

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, меченные молекулы фосфолипидов появляются в других органеллах клетки. Обмен меченными 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 $K_2HPO_4^{32}$ с удельной активностью 2,5 мC/ммоль. Субклеточные фракции — ядерную, митохондриальную, микросомальную и надосадочную жидкость после осаждения микросом при 105 000 g получали по стандартной методике (7) с незначительными модификациями (4). Липиды экстрагировали хлороформ-метанолом (2 : 1, по объему) и очищали по Фольчу (8). 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 газопроточном счетчике «Проток». 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 $200\mu\text{C}$ $\text{K}_2\text{HPO}_4^{32}\text{O}_2$

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

П р и м е ч а н и е. Числа над чертой — общая активность, под чертой — удельная активность. Общая активность выражена в имп/мин на 1 мг липида умноженных на число микрограммов липида, приходящегося на 1 мг белка каждой фракции; удельная активность — имп/мин на 1 мг липидного Р.

мальной фракции и затем с помощью обменного механизма меченные 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		Фосфатидилэтаноламин	
	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 мик-

Таблица 3

Скорость переноса фосфолипидов между ядерной и меченой микросомальной или митохондриальной и мечелой 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
Фосфатидилэтаноламин	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 M сахарозой, содержащей 1 мМ ЭДТА. В специальных экспериментах было показано, что в этих условиях загрязнение

митохондриальных липидов микросомальными составляло $\sim 2\%$ в соответствии с литературными данными (¹⁴).

В табл. 3 представлены результаты исследований, проведенных в следующих условиях: в системе ядра — микросомы 51 мг белка меченою надосадочной жидкости, 13,4 мг белка меченою микросом и 4,4 мг белка ядер; в системе митохондрии — микросомы 51 мг белка меченою надосадочной жидкости, 13,4 мг белка меченою 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 меченоых 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 С 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
Цуцино-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. Арраков, 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. Denticke, Biochem. Zs., **337**, 477 (1963). ¹¹ O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough et al., J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951). ¹² Э. В. Дятловинская, 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).