

Биолог. журн. Армении, 1-2 (57), 2005

УДК 612.015.1:538.3

РЕАЦИЛИРОВАНИЕ МЕМБРАННЫХ ФОСФАТИДИЛХОЛИНОВ ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ ВНЕШНЕГО ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ

Г.Г. АРЦУНИ*, Т.Б. БАТИКЯН**, Ю.В. ТАДЕВОСЯН**

*НИЦ ЕрГМУ им. Гераци, 375025, Ереван

**Институт молекулярной биологии НАН РА, 375014, Ереван

Исследовали активность глицерилфосфорилхолин- и лизофосфатидилхолин-ацилтрансфераз в мембранах эритроцитов и митохондрий гепатоцитов крыс в норме и *in vivo* после 1-часового воздействия электростатических полей (ЭСП) напряженностью 200 кВ/м. Обнаружена активация этих ферментов в условиях воздействия ЭСП, а также зависимость этого процесса от типа исследуемых мембран и используемых экзогенных меченых субстратов.

Գլիցերիլֆոսֆորիլքոլին- և լիզոֆոսֆատիդիլքոլին ացիլտրանսֆերազների ակտիվության ուսումնասիրությունը առնետների էրիթրոցիտների և հեպատոցիտների միտոքոնդրիումների թաղանթներում նորմայում և *in vivo* մեկ ժամյա 200 կՎ/մ լարվածության էլեկտրաստատիկ դաշտերի (ԷՍԴ) ազդեցության ներքո: Հայտնաբերվել է նշված ֆերմենտների ակտիվացումը ԷՍԴ-ի ազդեցության պայմաններում, ինչպես նաև այդ պրոցեսի կախվածությունը հետազոտվող թաղանթների տեսակետից և օգտագործվող էկզոգեն նշավորված հիմնանյութերից:

The activities of glycerolphosphorylcholine- and lysophosphatidylcholine-acyltransferase of the membranes of rat erythrocytes and liver mitochondria were investigated in norm and after 1-hour *in vivo* influence of 200 kV/m electrostatic field (ESF). The activation of these enzymes under the influence of ESF, as well as the dependence of this process from the type of under investigation membranes and exogenous labelled substrates was observed.

Электростатическое поле - биомембраны - реацилирование - ацилтрансферазы

Ранее нами было показано [2-4], что воздействие внешних электростатических полей (ЭСП) приводит к модификациям липидного компонента эритроцитарных (ЭМ) и митохондриальных мембран (ММ), существенно влияя на их функциональное состояние. Липидная сбалансированность липопротеинового бислоя и его структурно-функциональное состояние обусловлены работой целого ряда мембраносвязанных липид-модифицирующих ферментных систем.

В работах [5-7] нами показано, что одночасовое воздействие внешних ЭСП напряженностью 200кВ/м приводит к изменениям активности ферментных систем деацилирования фосфолипидов (ФЛ) ЭМ и ММ крыс. Однако деацилирование ФЛ является лишь частью мембраносвязанной системы деацилирования-реацилирования ФЛ, обеспечивающей сбалансированность липидного компонента липопротеинового бислоя.

Целью данной работы являлось исследование активности ферментов системы реацилирования ФЛ ЭМ и ММ после действия ЭСП вышеуказанных параметров.

Материал и методика. Эксперименты проводили на двух группах белых беспородных крыс массой 120-150 г: первая группа – контрольная, вторая – крысы, подвергнутые однократному воздействию внешних ЭСП напряженностью 200 кВ/м при помощи установки конденсаторного типа [1]. Как в опытной, так и в контрольной группах исследовалось по 10 крыс.

Эритроциты, выделенные в 0,01М NaHCO_3 буфере (pH 7,4), подвергали гипотоническому шоку, а затем центрифугировали при 10 000 g в течение 30 мин для получения в осадке ЭМ.

Изолированные митохондрии получали методом, предложенным Масоловой с сотр. [8]. ММ приготавливали 10-кратным замораживанием/оттаиванием выделенных митохондрий с последующим центрифугированием при 10 000 g в течение 30 мин.

Белок определяли методом Лоури [14] с использованием реактивов Protein Assay Kit фирмы Sigma (США).

Активность ацилтрансферазы (АТ) в ЭМ и ММ определяли в трис-НСl буфере (pH 7,4), содержащем в качестве экзогенного субстрата по 0,5 мкКю КоА эфиры [1- ^{14}C]-олеиновой (ОК) и [1- ^{14}C]-пальмитиновой (ПК) кислот, 20 нмоль лизофосфатидилхолина (лизоФХ), как акцептора свободной жирной кислоты (ЖК), 1 мкМ MgCl_2 и суспензию мембран, соответствующую 200мкг белка.

После 30 мин инкубации в качающейся водяной бане при 37° реакцию останавливали приливанием 2 мл холодной смеси хлороформ-метанола (1:2). Экстракцию липидов осуществляли методом Блай и Дайера [11].

