

Г. А. ПОПКОВА, Н. П. ГОРЬКОВА, Н. Г. ТИМОФЕЕВА,
Э. В. ДЯТЛОВИЦКАЯ и член-корреспондент АН СССР Л. Д. БЕРГЕЛЬСОН

О ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ ХОЛЕСТЕРИНЭСТЕРАЗЫ В ОПУХОЛЯХ

В печени эстераза, расщепляющая ацетат холестерина (3.1.1.13), присутствует в микросомальной фракции (¹⁻³) и надосадочной жидкости, полученной при 105 000 g (³), но не обнаруживается в митохондриях (^{1, 2}). Холестеринэстеразы микросом и надосадочной жидкости отличаются по субстратной специфичности: холестеринэстераза микросом имеет большое сродство к ацетату холестерина (¹⁻³), в то время как холестеринэстераза, обнаруживаемая в надосадочной жидкости, с большей скоростью расщепляет эфиры холестерина и высших жирных кислот (^{3, 4}). Последний тип холестеринэстеразы присутствует также и в митохондриях (³).

Холестеринэстераза ацетата холестерина может служить «маркерным» ферментом для определения чистоты митохондрий, выделенных из нормальной печени. В связи с проводимыми нами исследованиями внутриклеточного распределения липидов в опухолях (^{5, 6}) представляло интерес изучить активность и локализацию этого фермента в опухолевых клетках и выяснить возможность его использования в качестве «маркерного» фермента для контроля чистоты опухолевых митохондрий.

В настоящей работе изучена активность холестеринэстеразы ацетата холестерина в клетках гепатомы-27 и саркомы Иенсена, а также в выделенных из них митохондриях и микросомах.

Для исследования использовали ткани нормальной печени, гепатомы-27 (20 день после перевивки опухоли) и саркомы Иенсена (14 день после перевивки) крыс. В каждый опыт брали 20—30 животных; после декапитации животных ткани немедленно подвергали дальнейшей обработке.

Митохондрии и микросомы выделяли, как указано в (⁷). Белок определяли по методу Лоури (⁸). Озвучивание субстрата проводили с помощью ультразвукового диспергатора УЗДН-1 при частоте 22 кГц и температуре 10—12°.

Для определения холестеринэстеразной активности в две пробирки (1 и 2) помещают по 0,1 мл суспензии ткани или субклеточных фракций (200—600 мкг белка) в трис-малеатном буфере (рН 6,6). В пробирку 1 приливают 0,1 мл субстрата (25 мг ацетата холестерина растворяют в 1 мл CCl_4 , добавляют 9 мл трис-малеатного буфера и озвучивают в течение 10 мин.) и 0,2 мл трис-малеатного буфера; в пробирку 2 наливают 0,3 мл трис-малеатного буфера; в пробирку 3 помещают 0,1 мл субстрата и 0,3 мл буфера; в пробирку 4 — 0,4 мл буфера. Содержимое пробирок 1 и 3 озвучивают в течение 2 мин., после чего все пробирки помещают в термостат и инкубируют 3 часа при 37°. По окончании инкубации в каждую пробирку приливают 1 мл CCl_4 и смесь энергично встряхивают 5 мин. Полученный экстракт (нижний слой) отделяют и используют для определения холестерина.

К 0,5 мл раствора в CCl_4 (из каждой пробирки) добавляют 0,1 мл реактива Килиани (⁹) (2,6 г хромового ангидрида растворяют в 2,3 мл концентрированной серной кислоты и 4 мл воды, после чего объем доводят водой до 10 мл) и смесь энергично встряхивают в течение 5 мин. Верх-

ный слой отделяют, к нижнему добавляют 0,2 мл 0,1% раствора 2,4-динитрофенилгидразина в смеси метанол—вода—соляная кислота (25:24:1) и содержимое встряхивают в течение 15 мин. Вновь образовавшийся верхний слой отделяют, к нижнему добавляют 2,5 мл смеси пиридин—вода (8:2), 0,1 мл 33% раствора КОН в метаноле и немедленно (во избежание помутнения раствора) измеряют оптическую плотность при 436 мμ по отношению к контрольной пробе (пробирка 4).

