

Качественно-количественный состав и деацилирование фосфолипидов мембран митохондрий крыс после воздействия внешнего электростатического поля

Г.Г. Арцруни, Ю.В. Тадевосян, Т.Б. Батикян

Ереванский государственный медицинский университет им. М.Гераци,
375025 Ереван, ул. Корюна, 2

Институт молекулярной биологии НАН РА
375014 Ереван, ул. Асратяна, 7

Ключевые слова: электростатическое поле, митохондриальные мембраны, фосфолипиды, деацилирование, фосфолипазы, лизофосфолипаза

Одним из регулирующих факторов многих свойств и функций биомембран является микровязкость липидного матрикса, которая определяется количественными соотношениями как фосфолипидов (ФЛ) и их лизоформ, так и насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Липидная сбалансированность липопротеинового бислоя и его структурно-функциональное состояние обусловлены работой целого ряда мембраносвязанных липид-модифицирующих ферментных систем, таких как деацилазы, реацилазы, диэстеразы, трансметилазы и др. Вышеизложенное дает основание полагать, что одной из возможных причин биологической активности внешних электростатических полей (ЭСП) являются изменения активности мембраносвязанных липид-модифицирующих ферментов.

В состоянии относительного покоя мембраны клеток характеризуются установленным в них динамическим равновесием всех морфофункциональных параметров липопротеинового бислоя. Любое внешнее воздействие на клетку в зависимости от его длительности и интенсивности приводит к кратковременному или хроническому, обратимому или необратимому смещению существующего в покое равновесного состояния липидного бислоя.

Ранее было показано [1–3], что воздействие ЭСП приводит к модификации липидного компонента эритроцитарных и митохондриальных мембран (ММ) и существенно влияет на их функциональное состояние. В указанных работах приводятся косвенные данные об изменении количества свободных жирных кислот в митохондриях гепатоцитов крыс после воздействия ЭСП. Была выявлена также [4] активация процессов деацилирования фракции фосфатидилхолинов (ФХ) в эритроцитарных мембранах крыс после часового *in vivo* действия ЭСП.

Целью данного исследования явилось изучение *in vivo*

влияния внешних ЭСП на активность фосфолипаз (ФЛаз) А₁, А₂ и лизоФЛазы, а также на качественный состав ФЛ мембран митохондрий гепатоцитов крыс.

Материал и методы

Эксперименты проводили на двух группах белых беспородных крыс-самцов одного возраста массой 120–150 г: первая группа – контрольные животные, вторая – крысы, подвергнутые часовому воздействию ЭСП напряженностью 200 кВ/м при помощи установок конденсаторного типа [5]. Животные контрольной группы также помещались в модельную камеру, но без подачи напряжения. Как в опытной, так и в контрольной группах исследовалось по 20 крыс.

Сразу после воздействия ЭСП животные подвергались декапитации, и митохондрии гепатоцитов выделяли общеизвестным методом [6] в 0,25 М сахарозе, забуференной 0,04 М Tris-HCl буфером, pH 8,3. Получение ММ осуществляли 10-кратным замораживанием-оттаиванием фракции митохондрий с последующим центрифугированием в течение 20 мин при 10000 г. Белок определяли по методу Lowry [7].

Активность мембраносвязанных ФЛаз и лизоФЛазы определяли в 0,5 мл инкубационной среды 0,04 М Tris-HCl буфера (pH 8,3), содержащей в качестве экзогенных субстратов по 0,5 нМ предварительно эмульгированного в буфере ультразвуковым дезинтегратором УЗДН-2Т 1-ацил-2-[¹⁴C]олеоил-ФХ (уд. акт. 50–60 мКи/ммоль) либо 1-[¹⁴C]пальмитоил-лизоФХ (уд. акт. 57 мКи/ммоль) производства фирмы "Amersham" (Великобритания). В реакционную среду вводили также по 20 нМ немеченых субстратов, 150–200 мкг мембранного белка и по 5 мМ Са²⁺ или ЭГТА.