Липидные фракции разделяли методом двухэтапной одномерной ТСХ в следующих системах растворителей: хлороформ-метанол-уксусная кислота-вода (25:15:4:2, об/об) и петролейный эфир-диэтиловый эфир-муравьиная кислота (30:20:1, об/об) для разделения ФЛ и нейтральных липидов (НЛ) соответственно.

Радиоактивность проявленных в парах иода и идентифицированных хроматографически чистыми стандартами фирмы (Sigma, США) липидных фракций определяли в сцинтилляционной жидкости Брея на сцинтилляционном спектрометре Roche-Bioelectronique, модель SL-4221 (Франция). Статистическую обработку полученных данных проводили по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Ранее в экспериментах с использованием в качестве экзогенного субстрата 1-ацил-2-[1- ^{14}C]олеил-ФХ нами было показано [5], что 1-часовое воздействие внешних ЭСП выше отмеченных параметров приводит к накоплению [^{14}C]-лизоФХ и свободной [^{14}C]-ОК по сравнению с контролем, что свидетельствует о повышении активности фосфолипаз A_1 и A_2 соответственно.

Кроме того, нами обнаружено многократное повышение лизофосфолипазной активности, являющееся компенсаторной реакцией утилизации избыточного лизоФХ, обладающего, как известно, цитолитическими и мембрану дестабилизирующими свойствами [16].

Противоположно направленным процессом утилизации лизоФХ является реакция его реацилирования. Причем, в зависимости от степени насыщенности жирная кислота может эстерифицироваться в положении С-1 или С-2 молекулы глицерилфосфорилхолина (ГФХ). В реакции, катализируемой ГФХ-ацилтрансферазой (ГФХ-АТ), образуется лизоФХ, эстерификация которого по оставшемуся гидроксилу в реакции, катализируемой лизоФХ-ацилтрансферазой, приводит к образованию диацильной формы ФХ.

Исходя из вышеизложенного, нами были проведены исследования эффектов 1-часового *in vivo* воздействия ЭСП на активность ГФХ- и лизоФХ-АТаз ЭМ и ММ с использованием КоА-эфиров насыщенной (ПК) и мононенасыщенной (ОК) жирных кислот, эстерифицируемых в С-1 и С-2 положениях глицеринового остова ФЛ соответственно.

При инкубации суспензии ЭМ с $[1-^{14}\text{C}]$ -олеоил-КоА обнаружено (рис.) незначительное (15%) повышение активности ГФХ-АТазы и понижение активности лизоФХ-АТазы ЭМ крыс, подвергнутых воздействию ЭСП по сравнению с нормой. В противоположность этим данным, инкубация ЭМ с $[1-^{14}\text{C}]$ -пальмитоил-КоА приводит к повышению как ГФХ-, так и лизоФХ-АТазной активности на 38% и 44% соответственно.

Как было отмечено выше, насыщенные жирные кислоты, в данном случае ПК, эстерифицируются исключительно в первом положении ФЛ. Исходя из этого, полученные данные позволяют предположить, что 1-часовое воздействие внешних ЭСП приводит к превалированию в ЭМ модификаций ФХ фракций, связанных с жирными кислотами в положении С-1 глицеринового остова.

Активация АТазных реакций, по всей видимости, является следствием интенсификации процессов катаболизма ФЛ ЭМ в условиях 1-часового воздействия ЭСП, выявленного нами ранее [4], и представляет собой альтернативный компенсаторный механизм стабилизации липидного компонента мембранного бислоя эритроцитов.

Ранее нами было показано [5], что в ММ печени крыс, подвергнутых воздействию ЭСП исследуемых параметров, незначительно изменяется активность ФЛаз A_1 и A_2 и практически не изменяется лизоФЛазная активность по сравнению с нормой.

Инкубация суспензии ММ с $[1-^{14}\text{C}]$ -пальмитоил-КоА, в отличие от ЭМ, не приводила к достоверным изменениям в содержании как $[^{14}\text{C}]$ -лизоФХ, так и $[^{14}\text{C}]$ -ФХ (рис. 1).

Однако при использовании в качестве экзогенного субстрата для реакции реацилирования $[1-^{14}\text{C}]$ -олеоил-КоА, по сравнению с нормой, нами обнаружено повышение (на 28%) активности ГФХ-АТазы.

Таким образом, воздействие ЭСП приводит к модификации мембраносвязанных процессов как деацилирования, так и реацилирования ФХ фракций. Несмотря на то что механизмы этих модификаций отличаются друг от друга в зависимости от типа мембран, они всегда носят компенсаторный характер и направлены на сохранение сбалансированности липопротеинового комплекса. Так, в работе [6] нами показано, что воздействие полей аналогичных параметров на фоне повышения общей суммы ФЛ в ЭМ и ММ и изменения абсолютного количества отдельных фракций ФЛ не приводит к существенным изменениям межфракционных соотношений отдельных типов ФЛ. Изменение мембраносвязанных процессов деацилирования и реацилирования ФХ фракций ЭМ и ММ, несомненно, приведет к изменению микровязкости липидного бислоя этих мембран, что может оказать существенное влияние на их структурное и функциональное состояние.

