Доклады Академии наук СССР
1974. Том 214, № 6

УДК 547.922:577.1.088.91

БИОХИМИЯ

И. К. КОЛОМИЙЦЕВА, Ю. С. КАЗНАЧЕЕВ

ОБМЕН ХОЛЕСТЕРИНОМ МЕЖДУ ОРГАНЕЛЛАМИ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ

(Представлено академиком Г. М. Франком 27 VI 1973)

Холестерин является непременной составной частью липидов биологических мембран. Биосинтез холестерина осуществляется в определенных локусах эндоплазматического ретикулума ([1, 2]). Однако очень быстро после введения в организм животного меченого предшественника, например C^{14}-ацетата, меченый холестерин обнаруживается не только в микросомальной фракции, но и в других субклеточных органеллах — ядрах и митохондриях ([3, 4]). Можно полагать, что синтезированный в микросомах меченый холестерин попадает в ядра и митохондрии по обменному механизму, аналогичному обнаруженному для фосфолипидов. Показано, что фосфолипиды биологических мембран способны к быстрой продольной диффузии и межмембранному обмену ([5–8]). Обмен фосфолипидами между микросомами и митохондриями, а также между митохондриями и искусственными фосфолипидными агрегатами ускоряется стимуляторами белковой природы, обнаруженными во фракции печени при 105 000 *g* — надосадочной жидкости ([9, 10]). В отсутствие стимуляторов существует обмен фосфолипидами между вышеуказанными частицами, однако общее количество перенесенной активности оказывается сниженным в ~10–20 раз. Мы поставили своей задачей выяснить возможности переноса меченых молекул холестерина между субклеточными органеллами клеток печени крыс in vitro в условиях, аналогичных для исследований переноса меченых фосфолипидов. Был изучен перенос C^{14}-холестерина из меченой микросомальной фракции в немеченые митохондриальную и ядерную фракции, а также перенос C^{14}-холестерина из меченых митохондрий в немеченые микросомы и количественно охарактеризован обмен холестерином между микросомальной и митохондриальной фракциями по относительной скорости переноса. Крысам за 1 час до декапитации вводили 200 μC C^{14}-ацетата на 100 г веса. Ядерную, митохондриальную и микросомальную фракции получали дифференциальным центрифугированием по стандартной методике в 0,25 *M* растворе сахарозы ([11]). Одновременно получали немеченые субклеточные фракции от контрольных крыс. За чистотой субклеточных фракций следили при просмотре в фазово-контрастном микроскопе и по биохимическим тестам. Пробы, содержащие 10–13 мг белка микросом, 37–44 мг белка митохондрий и 33–69 мг белка надосадочной жидкости 105 000 *g* в растворе 0,25 *M* сахарозы и 1 м*M* растворе ЭДТА инкубировали при 37° в течение времени от 0 до 45 мин. Затем фракции разделяли: липиды экстрагировали по Фольчу ([12]), отделение проводили методом ТСХ, холестерин после элюирования определяли по Либерману — Бурхарду; аликвотную часть использовали для подсчета активности на газопроточном счетчике «Протока». Результаты опытов по переносу C^{14}-холестерина из меченой микросомальной в немеченую митохондриальную фракцию при инкубации в течение 45 мин. представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, после 45 мин. инкубации меченой микросомальной и немеченой митохондриальной фракций в не меченных ранее митохондриях обнаруживаются молекулы C^{14}-холестерина. Появление молекул

Таблица 1

Обмен холестерином между микросомами и митохондриями печени крыс

№№ п.п.	Количество холестерина, μг		Удельная активность холестерина, имп/(мин·мг)				Общая активность *			
	в микросомах	в митохондриях	в микросомах до инкубации	в микросомах после инкубации	в митохондриях после инкубации	в митохондриях, % от исходной активности в микросомах	в микросомах до инкубации	в микросомах после инкубации	в митохондриях после инкубации	в митохондриях, % от исходной активности в микросомах
Между мечеными микросомами и немеченными митохондриями										
1	236	194	1750	—	490	28	403	—	83	25
2	157	212	3170	—	917	29	490	—	194	39
3	208	193	1300	790	410	31	270	164	79	30
4	208	193	1350	760	420	31	282	158	81	29
5	188	249	1900	—	614	32	359	—	153	42
6	360	225	2390	—	1045	43	860	—	232	27
7	408	298	1910	—	700	36	920	—	204	23
Между немеченными микросомами и мечеными митохондриями										
1	433	347	2120	1115	312	15	735	399	136	20
2	510	370	1340	528	266	20	495	195	136	28

* Здесь и в табл. 2 общая активность равна удельной активности, умноженной на количество холестерина данной субклеточной фракции в пробе.