Холестеринэстеразная активность вычисляется по формуле

$$A = \frac{2(a_1 - a_2 - a_3)}{3b} 1000,$$

где A — активность фермента в μг холестерина на 1 мг белка в 1 час; a_1 — содержание холестерина в опытной пробе, a_2 — содержание холестерина в суспензии, a_3 — содержание холестерина в субстрате, b — количество белка, μг.

Изучение холестеринэстеразной активности возможно лишь при наличии быстрого, удобного и высокочувствительного метода определения свободного холестерина. Большинство известных методов определения холестерина (см. обзор ⁽¹⁰⁾) обладает небольшой чувствительностью. Появившийся недавно микрометод ⁽¹¹⁾, являющийся видоизменением метода Златкиса ⁽¹²⁾, более чувствителен, но очень трудоемок.

Известно, что холестерин окисляется соединениями шестивалентного хрома, образуя в качестве основного продукта реакции холестен-4-дион-3,6 ⁽¹³⁾. Применяв реагент Килиани ⁽⁹⁾, Нишина и Кимура ^(14, 15) предложили использовать эту реакцию для микроопределения свободного холестерина. В настоящей работе использована модификация этого метода. Холестерин окисляли реагентом Килиани и количество образующегося продукта реакции определяли спектрофотометрически в виде 2,4-динитрофенилгидразона. Сам 2,4-динитрофенилгидразон холестен-4-диона-3,6 имеет $\lambda_{\max}$ при 385 мμ и его молекулярная экстинкция весьма невелика (ϵ 12 900) ⁽¹³⁾, однако в щелочной среде максимум поглощения сдвигается в длинноволновую область спектра и экстинкция увеличивается ⁽¹⁴⁾. Японские авторы ^(14, 15) проводили окисление в ацетоне. Однако последний реагирует при дальнейшей обработке с 2,4-динитрофенилгидразином, что мешает определению холестерина. Поэтому мы осуществили окисление в четыреххлористом углероде. Для подщелачивания среды использовали смесь пиридин—вода (8:2) и 33% раствор КОН в метаноле. Поскольку образующийся гомогенный раствор четыреххлористый углерод—пиридин—вода—метанол при стоянии быстро мутнеет и расслаивается, спектрофотометрирование следует проводить немедленно после сливания растворов.

Как видно из рис. 1, чувствительность метода очень высока (оптическая плотность для 1 μг холестерина составляет 0,02) и позволяет определить присутствие менее 0,01 μмол (3 μг) холестерина. Это дает возможность снизить количество исходного материала до 200—600 μг белка. В то же время предлагаемый метод удобен тем, что ацетат холестерина, присутствующий всегда в смеси, не окисляется реактивом Килиани и не

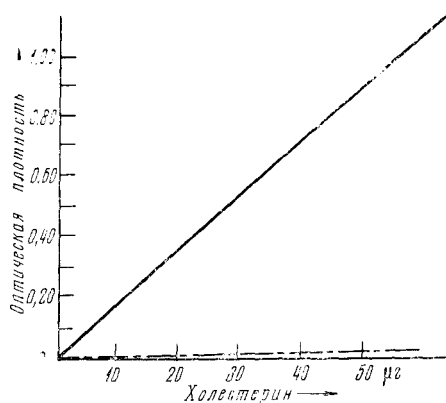


Рис. 1. Калибровочная кривая, полученная для холестерина при 436 мμ. Сплошная линия — свободный холестерин; пунктирная — ацетат холестерина

обнаруживается спектрофотометрически (рис. 1). В присутствии других липидов (фосфолипиды, глицериды) метод дает завышение значения содержания холестерина. Однако это не становится помехой при определении холестеринэстеразной активности, так как параллельно определяют свободный холестерин в таком же количестве суспензии ткани или субклеточной фракции (без добавления к ней ацетата холестерина). При вычислении активности найденная величина оптической плотности свободного холестерина вычитается из величины оптической плотности, полученной после расщепления субстрата.