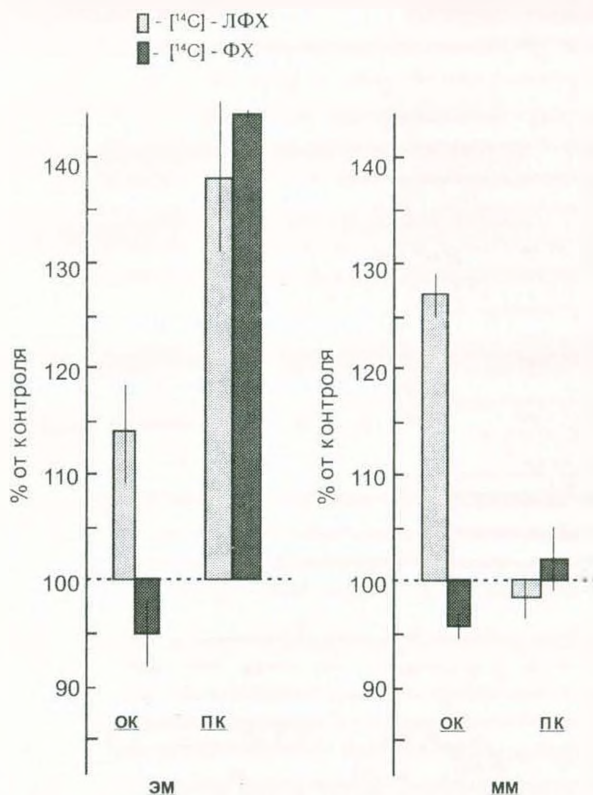


Рис. 1. Уровень меченых продуктов реакции, катализируемой ГФХ-АТой (ЛФХ) и ЛФХ-АТой (ФХ) ЭМ и ММ крыс, подвергнутых однократному воздействию ЭСП (норма 100%).

Возможно, изменение активности ферментных систем цикла деацилирования-реацилирования ФЛ происходит вследствие непосредственного действия внешних ЭСП на структурную организацию этих ферментов. Подобное предположение основывается на собственных и литературных данных [9, 12, 13, 15] об изменении структурной организации биологических макромолекул, в частности белков, при воздействии ЭСП. Однако не исключено также, что обнаруженные нами сдвиги в активности изучаемых ферментов являются следствием не только непосредственного действия ЭСП на них, но и ее опосредованного действия через различные физико-химические и метаболические механизмы регуляции этих ферментных систем.

Изложенное дает основание полагать, что одной из возможных причин биологической активности ЭСП являются изменения активности мембраносвязанных липид-модифицирующих ферментов. Изменения в липидной компоненте мембран имеет существенное влияние на внутримембранные кооперативные механизмы, поддерживающие целостность мембран и, возможно, благодаря быстрым изменениям активности мембраносвязанных ферментных систем модификации липидов осуществляется ответная реакция мембранных структур на воздействие внешних ЭСП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арируни Г.Г. Мат-лы конф. молодых ученых, посвящ. XXVсъезду КПСС, Ереван, 32:33, 1975.
2. Арируни Г.Г., Тер-Маркосян А.С., Киракосян К.Г. Биолог. ж. Армении. 40 (5), 423-425, 1987.
3. Арируни Г.Г., Манукян Р.А., Баджигян С.А. Биолог. ж. Армении. 41 (1), 55-58, 1989.
4. Арируни Г.Г., Баджигян С.А., Манукян Р.А. Биолог. ж. Армении. 45 (1), 43-46, 1992.
5. Арируни Г.Г., Батикян Т.Б., Тадевосян Ю.В. Биохимия, 64 (11), 1514-1518, 1999.
6. Арируни Г.Г., Батикян Т.Б., Тадевосян Ю.В. Сб. научных трудов, посвящ. 70-летию ЕрГМУ, Ереван, 397-400, 2000.
7. Арируни Г.Г. Глобус науки, 1 (1), 33-37, 2001.
8. Масолова И.М., Горская А.И., Шольц К.Д., Котельникова А.Д. В кн. Методы современной биохимии, М, Наука. 45-47, 1975.
9. Оганесян О.В., Арируни Г.Г. Биофизика, 30 (6), 955-958, 1985.
10. Amiram U.K., Duschbangh C.C. Same effects of electric fields on red blood cells with remarks on electrocice red cell sizing. Brit.J.Hematol., 15 (6), 527-538, 1969.
11. Blagh E.G., Dyer W.I. Can. J. Biochem. Physiol., 37, 911-917, 1959.
12. Brown G.G. Electrostatic coupling between membrane proteins. FEBS Lett, 15, 260 (1), 1-5. 1990.
13. Kohler M., Friedrich J., Fidy J. Biochem. Biophys. Acta, 18, 1386(2), 255-288, 1998.
14. Lowry O.H., Rosebrough N.Y., Farr R.H., Randall P.Y. J. Biol. Chem., 193 (1), 265-275, 1951.
15. Rabinovitz J.R. J. Theoretical Biology, 99, 377-382, 1982.
16. Weltzein H.U. Biochim.Biophys.Acta., 559, 2, 259-267, 1979.

Поступила 21.III.2004