Таблица 2

Обмен холестерином между мечеными микросомами и немеченными ядрами

№№ п.п.	Количество холестерина, μг		Удельная активность холестерина, имп/(мин·мг)			Общая активность		
	в микросомах	в ядрах	в микросомах до инкубации	в ядрах после инкубации	в ядрах, % от исходной активности в микросомах	в микросомах после инкубации	в ядрах после инкубации	в ядрах, % от исходной активности в микросомах
1	188	400	1900	251	13	358	100	28
2	360	470	2390	461	17	860	216	25
3	157	458	3170	380	12	490	174	36
4	236	650	1750	228	13	412	147	36

C^{14}-холестерина в митохондриях наблюдается в условиях, полностью исключающих возможность синтеза, следовательно происходит перенос молекул холестерина из микросом в митохондрии. Количество холестерина на 1 мг белка в каждой фракции не изменяется. За время инкубации в митохондрии из микросом переходит от 23 до 42% общей активности холестерина. Сопоставляя величины удельных активностей холестерина в микросомах и митохондриях, можно видеть, что удельная активность холестерина микросом остается в ~3 раза больше удельной активности холестерина митохондрий. Можно думать, что часть холестерина субклеточных фракций за время инкубации не обменивается.

В табл. 1 приведены также результаты опытов по исследованию обмена холестерином между немеченными микросомами и мечеными митохондриями. Видно, что имеет место обратный перенос C^{14}-холестерина из митохондрий в микросомы. В табл. 2 приведены данные по определению пере-

носа меченого холестерина из меченых микросом в немеченые ядра. Как видно, ядерная и микросомальная фракции обмениваются холестерином. Следует отметить, что удельная активность холестерина ядер после инкубации составляет всего 12—17% величины удельной активности холестерина микросом. Результаты исследования зависимости количества перенесенной активности холестерина от времени инкубации меченых микросом с немечеными митохондриями представлены на рис. 1. Видно, что в течение первых 9 мин. инкубации количество перенесенной активности линейно возрастает со временем инкубации. Следовательно, перенос меченых молекул холестерина из микросом в митохондрии может быть количественно

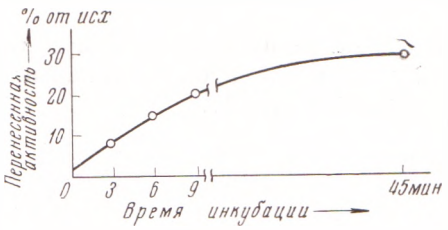

Рис. 1. Зависимость количества общей перенесенной активности холестерина из микросом в митохондрии от времени инкубации. По оси ординат – общая перенесенная активность холестерина в митохондриях в процентах от общей исходной активности холестерина в микросомах

охарактеризован величиной относительной скорости, которая представляет собой отношение общей активности холестерина в митохондриях к исходной общей активности холестерина в микросомах в единицу времени в любой промежуток между 0 и 9 мин. инкубации. Относительная скорость переноса холестерина из микросом в митохондрии составляет 2,1—2,2%; такую же величину имеет относительная скорость переноса холестерина из микросом в ядра. Касаясь вопроса о путях передачи меченых молекул между органеллами, следует отметить, что для холестерина показана способность к быстрой диффузии по искусственной фосфолипидной мембране, способность при контакте жировой капли с мембраной быстро входить в фосфолипидный бислой и выходить из него ([13]). Можно полагать, что перенос холестерина между субклеточными органеллами осуществляется при контакте частиц, с участием переносчиков. Дальнейшие исследования закономерностей обмена холестерином между субструктурами клетки представляет несомненный интерес для выяснения особенностей межмембранных взаимодействий.

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пущино-на-Оке

Поступило
12 VI 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] N. L. R. Bucher, K. McHarraham, J. Biol. Chem., **222**, 1 (1956). [2] K. Bloch, Science, **150**, 19 (1965). [3] A. Pascaud, N. Auliac, M. Pascaud, C. R., **270**, 12, 1624 (1970). [4] И. К. Коломийцева, А. В. Васильев, А. И. Кузин, ДАН, **205**, № 1, 237 (1972). [5] C. J. Scandella, P. Devaux, H. M. McConnel, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **69**, 8, 2056 (1972). [6] K. W. Wirtz, D. B. Zilwersmit, J. Biol. Chem., **243**, 13, 396 (1968). [7] M. Akijma, T. Sakagami, Biochim. et biophys. acta, **187**, 105 (1969). [8] Э. В. Дятловицкая, В. М. Трусова и др., Биохимия, **37**, 3, 607 (1972). [9] K. W. A. Wirtz, D. B. Zilwersmit, Biochim. et biophys. acta, **193**, 1, 105 (1969). [10] D. B. Zilwersmit, J. Biol. Chem., **246**, 8, 2465 (1971). [11] А. А. Покровский, А. И. Арчаков, В кн. Современные методы в биохимии, **2**, 5, М., 1968. [12] J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane-Stanley, J. Biol. Chem., **226**, 497 (1957). [13] В. А. Ненашев, Моделирование взаимодействия клеточных мембран на искусственных фосфолипидных мембранах. Автореф. кандидатской диссертации, ИБФ, Пущино-на-Оке, 1972.