ca^{2+} и гидролиза АТФ в различных условиях инкубации. Как видно из рис. 2, 1, 4, в контроле поглощение добавленного Ca^{2+} (нарастание оптической плотности) сопровождается синхронной активацией Ca^{2+} -зависимой АТФазы (закисление

среды), и после истощения Ca^{2+} в наружной среде не наблюдается изменений оптической плотности и скорости закисления среды во времени. Медленное уменьшение оптической плотности после добавления специфического комплексона Ca^{2+} — ЭГТА является результатом выхода Ca^{2+} из ф.с.р., причем скорость «просветления» пропорциональна скорости выхода Ca^{2+} (¹⁴). Инкубация ф.с.р. с аскорбиновой кислотой и ионами железа приводит к значительно более быстрому «просветлению» суспензии ф.с.р. в ответ на добавку ЭГТА (рис. 2, 2), т. е. увеличивает пассивную проницаемость мембран ф.с.р. для Ca^{2+} . Подтверждением этому служит также активация Ca^{2+} -зависимой АТФазы по мере увеличения времени инкубации ф.с.р. с аскорбиновой кислотой и FeSO_4 (рис. 2, 5).

Таким образом, развитие процесса свободнорадикального окисления липидов в мембранах ф.с.р. имеет своим следствием появление значительной проницаемости мембран везикул для ионов Ca^{2+} . В самом деле, если обычно проницаемость мембран для ионов Ca^{2+} составляет 30–100 пмол/см² в 1 мин. (¹⁵), исходя из величины площади поверхности везикул, равной 2000–3000 см² на 1 мг белка (⁶), то скорость выхода Ca^{2+} из ф.с.р. в результате перекисного окисления липидов становится, по крайней мере, не менее 750–1500 пмол/см² в 1 мин., т. е. не менее скорости поступления Ca^{2+} внутрь везикул при непрерывной работе кальциевого насоса (рис. 1, табл. 2). Количественный анализ продуктов свободнорадикального окисления липидов (табл. 1, 2) показывает, что к этому моменту образуется 20–30·10⁻⁹ мол. гидроперекисей на 1 мг фосфолипидов, что составляет лишь незначительную часть (около 2,5%) от общего количества фосфолипидов, образующих мембраны ф.с.р.

Рассмотрим ряд возможных причин увеличения пассивной проницаемости мембран ф.с.р. Образование заполненных водой каналов в мембране вследствие появления в ее гидрофобном липидном слое полярных гидроперекисных группировок маловероятно, поскольку, исходя из величины скорости диффузии для Ca^{2+} в воде, равной 4,2·10⁻⁴ мол/(см² мин) (¹⁵),

Таблица 1
Накопление гидроперекисей липидов и изменение величины Ca^{2+} /АТФ во времени при инкубации ф.с.р. с аскорбиновой кислотой и ионами железа

Время инкубации, мин.	Содержание гидроперекисей, (нмол. на 1 мг липидов)	Ca^{2+} /АТФ
0	2,6	0,90
4	5,3	0,95
8	10,0	0,66
12	14,1	0,49
20	16,4	0,00

Примечание. Здесь и в табл. 2 условия опыта те же, что и на рис. 1.

Таблица 2

Действие ингибиторов свободнорадикальных реакций на транспорт Ca^{2+} в ф.с.р. при инкубации с аскорбиновой кислотой и ионами железа в течение 25 мин.

Добавки	Скорость гидролиза АТФ, нмол. Р _i в 1 мин. на 1 мг белка	Скорость поглощения Ca^{2+} , нмол. Ca^{2+} в 1 мин. на 1 мг белка	Содержание гидроперекисей в липидах ф.с.р., нмол. на 1 мг липидов	Оптическая плотность раствора липидов при $\lambda_{\text{max}} \approx 234 \text{ м}\mu$, мг лип. на 1 мл
—	2980	3340	1,0	0,40
Аскорбиновая кислота ($2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$)	3030	3330	1,4	0,29
Аскорбиновая кислота ($2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) + FeSO_4 ($3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$)	2050	975	30,3	2,08
Аскорбиновая кислота ($2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) + FeSO_4 ($3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) + 4-метил-2,6-дитретбутилфенол (10^{-4} M)	2810	3150	2,0	0,55
Аскорбиновая кислота ($2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) + FeSO_4 ($3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) + α -токоферол (10^{-5} M)	3170	3550	1,8	0,50

