

БИОХИМИЯ

УДК 579.852.14

А. З. Пелоян, А. А. Арутюнян, Ж. А. Кцоян,  
член-корреспондент АН Армении К. Г. Карагезян

Об особенностях процесса перекисеобразования липидов клеток  
*Salmonella derby*

(Представлено 12/XI 1991)

Открытие у бактериальных клеток внехромосомных элементов наследственности оказалось чрезвычайно важным для дальнейшей разработки эволюционной проблематики различных форм ДНК в клетках как прокариот, так и эукариот для укрепления связей генетики с теорией эволюции на молекулярном уровне.

Важность изменений бактериальных мембран и клеточных стенок в процессе эволюции самой бактерии делает не только интересным, но и необходимым изучение плазмидомембранных взаимоотношений, что включает мембраносвязанные процессы, действующие на физиологические и физико-химические свойства плазмид, и определяет роль плазмиды в формировании клеточных стенок бактерий.

В некоторых работах показано, как с наличием плазмиды изменяются белковый (1), липидный (2) состав бактериальных клеточных стенок. Плазмиды как своеобразные факторы эволюции могут оказывать влияние на синтез веществ, участвующих в метаболизме бактериальных клеток (3-5). Они влияют на рост, размножение и сохранение бактериальных клеток (6).

Ранее нами показана (7,8) важная роль R-плазмиды в физико-химической организации клеточных стенок *S. derby*. Показано изменение качественного и количественного состава фосфолипидов (ФЛ) клеток *S. derby* в зависимости от наличия в них R-плазмиды (9). С другой стороны показано также влияние R-плазмиды на физиологические характеристики этих клеток (10).

Учитывая непосредственную роль процесса пероксидации липидов (ПОЛ) в физико-химической организации бактериальных клеток, мы задались целью заняться специальным изучением особенностей течения реакции ПОЛ в плазмидосодержащих и бесплазмидных клетках *S. derby*.

Об активности ПОЛ судили по содержанию маконового диальдегида (МДА), образующего с тиббарбитуровой кислотой окрашива-

ние, интенсивность которого регистрировали спектрофотометрически (спектрофотометр Сф—4А) при длине волны 535 нм (11), количество перекисей пересчитывали на 1 мкг фосфора данной суспензии.

Содержание фосфатидной кислоты (ФК) определяли по Смирнову и Чирковской (12), ФЛ пятна идентифицировали с помощью соответствующих свидетелей («Sigma»—США).

Минерализацию липидного фосфора осуществляли в среде серной и азотной кислот и количество ФЛ выражали в мкг неорганического фосфора на 1 мг ацетонового порошка (13). Активность фосфатазы ФК определяли по Помазанской (14).

Свободный  $\alpha$ -токоферол в клетках *S. derby* определяли по методу Дягана (15).

Ранее нами было показано, что кинетическая направленность реакции ПОЛ в клетках *S. derby* не определяется R-плазмидой *S. derby* (16). Детальное изучение процесса ПОЛ показало, что количество МДА (последнего продукта пероксидации липидов) в клетках *S. derby*, лишенных R-плазмиды как в аскорбат, так и в НАДФ.Н зависимой системах окисления, оказывается примерно в 18 раз больше, чем в плазмидосодержащих клетках *S. derby*.

Результаты по изучению реакции ПОЛ клеток трансформантов выявили выраженное сходство исследуемых процессов этих клеток с дикими, плазмидосодержащими клетками *S. derby*, что четко указывает на ассоциацию вышеисследуемого процесса с R-плазмидой *S. derby* (16).

Согласно литературе, взаимообусловленность между интенсивностью ПОЛ и составом липидов (17, 18) может рассматриваться как физико-химическая система регуляции, и как одна из существующих в норме форм обновления состава липидов биологических мембран (19). Однако чрезмерное или длительное неферментативное свободно-радикальное окисление липидов приводит к резкому нарушению физико-химической структуры мембран. Это, в частности, распространяется на функции проницаемости, устойчивости липид-белковых комплексов, а также инактивацию липидзависимых мембраносвязанных ферментов (20).

Учитывая это и основываясь на наших экспериментальных данных, попытаемся представить непосредственную роль процесса ПОЛ в физико-химической организации мембран в зависимости от наличия R-плазмиды в клетках *S. derby*, включая: а) изменение в липидном составе, особенно фосфатидилхолинов (ФХ), фосфатидил-этаноламинов (ФЭ), лизофосфатидилхолинов (ЛФХ),  $\alpha$ -токоферола; б) влияние на гидрофобность мембраны; в) изменение проницаемости мембраны.

Особо интересно изучение влияния процессов ПОЛ на рост и размножение клеток *S. derby*.