После инкубации в качающейся водяной бане в течение 20 мин при 37° реакции останавливали 2 мл холодной смеси хлороформ – метанол (1:2, об/об). Липиды, экстрагированные методом Bligh, Dyer [8], разделяли двухэтапной одномерной ТСХ, как описано нами ранее [9]. Радиоактивность проявленных в парах иода и идентифицированных соответствующими хроматографически чистыми стандартами ("Sigma", США) липидных фракций определяли радиосканирующим прибором ("Berthold", Германия) и просчитывали в сцинтилляционной жидкости Bray [10] на спектрометре Roche-Bioelectronique, SL-4221 (Франция).

Количественное определение разделенных ТСХ отдельных ФЛ фракций проводили по методу Erster et al. [11].

Каждое экспериментальное условие было воспроизведено в четырех различных экспериментах по пять параллелей для каждой экспериментальной точки. Данные подвергали статистической обработке по методу Стьюдента. На рисунках представлены среднеарифметические значения данных \pm стандартные отклонения.

Результаты и обсуждение

В препаратах ММ нами было обнаружено (рис. 1, а) Ca^{2+} -зависимое образование 2-[^{14}C]олеил-лизоФХ – прямого продукта реакции деацилирования экзоген-

ного субстрата 1-ацил-2-[^{14}C]олеил-ФХ относительно мало изученной ФЛазой A_1 . При этом относительно низкую (по сравнению с ФЛазой A_2) активность отмеченной деацилазы в исследуемых мембранах полностью подавляло хелатирование ионов кальция ЭГТА. Эти данные дополняют малочисленные сведения литературы [12,13] о функционировании в биомембранах ФЛазной активности типа A_1 .

В этих же условиях эксперимента был также выявлен довольно высокий уровень Ca^{2+} -зависимой активности ФЛазы A_2 (рис. 1, б). В присутствии ЭГТА отмеченная деацилазная активность частично (более чем на 30%) подавлялась в ММ. Эти результаты подтверждают данные литературы [14,15] о наличии в гепатоцитах и Ca^{2+} -зависимой ФЛазы A_2 .

В экспериментах с использованием 1-[^{14}C]пальмитоил-лизоФХ в качестве экзогенного субстрата ММ контрольных крыс была выявлена (рис. 1, в) высокая активность лизоФЛазы. Примечателен факт достоверного, но неполного подавления активности данного фермента в присутствии ионов кальция. Следовательно, наряду с подтверждением известного факта наличия в ММ ФЛазной активности типа A_2 , полученные нами данные свидетельствуют о возможном функционировании в отмеченных мембранных структурах также и каскадной системы деацилирования ФХ, включающей Ca^{2+} -активируемую ФЛазу типа A_1 и субстратзависимую лизоФЛазу. Ранее нами было обнаружено [9] наличие подобной системы и в других мембранных структурах клеток.

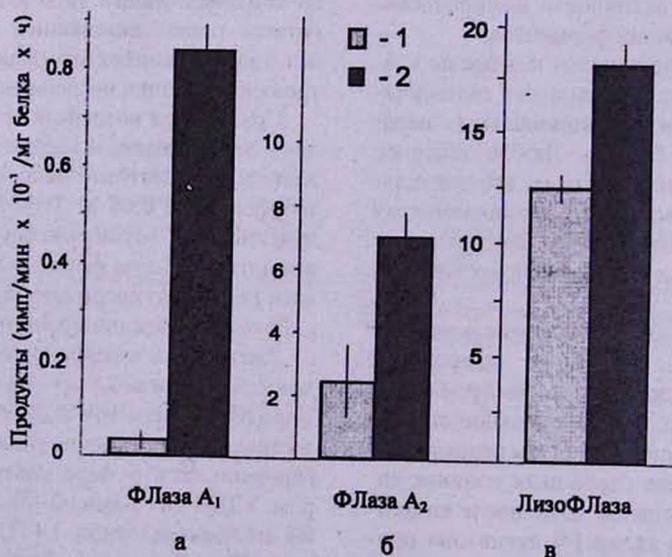


Рис. 1. Активность фосфолипаз A_1 (а), A_2 (б) и лизофосфолипазы (в) митохондриальных мембран в присутствии 5мМ ЭГТА (1) или 5мМ Ca^{2+} (2). На ординатах рисунков представлена радиоактивность продуктов реакций, пересчитанная на мг белка и время