Т а б л и ц а 1

Активность холестеринэстеразы в митохондриях
и микросомах печени и опухолей крыс
($\mu\text{г}$ холестерина на 1 мг белка в 1 час) *

Ткани	Гомогенат	Митохондрии	Микросомы
Печень	27	0	33,8
Гепатома	18,3	0	25,3
Саркома			
Иенсена	17,6	0	25,8

* Приведены средние значения из 5—7 опытов; отклонения не превышают ± 4 (для гомогената и микросом).

Из табл. 1 видно, что активность холестеринэстеразы в опухолях несколько ниже, чем в нормальной печени. Митохондрии, выделенные из опухолей, не обладали холестеринэстеразной активностью, тогда как активность микросомальной фракции была выше активности гомогената. Отсюда следует, что в исследованных опухолях эстераза, расщепляющая ацетат холестерина, локализована преимущественно во фракции эндоплазматического ретикулума.

Для определения микросомальных примесей в препаратах митохондрий, выделяемых из печени и других нормальных тканей, обычно используют активность глюкозо-6-фосфатазы или цитохрома P-450 (¹⁶). Однако в ряде опухолей (в том числе в перевиваемых (⁶, ¹⁷) и индуцированной диметиламиноазобензолом (¹⁷) гепатомах и в саркоме Иенсена (⁶)) активность глюкозо-6-фосфатазы резко снижена, а цитохром P-450 не обнаруживается ни в целых клетках, ни в микросомах (¹⁸). Результаты настоящей работы показывают, что для контроля чистоты митохондрий указанных опухолей в качестве «маркерного» фермента может быть использована холестеринэстераза, специфичная к ацетату холестерина.

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

Поступило
10 V 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. C. Schotz, L. I. Rice, R. B. Alfin-Slater, J. Biol. Chem., **207**, 665 (1954).
- ² S. Krischnamurthy, P. Seshadry Sastry, J. Ganguly, Arch. Biochem. and Biophys., **75**, 6 (1958). ³ D. Deykin, D. S. Goodman, J. Biol. Chem., **237**, 3649 (1962). ⁴ D. S. Sgoutas, Biochim. et biophys. acta, **164**, 317 (1968). ⁵ Э. В. Дятловицкая, Т. И. Торховская, Л. Д. Бергельсон, ДАН, **186**, 948 (1969).
- ⁶ L. D. Bergelson, E. V. Dyatlovitskaya et al., Biochim. et biophys. acta, **210**, 282 (1970). ⁷ Э. В. Дятловицкая, В. М. Трусова и др., Биохимия, **37**, 607 (1972). ⁸ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
- ⁹ H. Kiliani, B. Merk, Ber., **34**, 3562 (1901). ¹⁰ D. B. Tonks, Clin. Biochem., **1**, 12 (1967). ¹¹ A. R. Clark, R. T. Rubin, R. J. Arthur, Anal. Biochem., **24**, 27 (1968). ¹² A. Zlatkis, B. Zack, A. Boyle, J. Lab. Clin. Med., **41**, 486 (1953).
- ¹³ L. F. Fieser, J. Am. Chem. Soc., **75**, 4377 (1953). ¹⁴ T. Nishina, M. Kimura, Jakugaku Zasshi, **84**, 390 (1964). ¹⁵ T. Nishina, I. Hariya, M. Kimura, Bunseki Kagaku, **14**, 125 (1965). Цит. по Chem. Abstr., **63**, 2108 (1965). ¹⁶ T. Omura, R. Sato, J. Biol. Chem., **239**, 2370 (1964). ¹⁷ G. Weber, A. Cantero, Cancer Res., **15**, 105 (1955). ¹⁸ N. Sato, B. Hagihara, Cancer Res., **30**, 2061 (1970).