а) Из литературы известно (21), что реакции ПОЛ обуславливают изменение состава липидов мембран. Ранее нами показано, что

в бесплазмидных клетках *S. derby*, действительно, имеет место изменение липидного состава (<sup>19, 20</sup>). Суммарное (процентное) количество ФХ и ФЭ в плазмидосодержащих клетках *S. derby* примерно в 2,5—3 раза увеличивается, что может быть результатом интенсивного синтеза указанных ФЛ в плазмидных клетках *S. derby*. По литературным данным (<sup>23</sup>), пероксидированию больше всего подвергаются ФЭ и ФХ, что, несомненно, отражается и на конечной концентрации всего спектра ФЛ *S. derby*, и на ФЛ—ФЛ-ных соотношениях в них.

Поскольку ФК является исходным субстратом вовлекающихся в синтез ФЛ-глицеридов, то в ходе работы представляло интерес проследить за изменениями в содержании ФК и активности фосфатазы ФК в плазмидных и бесплазмидных клетках *S. derby*. В экспериментах установлено, что как содержание ФК, так и активность фосфатидатфосфогидролазы в обоих штаммах *S. derby* находятся почти в одинаковых пределах. При этом отмеченное нами увеличение содержания ФЛ в плазмидном штамме (<sup>22</sup>) мы склонны связывать с изменением ферментных систем, участвующих в синтезе и распаде липидных компонентов клеток (включая и процессы ПОЛ).

В состав липидов клеток входят также витамины группы Е. По литературным данным (<sup>24</sup>),  $\alpha$ -токоферолы обладают свойствами ингибиторов окислительных радикальных процессов. Поэтому в цели нашей работы входило также определение сравнительного количества  $\alpha$ -токоферола в плазмидных и бесплазмидных клетках *S. derby*.

Установлено, что в бесплазмидных клетках его количество при подсчете на 1 мг влажных клеток в 2—3 раза больше, чем в плазмидосодержащих клетках. Учитывая, что ФЛ в смеси с антиоксидантами могут проявлять свойства синергистов (<sup>23</sup>), не исключается, что соотношение ФЛ/ $\alpha$ -токоферол в плазмидных клетках *S. derby* способствует проявлению антиокислительных свойств ФЛ, где несмотря на большое количественное содержание последних, как отмечалось выше, наблюдается слабо выраженное перекисеобразование липидов.

б) Применение нами ранее метода поляризационной микроскопии позволило выявить различия во взаимодействиях мембран клеток *S. derby* с водой в 35%-ной мембранной суспензии этих клеток (<sup>10</sup>). Было показано увеличение гидрофобности мембран бесплазмидных клеток, что, по всей видимости, следует связывать также с увеличением выхода МДА, в результате чего происходят изменения в геометрических параметрах липидного бислоя с увеличением гидрофобного объема мембраны.

в) Согласно существующей научной информации, изменение состояния ПОЛ сопровождается сдвигами в антиокислительной активности, и, следовательно, вязкости мембран (<sup>17</sup>), в связи с чем происходят глубокие отклонения в физико-химических свойствах мембраны и главным образом в функции проницаемости (<sup>21</sup>). Связанный с этим процесс повреждения мембран может сопровождаться выходом некоторых мембраносвязанных и цитоплазматических ферментов в надосадочную жидкость.

По имеющейся информации процесс роста некоторых микроорганизмов сопровождается способностью выделять липиды в культуральную жидкость с интенсификацией в последней процессов ПОЛ<sup>(25)</sup>. Это вызвало интерес к изучению процессов ПОЛ также в жидкой питательной среде роста клеток, для чего по завершении роста клеток *S. derby* их удаляли из среды и в 0,2 мл бульона измеряли выход МДА. Результаты экспериментов продемонстрировали процессы перекиснообразования в культуральных жидкостях обоих типов клеток *S. derby* (таблица): в случае роста бесплазмидных клеток количество МДА в жидкой среде было значительно больше, чем при росте плазмидосодержащих клеток *S. derby*. Выяснение причины интенсификации процессов ПОЛ в культуральных жидкостях бесплазмидного штамма *S. derby* входит в цель наших дальнейших исследований. По всей вероятности, это обусловлено и выходом ЛФХ (процентное содержание которых в бесплазмидных клетках значительно выше) в культуральную жидкость, поскольку, с другой стороны, в отличие от ФХ и ФЭ, ЛФХ хорошо растворимы в воде<sup>(26)</sup>. Вероятный выход ЛФХ, в свою очередь, по всей видимости, будет влиять на гидрофобность бесплазмидной клетки.

Процесс перекисного окисления липидов в культуральных жидкостях клеток *Salmonella derby*

Штаммы	К89 дикий плазмидосодержащий	К82 бесплазмидный	Тр 82 плазмидный трансформант
Количество манового диальдегида	0,08	0,115	0,75

Примечания. Даны среднестатистические из 5 опытов. Абсолютные показатели количества МДА и СФ даны без учета на 1 мкг белка или фосфора

Ранее нами экспериментально обнаружено отставание роста бесплазмидных клеток в 2—3 раза в сравнении с плазмидными клетками<sup>(10)</sup>. Замедленный рост и размножение бесплазмидного штамма *S. derby* может быть также следствием накопленных конечных продуктов ПОЛ, взаимодействие которых с ферментами, как известно, может привести к их инактивации.