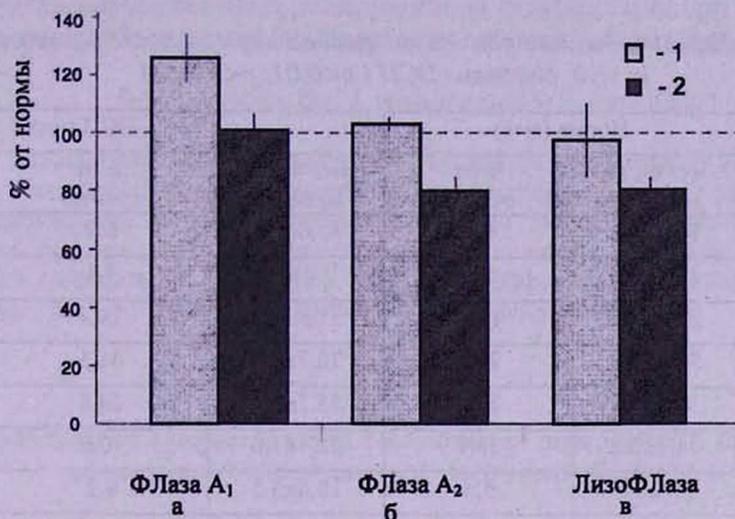


Рис. 2. Эффекты часового *in vivo* действия ЭСП на активность фосфолипаз А₁ (а), А₂ (б) и лизофосфолипазы (в) в митохондриальных мембранах в присутствии ЭГТА (1) или Ca²⁺ (2). За 100% принята ферментативная активность в норме.

Опыты по исследованию часового *in vivo* воздействия внешнего ЭСП на мембраносвязанные ФХ-деацилирующие ферментные системы ММ проводили в аналогичных вышеотмеченным экспериментальных условиях. При этом по сравнению с нормой действие ЭСП в ММ приводило (рис. 2, а) к активации ФЛазы А₁ (на 24%) с накоплением 2-[¹⁴C]олеил-лизоФХ только в условиях хелатирования Ca²⁺ ЭГТА. Действие ЭСП приводило к понижению Ca²⁺-зависимой активности ФЛазы А₂ (рис. 2, б), что указывает на возможное превалирование процессов утилизации [¹⁴C]олеиновой кислоты в ММ. При исследовании действия ЭСП на активность мембраносвязанной лизоФЛазы митохондрий гепатоцитов по сравнению с нормой не наблюдалось (рис. 2, в) достоверных сдвигов в процессе ферментативного высвобождения из 1-[¹⁴C]пальмитоил-лизоФХ свободной [¹⁴C]пальмитиновой кислоты как в присутствии 5 мМ ионов кальция, так и при их хелатировании ЭГТА.

Исходя из результатов данной серии экспериментов, можно заключить, что эффект часового *in vivo* воздействия ЭСП по сравнению с нормой в ММ проявляется в относительно незначительном, но достоверном повышении и понижении активности, соответственно Ca²⁺-независимой ФЛазы А₁ и Ca²⁺-зависимой ФЛазы А₂. Активность же лизоФЛазы в идентичных экспериментальных условиях не претерпевает существенных изменений.

Ранее полученные нами экспериментальные данные [4] свидетельствовали о достоверной активации мембраносвязанных процессов деацилирования фрак-

ции ФХ в эритроцитарных мембранах под действием внешнего ЭСП. На основании представленных выше данных можно сказать, что при часовом *in vivo* действии ЭСП в ММ имеют место определенные сдвиги в активности ферментных систем деацилирования ФЛ. Можно также предположить, что происходит активация мембраносвязанных реацилаз, идентификация и характеристика которых в настоящее время является предметом наших исследований. Обнаруженные нами противоположные эффекты воздействия поля на эритроцитарные и ММ, по всей вероятности, можно объяснить большей лабильностью клеточных мембран по отношению к изучаемому физическому фактору, чем внутриклеточных мембранных образований.

Результаты исследования качественно-количественного состава ФЛ в ММ свидетельствуют (таблица) только о небольшом (24,2 % по сравнению с нормой), но достоверном повышении суммарного количества этих соединений при часовом *in vivo* действии ЭСП. Межфракционные же соотношения (% от сумм отдельных типов ФЛ) не претерпевали существенных отклонений. Они для всех исследованных фракций находились в пределах $\pm 6\%$. Следовательно, в ММ животных, подвергнутых воздействию внешнего ЭСП, на фоне повышения общей суммы ФЛ сохраняется свойственный для нормы оптимальный статус межфракционных количественных соотношений, что, по всей вероятности, имеет первостепенное значение для сохранения целостности ММ, невзирая на их функциональное состояние.

