

Н. Н. СУХАРЕВА-НЕМАКОВА, Р. Н. ЗЕЛЕНЕВА, А. Б. СИЛАЕВ

НАПРАВЛЕННЫЙ БИОСИНТЕЗ ЛИПИДОВ В КЛЕТКАХ ПРОСТЕЙШЕГО, ИХ СОСТАВ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА

(Представлено академиком Н. М. Эмануэлем 7 V 1971)

Обнаружение противоопухолевого действия липидов, выделенных из клеток жгутикового простейшего *Crithidia (Strigomonas) oncopelti* ⁽¹⁾, выдвинуло задачу изучения закономерностей накопления, фракционного и жирнокислотного состава этих соединений при различных условиях культивирования.

Поддержание штамма *C. oncopelti* осуществляли на пептонной среде описанного ранее состава ⁽²⁾. Посевным материалом служила 6—7 суточная культура *C. oncopelti*, выращенная на той же среде. Посевная доза составляла 18—20 млн клеток в 1 мл среды. Для получения массовых культур этих жгутиконосцев использовали синтетическую среду Ньютона ⁽³⁾, так как применение химически определенных сред является единственно правильным методом для направленного биосинтеза липидов. При засеве синтетической среды посевной материал дважды отмывали охлажденным физиологическим раствором. Выращивание культуры *C. oncopelti* осуществляли в ферментаторах из нержавеющей стали емкостью 45 л, содержащих 30 л среды. Режим аэрации составлял 0,5—4,0 л стерильного воздуха, продуваемого через 1 л среды в 1 мин. (0,5:1; 1:1). Количество воздуха учитывали с помощью реометра РС-80; мешалка не применялась. Температура культивирования 24—26°. Длительность культивирования 300—400 час. Число клеток в культуре определяли путем подсчета в камере Горяева; pH — потенциометрически. Общее содержание липидов определяли в виде суммы жирных кислот, полученных после гидролиза с 6*N* HCl ⁽⁴⁾. Выделение общей липидной фракции проводили по методу Фолча ⁽⁵⁾.

Изучение фракционного состава общей липидной фракции из *C. oncopelti* проводили методом тонкослойной хроматографии ⁽⁶⁾. В качестве сорбента использовали силикагель — гипс; в качестве растворителя — гексан: диэтиловый эфир: уксусную кислоту (85:15:1). Время, необходимое для разделения общей липидной фракции на классы, составляло 45 мин. Хроматограммы проявляли 40% H₂SO₄ с последующим нагреванием при температуре 200°. На хроматограмму наносили липиды в количестве 50—100 мкг. Для идентификации обнаруженных классов использовали свидетели: лецитин (Laboratory Chemical Division, England), диглицерид (Chemical company Grade, USA), холестерин (Laboratorium Reagenzen, Austro-waren), стигмастерин (GMBH and CO, München, Germany), олеиновую, пальмитиновую и стеариновую кислоты (Уфимский химический завод, СССР). Количественное определение классов липидов проводили колориметрическим методом ^(7, 8). Идентификацию и количественное определение жирных кислот общей липидной ⁽⁶⁾, фосфолипидой ⁽⁹⁾ и нейтральной фракций липидов проводили методом газо-жидкостной хроматографии на хроматографе «Цвет», модель 4—67 (размеры колонки 2 × 0,3 см; газ-носитель — аргон, температура колонки 190°, скорость ленты 400 мм/час). Метилловые эфиры жирных кислот получали при 2-часовом метанолизе с добавлением ацетилхлорида при 80°. Содержание каждой жирной кислоты выражали в процентах от общего количества жирных кислот. Содержание липидов в клетках *C. oncopelti*, выращенных на среде Ньютона (контроль

в наших опытах), невелико и составляет 10—14 % сухого веса клетки. Максимальное накопление клеток 50—80 млн в 1 мл культуры.

Для подбора оптимальных условий направленного биосинтеза липидов было изучено содержание липидов в зависимости от концентрации источника углерода, азота, присутствия органических кислот как предшественников

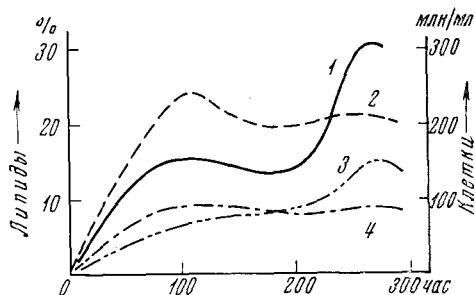


Рис. 1. Закономерности накопления клеток и липидов в культуре *S. oncorhynchi*. 1 — липиды (опыт), 2 — клетки (опыт), 3 — липиды (контроль), 4 — клетки (контроль)

липидов в клетках *S. oncorhynchi* до 17—20 %. Добавление глюкозы в процессе культивирования необходимо сочетать с выравниванием pH в пределах значений 6,5—7,0.