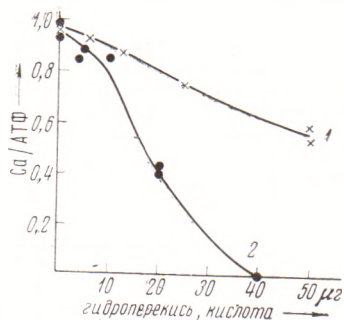


Рис. 3. Изменения величины Ca/ATP в результате преинкубации ф.с.р. в течение 2 мин. с гидроперекисью линоленовой кислоты (1) или с линоленовой кислотой (2). Гидроперекись кислоты и кислоту добавляли в пробу в виде раствора в метаноле (20 μ л). Содержание гидроперекиси в препарате гидроперекиси линоленовой кислоты 0,46 μ мол/мг

скорость потока Ca^{2+} через подвергшиеся переокислению участки мембраны должна быть, по крайней мере, на четыре порядка больше. В этой связи интересно, что экзогенно вводимая в суспензию ф.с.р. гидроперекись линоленовой кислоты в количествах (10–12 μ г), эквивалентных образующимся при индукции липоперекисления в наших условиях, не приводит к сколько-нибудь заметному увеличению пассивной проницаемости для Ca^{2+} по сравнению с действием неокисленной линоленовой кислоты (рис. 3).

Нельзя исключить, что увеличение пассивной проницаемости мембран везикул для Ca^{2+} обусловлено появлением липорастворимых продуктов окислительной деградации фосфолипидов, способных выполнять функцию подвижных переносчиков ионов Ca^{2+} . Следует, однако, указать, что включение продуктов перекисного окисления жирных кислот в искусственные бимолекулярные мембраны не вызывает в них появления проводимости по Ca^{2+} (¹). Более того, отсутствие взаимосвязи между переокисленностью фосфолипидов липосом и проницаемостью их для ионов (¹⁶), а также крайне низкая проницаемость липосом для ионов Ca^{2+} (¹⁵) свидетельствует о существенном вкладе белков в регуляцию проницаемости мембран ф.с.р. для Ca^{2+} , из чего можно сделать заключение об отсутствии сплошного бислоя липидов в мембранах ф.с.р. Вероятно, увеличение пассивной проницаемости мембран ф.с.р. для Ca^{2+} , индуцированное свободно-радикальным окислением липидов в них, может явиться результатом изменения во взаимодействиях гидрофобных участков белковых молекул мембран с их липидным окружением при появлении полярных продуктов автоокисления липидов.

Авторы выражают благодарность М. Н. Мерзляку за любезно предоставленный препарат α -токоферола.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
21 IV 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков, Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, «Наука», 1972.
- ² Ю. П. Козлов, В. С. Данилов и др., Свободнорадикальное окисление липидов в биологических мембранах, М., 1972.
- ³ В. В. Блоха, В. Е. Каган и др., Биофизика, 17, 549 (1972).
- ⁴ В. Е. Каган, А. А. Шведова и др., 210, 232 (1973).
- ⁵ W. Hasselbach, Progr. Biophys. Mol. Biol., 14, 167 (1964).
- ⁶ W. Hasselbach, In: Biochemistry of Intracellular Structures, Warszawa, 1969, p. 145.
- ⁷ A. Martonosi, J. Biol. Chem., 243, 71 (1968).
- ⁸ J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane Stanley, J. Biol. Chem., 226, 497 (1957).
- ⁹ В. О. Christopherson, Biochim. et biophys. acta, 176, 463 (1969).
- ¹⁰ В. Б. Ритов, Биохимия, 36, 393 (1971).
- ¹¹ A. S. Fairhurst, D. Y. Jenden, Anal. Biochem., 16, 294 (1969).
- ¹² J. L. Bolland, H. P. Koch, J. Chem. Soc., 7–12, 445 (1945).
- ¹³ В. С. Данилов, В. Е. Каган и др., Изв. АН СССР, сер. биол., 4, 574 (1972).
- ¹⁴ В. Б. Ритов, Исследование биохимических механизмов мембранно-миофибриллярной связи, Автореф. кандидатской диссертации, МГУ, 1972, стр. 5.
- ¹⁵ J. M. Vanderkooi, A. Martonosi, Arch. Biochem. and Biophys., 147, 632 (1971).
- ¹⁶ M. E. Leibowitz, M. C. Johnson, J. Lip. Res., 12, 662 (1971).