

И. К. КОЛОМИЙЦЕВА, Ю. С. КАЗНАЧЕЕВ, член-корреспондент АН СССР А. М. КУЗИН

РАДИАЦИОННЫЕ СДВИГИ МЕТАБОЛИЗМА ЛИПИДОВ В ОРГАНЕЛЛАХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС

Одним из важных разделов проблемы воздействия ионизирующей радиации на биологические структуры является вопрос о радиационном поражении липидов субклеточных органелл. Имеется много работ о влиянии ионизирующей радиации на количество и обмен липидов в органах и тканях животных (¹, ²). Исследование радиационных сдвигов в составе и обмене липидов субклеточных органелл показало, что имеется ряд особенностей, обусловленных характером структурной организации клетки. В частности, биосинтез фосфолипидов (по критерию включения P^{32} -фосфата) происходит в микросомальной фракции (³), а затем, путем обмена, меченые молекулы фосфолипидов появляются в других органеллах клетки. Обмен мечеными молекулами фосфолипидов между микросомами и митохондриями наблюдали *in vitro* (⁵). Полагают, что *in vivo* обмен происходит аналогичным путем (⁴, ⁶). Мы поставили своей задачей исследование интенсивности биосинтеза и скорости переноса фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилэтаноламина (ФЭТ) между субструктурами клеток печени крыс в норме и через 1 час после облучения животных в дозе 1200 р.

Крысам-самцам линии «Вистар» за 5 мин. до облучения вводили по 200 μ C $K_2H^{32}O_4$ с удельной активностью 2,5 мС/ммоль. Субклеточные фракции — ядерную, митохондриальную, микросомальную и надосадочную жидкость после осаждения микросом при 105 000 *g* получали по стандартной методике (⁷) с незначительными модификациями (⁸). Липиды экстрагировали хлороформ-метанолом (2 : 1, по объему) и очищали по Фольчу (⁹). Общую фракцию липидов разделяли при помощи тонкослойной хроматографии на силикагеле в системе хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 4, по объему). Холестерин определяли по методике Либермана — Бурхарда (⁹), фосфор — по Герлаху и Дойтике (¹⁰), белок — по Лоури (¹¹). Радиоактивность определяли на газопоточном счетчике «Протока». Облучение проводили γ -лучами Co^{60} , мощность дозы 500 р/мин.

В табл. 1 приведены результаты исследования величин общей и удельной активностей фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина по критерию включения P^{32} -ортофосфата. Величина общей активности по P^{32} характеризует скорость биосинтеза фосфолипидов и представляет собой произведение удельной активности на количество фосфолипида, приходящегося на 1 мг белка каждой субклеточной фракции.

Как видно из табл. 1, общая активность фосфолипидов повышена. Этот факт свидетельствует об активации скорости биосинтеза уже через 1 час после облучения в дозе 1200 р; из сопоставления величин удельных активностей видно, что наибольшие изменения произошли в биосинтезе фосфатидилэтаноламина, так что при облучении величина удельной активности фосфатидилэтаноламина более чем в 2 раза превышает контрольные величины и в микросомах, и в митохондриях. Интересно отметить, что при воздействии на крыс других повреждающих факторов, например введения четыреххлористого углерода, в печени наиболее чувствительной является система биосинтеза фосфатидилэтаноламина: удельная активность ФЭТ в микросомальной фракции клетки возрастает в 2—3 раза по сравнению с контролем (⁴). По-видимому, увеличение скорости биосинтеза

ФЭТ представляет собой одно из звеньев цепи компенсаторных реакций клетки на повреждение.

Сопоставляя процент увеличения удельной активности в различных фракциях, можно видеть, что максимальное увеличение скорости включения для фосфатидилхолина происходит в надосадочной жидкости, меньшее — в ядерной, наименьшее — в митохондриальной и микросомальной фракциях. Также неравномерно активируется и синтез фосфатидилэтаноламина. Если учесть, что синтез фосфолипидов происходит в микросо-

Таблица 1

Величины общей и удельной активностей фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в субфракциях клеток печени крыс через 1 час после облучения в дозе 1200 р и введении 200мС К₂НР³²О₄