Далее на фоне среды Ньютона с измененным содержанием источников углерода и азота последовательно было изучено влияние на накопление липидов натриевых солей уксусной, малоновой, лимонной, пропионовой и масляной кислот, а также комбинации малоната и ацетата натрия в концентрациях от 0,5 г/л до 3,0 г/л. Наибольший эффект стимуляции биосинтеза липидов (30 % сухого веса клеток) был получен при добавлении цитрата или малоната в концентрациях 2,5 г и 0,5 г на 1 л среды соответственно; накопление клеток в этих культурах превосходило уровень контроля на 150—170 % (рис. 1). Внесение в среду ЦМФ или ЦДФ в концентрации 100 мг/л дало возможность получить увеличение липидов в 2 раза по сравнению с контролем (до 32 % сухого веса).

Таким образом, на модифицированной среде Ньютона (концентрация глюкозы 2—3 %, общего азота 100—150 мг-%, малоната 0,05 %, ЦМФ 0,01 % при температуре культивирования 25—26° и аэрации 0,5:1,0) были получены клетки с достаточно высоким содержанием липидов (до 38 % сухого веса). На синтетической среде идет повышение содержания липидов с увеличением возраста культуры. Максимум накопления липидов

Таблица 1
Количественный состав классов липидов, выделенных из клеток *S. oncorhynchi*, %

№№ п. п.	Классы липидов	150 час.	250 час.	350 час.	400 час.
1	Фосфолипиды	28,3	30,2	27,6	26,6
2	X ₁ *	Следы	Следы	Следы	Следы
3	Моноглицериды	4,85	Следы	6,8	3,76
4	Стерины	4,85	12,0	8,1	15,1
5	Жирные кислоты	12,9	16,0	12,7	22,6
6	Диглицериды	4,85	Следы	8,1	4,5
7	Триглицериды	35,5	31,9	27,6	18,6
8	X ₂ *	Следы	Следы	Следы	Следы
9	Эфиры стерин	8,8	9,7	10,3	9,0

* X₁ и X₂ — не идентифицированы.

отстает от максимума накопления клеток и наблюдается в период старения культуры (рис. 1).

Изучение фракционного состава липидов из клеток *S. oncopelti* на модифицированной синтетической среде показало наличие девяти классов. Среди них идентифицированы семь классов: фосфолипиды, стерины, свободные жирные кислоты, моно-, ди-, триглицериды, эфиры стерinov. Два пятна не были идентифицированы (рис. 2). Количественное соотношение классов общей липидной фракции представлено в табл. 1. С увеличением возраста культуры происходит снижение содержания триглицеридов и повышение содержания свободных жирных кислот и стерinov. Количество фосфолипидов, эфиров, стерinov, моно- и диглицеридов в клетках в процессе роста культуры практически не меняется.

При изучении жирнокислотного состава общей липидной фракции (табл. 2) было обнаружено, что стеариновая, миристиновая составляют большую часть насыщенных жирных кислот; олеиновая, линоловая, линоленовая, пальмитовая кислоты составляют большую часть ненасыщенных жирных кислот, что подтверждает данные Мейера и Хольца (¹⁰).

По данным этих авторов, соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот на химически определенной среде в условиях пассивной аэрации равно 50 : 50 (%). Создание условий направленного биосинтеза липидов в наших опытах привело к сдвигу этого соотношения в сторону преобладания ненасыщенных жирных кислот в течение всего периода инкубации. Максимальное содержание ненасыщенных жирных кислот к 220 час. составляет 91% (табл. 2).

При увеличении аэрации (1,0:1,0) содержание липидов в клетках уменьшается по абсолютному накоплению, сохраняя общую тенденцию к увеличению ненасыщенных жирных кислот с повышением возраста (табл. 3). Качественный и количественный состав жирных кислот фосфолипидной фракции практически не меняется на разных стадиях развития культуры. Количество ненасыщенных жирных кислот составляет 77,24—78,3% (табл. 3). Следовательно, количественные изменения жирнокислотного состава связаны с суммарной фракцией нейтральных липидов и свободных жирных кислот. В этой фракции обнаруживается снижение содержания насыщенных жирных кислот в два раза (от 21 до 10,2%) и соответствующее увеличение ненасыщенных жирных кислот в процессе культивирования. Общая липидная фракция с повышенным содержанием ненасыщенных жирных кислот, испытанная на противоопухолевую активность по описанной ранее методике (¹), вызывает торможение развития саркомы 180 на 46—56%.