Фосфолипиды мембран гепатоцитов в норме и после часового *in vivo* действия ЭСП ($p < 0,01$; $p < 0,001$)

Фосфолипиды	Норма (n=6)		ЭСП (n=8)		
	мкг Φ_n на мг белка	% от суммы	мкг Φ_n на мг белка	% от суммы	% от нормы
ЛизоФХ	12,1±1,2	6,7	15,6±1,5	6,9	128,9
СФМ	10,6±2,8	5,9	9,9±1,9	4,4	93,4
ФХ	29,1±1,7	16,1	31,9±1,5	14,2	109,6
ФИ+ ФС	50,9±7,8	28,2	70,7±8,5	31,5	138,9
ФЭ	39,7±3,7	22,0	55,7±4,6	24,8	140,3
ФК	28,7±3,8	15,9	22,4±1,6	10,0	78,0
КЛ	9,7±0,8	5,4	18,4±3,5	8,2	189,7
Сумма	180,8	100	224,6	100	124,2

Иная картина наблюдалась при сравнении с нормой абсолютного содержания (% от нормы) каждой отдельной фракции ФЛ мембран гепатоцитов при воздействии ЭСП. Выявленные сдвиги свидетельствовали о закономерных нарушениях в различных мембранных механизмах липидной модификации при действии ЭСП. Так, повышение уровня лизоФХ (28,9%) в опыте на фоне одновременной стабильности (109,6%) содержания ФХ подтверждает вышеприведенные данные об отсутствии активирующего эффекта ЭСП на мембранные процессы деацилирования ФЛ. Количественные сдвиги всех остальных фракций ФЛ при этом также указывают на превалирование в ММ синтетических процессов отмеченных соединений.

Изменения в активности мембраносвязанных процессов деацилирования и реацилирования ФЛ в мембранных структурах клеток, несомненно, приводят к изменению микровязкости липидного бислоя, что может оказать существенное влияние на их функциональное состояние. Возможно, что одной из причин выявленных нами ранее [1–3] многочисленных сдвигов в структурном и функциональном состоянии митохондрий при воздействии ЭСП является изменение микровязкости липидного бислоя мембран.

Говорить о конкретных механизмах действия ЭСП на мембранные структуры преждевременно, однако, основываясь на тех физических процессах, которые происходят в мембране при наложении внешних по-

лей, можно сделать ряд предположений. Так, воздействие внешних электрических полей приводит к поляризации мембранных белков и ФЛ, изменению объемной плотности электрического заряда в пределах бислоя, перераспределению плотностей заряда на поверхности отдельных слоев. Эти первичные физические изменения в мембране, вызываемые воздействием ЭСП, могут влиять на внутримембранные модификационные кооперативные механизмы, поддерживающие "метаболический статус покоя". В указанных механизмах важную роль играет липидный компонент, который благодаря быстрым изменениям активности мембраносвязанных ферментных систем обмена липидов может осуществлять ответную реакцию мембранных структур клетки на изучаемое воздействие. Изменение активности отмеченных ферментных систем может происходить вследствие непосредственного действия ЭСП на их структурную организацию. Подобное предположение основывается на собственных и литературных данных [16–19] об изменении структурной организации биологических макромолекул, в частности белков, при воздействии ЭСП. Однако не исключено также, что представленные здесь и обнаруженные нами ранее сдвиги в активности изучаемых ферментов являются следствием не только непосредственного действия ЭСП на них, но и его опосредованного действия через различные физико-химические и метаболические механизмы регуляции этих ферментных систем.