Образец	Фосфатидилхолин			Фосфатидилэтаноламин		
	контроль	опыт	%	контроль	опыт	%
Гомогенат	8370	13600	162	4000	5480	137
	<u>212</u>	<u>368</u>	<u>173</u>	<u>168</u>	<u>278</u>	<u>164</u>
Ядра	9560	12600	132	6700	10700	160
	<u>196</u>	<u>329</u>	<u>168</u>	<u>182</u>	<u>261</u>	<u>144</u>
Митохондрии	17600	23600	132	7950	16800	211
	<u>232</u>	<u>344</u>	<u>148</u>	<u>118</u>	<u>293</u>	<u>229</u>
Микросомы	53600	63400	121	15110	29150	192
	<u>289</u>	<u>430</u>	<u>148</u>	<u>217</u>	<u>484</u>	<u>223</u>
Надосадочная жидкость	5060	9140	182	2300	3460	157
	<u>187</u>	<u>359</u>	<u>192</u>	<u>147</u>	<u>301</u>	<u>205</u>

Примечание. Числа над чертой — общая активность, под чертой — удельная активность. Общая активность выражена в имп/мин на 1 мкг липида умноженных на число микрограммов липида, приходящегося на 1 мг белка каждой фракции; удельная активность — имп/мин на 1 мкг липидного Р.

мальной фракции и затем с помощью обменного механизма меченые молекулы фосфолипидов попадают во все остальные субструктуры клетки, то можно было ожидать, что процент возрастания метки в фосфолипидах всех органелл будет одинаков и равен проценту возрастания скорости биосинтеза в микросомальной фракции. Как видно из табл. 1, в действительности наблюдаются резкие различия, которые, как нам представляется, могут быть объяснены изменением обменного пула каждой фракции, т. е. изменением количества липидов субфракции, вовлекаемых в обмен. Можно полагать, что величина обменного пула, т. е. количество молекул данного липида в органелле, вовлекаемых в обмен, будет зависеть от характера связей липида в структуре органеллы. Мы полагаем, что обменный пул представляет собой характеристику способности липидов данной органеллы к образованию единой липидной фазы с липидами микросом. Мы вычислили объем обмена каждой субклеточной фракции по отношению к микросомальной для данного фосфолипида. В табл. 2 приведены величины отношений удельной активности фосфолипидов в ядерной и митохондриальной фракциях и в надосадочной жидкости к удельной активности в микросомах. Величины отношений характеризуют обменный пул каждой фракции.

При сравнении обменных пулов фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина можно видеть, что в ядрах объем обмена фосфатидилэтаноламина намного больше обменного пула фосфатидилхолина; в митохондриях, наоборот, обменный пул фосфатидилхолина больше, чем обменный пул фосфатидилэтаноламина, и в надосадочной жидкости они практически не

различаются. После облучения обменный пул ФХ в ядрах и в надосадочной жидкости возрастает, в митохондриях практически не меняется; обменный пул ФЭТ в ядрах уменьшается, в митохондриях не меняется, в надосадочной жидкости обнаруживает тенденцию к уменьшению. Эти изменения обменного пула, особенно четко выраженные в ядрах, свидетельствуют о глубоких нарушениях обмена фосфолипидными молекулами между ядерными и цитоплазматическими структурами, об изменениях характера свя-

Таблица 2

Объем обмена между микросомами и субфракциями клеток печени крыс в норме и через час после облучения в дозе 1200 р

Фракция	Фосфатидилхолин		Фосфатидилэтанол-амин	
	контроль	опыт	контроль	опыт
Ядра	68	77	84	54
Митохондрии	81	78	55	60
Надосадочная жидкость	65	83	88	62

Примечание. Приведены величины отношения удельных активностей фосфолипида в субфракциях к удельной активности фосфолипида в микросомах (в процентах).

зей липидов в ядерных мембранах и, по-видимому, об изменениях функциональной активности клеточных органелл.

Существенной характеристикой метаболизма липидов субклеточных структур является скорость переноса липидов между структурами. По данным работы (¹²), за 1 час инкубации при 0° из микросомальной фракции в митохондриальную переносится 2–3% удельной активности ФХ и ФЭТ. При 37° скорость переноса возрастает, и в течение 10–15 мин. наступает состояние изотопного равновесия *in vivo* и *in vitro* (⁵, ¹³). Под скоростью переноса мы понимаем долю активности, перенесенную из меченой микро-

Таблица 3

Скорость переноса фосфолипидов между ядерной и меченой микросомальной или митохондриальной и меченой микросомальной фракциями клеток печени крыс *in vitro* в норме и через 1 час после облучения крыс в дозе 1200 р

	Ядра — микросомы			Митохондрии — микросомы		
	контроль	опыт	%	контроль	опыт	%
Фосфатидилхолин	2,26	1,63	72	3,92	2,87	73
Фосфатидилэтанол-амин	2,20	1,50	68	2,24	1,48	66

сомальной фракции в немеченую субфракцию в единицу времени в течение первых минут инкубации, когда система находится далеко от положения равновесия и количество перенесенной активности пропорционально времени инкубации. Меченую микросомальную фракцию в присутствии меченой надосадочной жидкости инкубировали 3 мин. при 37° с немечеными ядрами или митохондриями; затем инкубационную смесь быстро охлаждали в ледяной бане и субклеточные фракции вновь разделяли и трижды промывали ледяной 0,25 М сахарозой, содержащей 1 мМ ЭДТА. В специальных экспериментах было показано, что в этих условиях загрязнение

митохондриальных липидов микросомальными составляло ~2% в соответствии с литературными данными (¹⁴).