Таким образом, регулирование условий внешней среды (состава среды и физико-химических условий культивирования) дает возможность повысить общее содержание липидов в культуре *S. oncopelti* в два раза. Сдвиг соотношения жирных кислот в составе липидов в сторону увеличения содержания ненасыщенных, по-видимому, является адаптивной реакцией

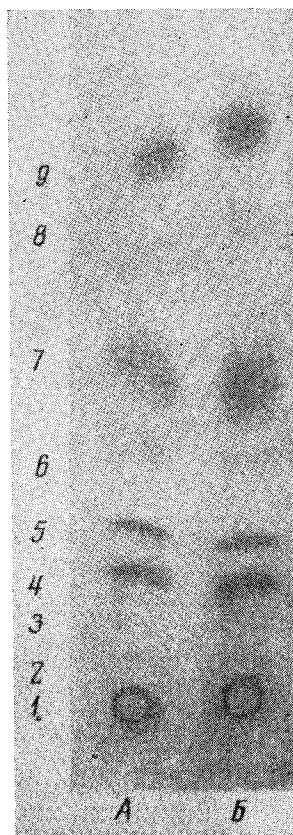


Рис. 2. Фракционный состав липидов из клеток *S. oncopelti*. 1 — фосфолипиды, 2, 8 — не идентифицированы, 3 — моноглицериды, 4 — стерины, 5 — свободные жирные кислоты, 6 — диглицериды, 7 — триглицериды, 9 — эфиры стерinov. А — контроль, Б — опыт

Таблица 2

Состав жирных кислот общей липидной фракции клеток
S. oncosperli, выращенных на синтетической среде
с малонатом при активной аэрации 0,5/1

Жирные кислоты	135 час.	220 час.	354 часа
C ₁₀ :0	Следы	—	
C ₁₁ :0	Следы	—	
C ₁₃ :0	Следы	—	
C ₁₄ :0-изо	2,83	Следы	Следы
C ₁₄ :0	2,93	Следы	Следы
C ₁₆ :0-изо	Следы	Следы	Следы
C ₁₆ :0	14,7	8,87	10,1
C ₁₆ :1	5,95	9,18	10,3
C ₁₇ :0	Следы	Следы	—
C ₁₈ :0	2,83	Следы	Следы
C ₁₈ :0-изо	2,09	—	—
C ₁₈ :1	19,9	33	26,0
C ₁₈ :2	25,4	24,7	25,0
C ₁₈ :3	23,2	24,3	28,8
C ₂₀ :4	Следы	Следы	Следы
Процент насыщенных жирных кислот	23,33	8,87	10,1
Процент ненасыщенных жирных кислот	76,54	91,18	90,1

Таблица 3

Соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот (в процентах)
в липидных фракциях клеток *S. oncosperli* при активной аэрации (1/1)

Продолжит. культиви- рования, час.	Общие липиды		Фосфолипиды		Нейтральные липиды	
	насыщенные жирные кислоты	ненасыщен- ные жирные кислоты	насыщенные жирные кислоты	ненасыщен- ные жирные кислоты	насыщенные жирные кислоты	ненасыщен- ные жирные кислоты
150	21,43	78,0	23,14	77,24	20,92	78,6
250	12,33	87,0	24,18	75,8	16,46	83,36
300	12,3	87,72	21,15	78,3	11,14	79,98
400	15,22	84,66	—	—	10,2	89,75

организма на изменение условий внешней среды. Преобладание в составе липидов жирных кислот с ненасыщенными связями — один из факторов, обуславливающих торможение роста экспериментальных опухолей (¹¹).

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
4 V 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ Н. Н. Сухарева-Немакова, А. Б. Силаев и др., Антибиотики, 15, 2, 140 (1970). ² Н. Н. Сухарева-Немакова, Р. Н. Зеленева и др., Вестн. Московск. ун-в., 3, 3 (1969). ³ В. А. Newton, Nature, 177, 4502, 279 (1956). ⁴ K. Takeya, K. Husatsume, L. Inoue, J. Bacteriol., 85, 27 (1963). ⁵ J. Folch, I. Askoli et al., J. Biol. Chem., 226, 497 (1957). ⁶ Е. К. Алимова, А. Г. Аствацатурьянц, Исследование жирных кислот и липидов методом хроматографии, М., 1967. ⁷ I. S. Amenta, J. Lipid Res., 5, 270 (1964). ⁸ Kunihiro Saito, Kivomi Sato, J. Biochemistry, 59, 6 (1966). ⁹ В. Я. Дворкин, А. А. Шмелев, Биохимия, 33, 3, 471 (1968). ¹⁰ H. Meyer, I. I. Holz, J. Biol. Chem., 261, 21, 500 (1966). ¹¹ Н. М. Эмануэль, Е. П. Богословская и др., Изв. АН СССР, сер. биол., № 5, 752 (1969).