Таким образом, отсутствие R-плазмиды чревато глубокими отклонениями физико-химических свойств компонентов мембран *S. derby*, их дестабилизацией с последующими изменениями метаболического статуса клетки в целом и как результат—ее функциональной активности.

Институт экспериментальной биологии  
Академии наук Армении

*Salmonella derby* բջիջների լիպիդային պերօքսիդացիոն  
պրոցեսի առանձնահատկությունների մասին

Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ լիպիդային պերօքսիդացիոն պրոցեսի (ԼՊՊ) ինտենսիվությունը *S. derby* բջիջներում կախված է R-պլազմիդի առկայությունից: Պարզվել է, որ պլազմիդից զուրկ՝ բջիջներում ԼՊՊ-ն 18 անգամ ավելի ինտենսիվ է, քան պլազմիդ պարունակող բջիջներում:

Տրանսֆորմանտ բջիջներում ԼՊՊ-ի ուսումնասիրությունը վկայում է, որ իրոք, նշված պրոցեսը որոշվում է *S. derby* R-պլազմիդով:

Նկարագրված է R-պլազմիդի առկայությունից կախված ԼՊՊ պրոցեսի անմիջական ազդեցությունը *S. derby* բջիջների մեմբրանների ֆիզիկաքիմիական բնութագրերի վրա, ներառյալ՝ լիպիդային կազմում (ֆոսֆատիդիլսուլինների, ֆոսֆատիդիլէթանոլամինների, լիզոֆոսֆատիդիլսուլինների, α-տոկոֆերոլի), մեմբրանի հիդրոֆորության աստիճանի և նրա թափանցելիության վրա: Մեծ է ԼՊՊ-ի ազդեցությունը վերոհիշյալ բջիջների աճման և բազմացման պրոցեսների վրա:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- <sup>1</sup> M. Zaleska, K. Lounatmaa *et al.*, EMBOG: 1013–1018 (1985). <sup>2</sup> O. A. Богославская, E. B. Бурлакова *и др.*, Метаболические плазмиды бактерий, Наука, М., с. 33–35, 1982. <sup>3</sup> M. Ruzi, G. Baldacci *et al.*, in: 3 Eur. Congr. Biotechnol., Mueken, p. 359–362, 1984. <sup>4</sup> P. Tichy, M. Hartman, Folia Microbiol., p. 101–104 (1985). <sup>5</sup> X. Yugu, T. Heuraug, Acta Genet. In., v. 13, p. 323–329 (1986). <sup>6</sup> P. M. Bennett, A. Linton, Antimicrob. Chemother., v. 18, p. 123–126 (1986). <sup>7</sup> А. З. Пепоян, Тезисы 3 конф. молодых ученых ИЭБ АН АрмССР, с. 51, 1988. <sup>8</sup> Ж. А. Кцоян *и др.*, ДАН АрмССР, т. 89, № 5, с. 216–219 (1989). <sup>9</sup> A. Z. Peryan, G. A. Ktzoyan, K. G. Karagezian, FEBS, p. 503 (1990). <sup>10</sup> А. З. Пепоян, Г. Г. Бадалян, ДАН Армении, т. 91, вып. 5, с. 219–225 (1990). <sup>11</sup> Ю. А. Владимиров *и др.*, Мир, М., 1972. <sup>12</sup> Смирнов, Чирковский, Жур. эвол. биохим. и физиол., т. 5, с. 15 (1969). <sup>13</sup> Fiske *et al.*, J. Biol. Chem., v. 66, p. 361 (1925). <sup>14</sup> Л. Ф. Помазанская, Журн. эвол. биохим. и физиол., № 14, т. 1 (1935). <sup>15</sup> D. E. Daggan, Arch. Biochem. Biophys., v. 184, p. 116–120 (1959). <sup>16</sup> А. З. Пепоян, Л. Н. Оезлян *и др.*, Биофизика, вып. 3 (1991). <sup>17</sup> E. B. Бурлакова, в кн.: Биохимия липидов и их роль в обмене веществ, Наука, М., с. 23–34, 1981. <sup>18</sup> F. Novella *et al.*, Ital. J. Biochem., v. 21, p. 325–334 (1975). <sup>19</sup> E. B. Бурлакова *и др.*, Сообщ. МГУ, с. 41–45, 1965. <sup>20</sup> E. B. Бурлакова *и др.*, Наука, М., с. 113–141, 1982. <sup>21</sup> E. B. Burlakova, Stud. Biophys., v. 53, p. 67–71 (1975). <sup>22</sup> А. З. Пепоян *и др.*, 10 й объединенный симпозиум биохим. о-в СССР–ГДР, М., с. 59, 1989. <sup>23</sup> Ж. Н. Аристархова *и др.*, Наука, Л., с. 230, 1985. <sup>24</sup> С. А. Аристархова *и др.*, ДАН СССР, т. 223, с. 215–218 (1976). <sup>25</sup> С. А. Абрамитова *и др.*, Микробиология, т. 56, с. 549–553 (1987). <sup>26</sup> B. D. Ladbroke *et al.*, Chem. and Phys. Lipids, v. 304–356 (1969).