В табл. 3 представлены результаты исследований, проведенных в следующих условиях: в системе ядра — микросомы 51 мг белка меченой надосадочной жидкости, 13,4 мг белка меченых микросом и 4,4 мг белка ядер; в системе митохондрии — микросомы 51 мг белка меченой надосадочной жидкости, 13,4 мг белка меченых микросом и 43 мг белка митохондрий. В облученных пробах взяты аналогичные количества. Инкубацию проводили при 37° в течение 3 мин.

Как видно из табл. 3, после облучения скорость переноса для фосфатидилхолина ядер и митохондрий падает до 72–73%, скорость переноса для фосфатидилэтаноламина уменьшается до 66–68%.

Механизм переноса меченых липидов из одной фракции в другую мало изучен. Известно, что в присутствии белков надосадочной жидкости скорость обмена значительно возрастает. Этот белок не связан с липопротеином, так как удаление 97% фосфолипидов из надосадочной жидкости осаждением при pH 5,1 или удаление 85% фосфолипидов фосфолипазой C не приводит к уменьшению способности надосадочной жидкости активировать обмен фосфолипидами. Показано, что активный фактор надосадочной жидкости осаждается $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, температурочувствителен и разлагается трипсином (⁵).

Из данных табл. 3 следует, что скорость переноса фосфатидилхолина в системе микросомы — митохондрии является наибольшей. ФЭТ в обеих системах и ФХ в системе микросомы — ядра переносятся с близкой величиной скорости. Следовательно, можно думать о наличии в надосадочной жидкости факторов, различных по своему влиянию на скорость переноса индивидуальных липидов между разными органеллами. О неодинаковом влиянии надосадочной жидкости на скорость переноса ФХ и ФЭТ, а также различных молекулярных типов ФХ в системе микросомы — митохондрии сообщали Виртц и соавторы (^{6, 15}).

После облучения скорости переноса фосфолипидов уменьшаются; уменьшение скорости переноса не коррелирует с изменениями обменного пула *in vivo*. Следовательно, можно думать, что изменение скорости переноса при облучении определяется уменьшением активности факторов переноса, находящихся в надосадочной жидкости.

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пуцдино-на-Оке

Поступило
23 VIII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. Ф. Виноградова, Обмен общих липидов, холестерина и липопротеинов в органах облученных животных. Кандидатская диссертация, ЛГУ, 1967. ² А. В. Васильев, Влияние ионизирующей радиации на обмен липидов у крыс, Кандидатская диссертация, М., 1970. ³ G. F. Wilgram, E. P. Kennedy, J. Biol. Chem., **238**, 2615 (1963). ⁴ K. W. A. Wirtz, D. B. Zilversmit, Biochim. et biophys. acta, **187**, 468 (1969). ⁵ K. W. A. Wirtz, D. B. Zilversmit, *ibid.*, **193**, 105 (1969). ⁶ K. W. A. Wirtz, L. M. G. Van Golde, L. L. M. Van Deenen, *ibid.* **218**, 176 (1970). ⁷ А. А. Покровский, А. И. Арчаков, В сборн. Современные методы в биохимии, **2**, М., 1968, стр. 5. ⁸ J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane-Stanley, J. Biol. Chem., **226**, 497 (1957). ⁹ В. Е. Предтеченский, В. М. Боровская, Л. Т. Марголина, Лабораторные методы исследования, М., 1950, стр. 212. ¹⁰ J. Gerlach, B. Deuticke, Biochem. Zs., **337**, 477 (1963). ¹¹ O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough et al., J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951). ¹² Э. В. Дятловская, В. М. Трусова и др., Биохимия, **37**, 3, 607 (1972). ¹³ O. Stein, J. Stein, J. Cell. Biol., **40**, 461 (1969). ¹⁴ K. W. A. Wirtz, D. B. Zilversmit, J. Biol. Chem., **243**, 3596 (1968). ¹⁵ K. W. A. Wirtz, D. B. Zilversmit, FEBS Letters, **7**, 44 (1970).