Поступила 15.01.04

Առնետների հեպատոցիտներում միտոքոնդրիումների ֆոսֆոլիպիդների որակա-քանակական կազմը և ապաացիլացումը արտաքին էլեկտրաստատիկ դաշտի ազդեցության պայմաններում

Գ.Գ. Արծրունի, Յու.Վ. Թադևոսյան, Թ.Բ. Բատիկյան

Ուսումնասիրվել է առնետների հեպատոցիտների միտոքոնդրիումային թաղանթների ֆոսֆոլիպիդային կազմի A_1 , A_2 ֆոսֆոլիպազային և լիզոֆոսֆոլիպազային ակտիվությունների վրա 200 կՎ/մ ինտենսիվությամբ արտաքին էլեկտրաստատիկ դաշտի 1-ժամյա ազդեցությունը: Յույց է տրվել, որ նշված

ցուցանիշներով դաշտի *in vivo* ազդեցությունը բերում է ֆոսֆաթիլիլիտոլինային թաղադրամասի ապաացիլացման թաղանթ-կապված պրոցեսների ակտիվացման, և որպես հետևանք՝ միտոքոնդրիումների թաղանթների ֆոսֆոլիպիդների կազմի յուրահատուկ փոփոխությունների:

Quantitative-qualitative composition and deacylation of phospholipids in mitochondriums of rat hepatocytes at external electrostatic field action

G.G. Artzruny, Yu.V. Tadevosyan, T.B. Batikyan

The action of external electrostatic field with intensity of 200 kW/m and duration of 1 hour on the phospholipid composition of rat hepatocyte mitochondrial membranes and activities of phospholipases A_1 , A_2 and lysophospholipase has been investigated. It has been shown that

only *in vivo* action the electrostatic field of such parameters brings to the activation of the membrane-associated processes of phosphatidylcholine fraction deacylation as well, as to the specific changes in the phospholipid composition of membranes.

Լիտերատուրա

1. Արծրունի Գ.Գ., Թեր-Մարկոսյան Ա.Ս., Կիրակոսյան Կ.Գ. *Բիոլ. ժուրն. Արմենի*, 1987, XL (5), с. 423.
2. Արծրունի Գ.Գ., Բաճճյան Ս.Ա., Մանուկյան Ք.Ա. *Բիոլ. ժուրն. Արմենի*, 1992, XLV (1), с. 43.
3. Մկրտչյան Ս.Լ., Արծրունի Գ.Գ. *Բիոլ. ժուրն. Արմենի*, 1978, XXI (7), с. 750.
4. Արծրունի Գ.Գ. *Գլոբուս ասի*, 2001, 1(1), с. 33.
5. Արծրունի Գ.Գ. *Ստանովյա ընդհանուր ազդեցության էլեկտրոստատիկական դաշտի վրա օբյեկտների վրա*. Մատ. կոնֆ. մոլ. սով. ուս., նվիրված XXV համաժողովին ԿՄԸԸ. Երևան, 1975, с. 32.
6. Մասոլովա Ի.Մ., Գորսկայա Ի.Ա., Շոլց Կ.Ը. *Վ Կն.: Մեթոդները ժամանակակից Բիոքիմիայի մեջ*, 1975, с. 45.
7. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr R.H., Randall P.J. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, (1):265.
8. Bligh E.G., Dyer W.J. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 1959, 37, 911.
9. Թադևոսյան Յու.Վ., Ասատրյան Լ.Յու., Բատիկյան Թ.Բ. և օր. *Բիոքիմիա*, 1996, 61(8), с. 1414.
10. Bray G.A. *Anal. Biochem.*, 1960, 1:279.
11. Erster J.R., Zeterstrom R., Linberg O. *Acta Chem. Scand.*, 1950, 4:942.
12. Martin T.W., Wisolmerski R.B. *J. Biol. Chem.*, 1987, 25 (262):13086.
13. Salman M., Rottem S. *Biophys. Acta.*, 1995, 1235(2):369.
14. Adachi J., Togoshima S., Osawa T. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1983, 296: 118.
15. Bodiani K., Lu X., Artur G. *Biochem. J.*, 1992, 288:965.
16. Օգանեսյան Օ.Վ., Արծրունի Գ.Գ. *Բիոֆիզիկա*, 1985, 30(6), с. 955.
17. Rabinowitz J.R. *J. Theor. Biology*, 1982, 99:377.
18. Bean C.R., Bennet A.V. *Biopolymers*, 1973, 12(4):817.
19. Kalia A., Kothaker V. *Indian J. Biochem.*, 1985, 22 (2):93.