

УДК 577.49:569.323.4:611.36:576.311:534.121.2:577.150.8

©Коллектив авторов

## **ВЛИЯНИЕ СЕЗОНОВ ГОДА НА ГИДРОЛИТИЧЕСКУЮ И ТРАНСАЛКИЛИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ ФОСФОЛИПАЗЫ D МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС**

***Г.Ш. Мирзаева\*, Л.С. Клемешева, Г.М. Иргашева, К.Т. Алматов***

Национальный Университет Узбекистана им. Мирзо Улугбека, 700109, Ташкент,  
Сабир Рахимовский район, Мед. городок, 11-24; тел.: (998712) 246-35-98

Доказано влияние сезонов года на гидролитическую и трансалкилирующую активность фосфолипазы D мембран митохондрий печени крыс. Установлено, что как гидролитическая, так и трансалкилирующая активность фосфолипазы D митохондрий печени крыс повышается летом по сравнению с зимой. Это означает, что летом скорость образования фосфолипидов в мембране митохондрий печени повышается. Возможно, что обнаруженные на уровне митохондрий гидролазно-трансферазные реакции фосфолипазы D являются закономерными звеньями единого механизма компенсаторно-приспособительных реакций организма на изменения сезонов года.

**Ключевые слова:** печень, митохондрия, фосфолипаза D, фосфолипиды.

**ВВЕДЕНИЕ.** Известно, что в митохондриях печени крыс присутствует фосфолипаза D [1-3]. Этот фермент осуществляет гидролиз фосфолипидов и лизофосфолипидов мембран митохондрий с образованием фосфатидной кислоты, лизофосфатидной кислоты и свободных оснований. Фосфолипаза D способна также катализировать реакции трансалкилирования при инкубации митохондрий с экзогенными фосфолипидами и свободными спиртами (метанолом и этанолом); в ходе этих реакций происходит образование фосфатидилметанола и фосфатидилэтанола. В присутствии таких соединений, как глицерин, серин, инозит, этаноламин, холин фосфолипаза D катализирует реакцию замены основания в молекуле фосфолипида. В результате из фосфатидилхолина образуются фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, кардиолипин, фосфатидилинозит и т.д. Возможно, именно трансферазным действием эндогенной фосфолипазы D можно объяснить увеличение концентрации фосфатидилсерина (при набухании мембран митохондрий [4]), фосфатидилсерина, фосфатидилинозита и фосфатидилхолина (при тепловом воздействии [5]). Не исключено, что свободные холин, серин и инозит для осуществления реакции трансалкилирования могут поставляться эндогенными холинфосфатдегидрогеназами [6, 7], протеазами [8-10] и фосфогидролазами [11], существование которых в митохондриях доказано. Известно, что кардиолипин, фосфатидилсерин и фосфатидная кислота синтезируются в митохондриях полностью автономно [12-15].

---

\* - адресат для переписки

## ВЛИЯНИЕ СЕЗОНОВ НА ФОСФОЛИПАЗУ D МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ

Исследование реакций с участием фосфолипазы D мембран митохондрий печени в зимнее и летнее время года весьма актуально в связи с проблемой адаптации организма к изменяющимся условиям окружающей среды.

**МЕТОДИКА.** Опыты проведены на белых беспородных крысах самцах массой 180–200 г. В опытах с сезонной акклиматизацией в течение одного года крысы находились в полуоткрытом помещении, подвергаясь влиянию всех климатических факторов, кроме прямой инсоляции. К 10 ч температура воздуха в виварии составляла в среднем зимой 10–12°C и летом 22–25°C, к 15 ч зимой 14–16°C и летом 34–36°C.

Выделение митохондрий из ткани печени крыс проводили по ранее описанной методике [16]. Белок определяли по методу Lowry [17]. Фосфолипиды митохондрий экстрагировали по методу Bligh-Daer [18].

Гидролитическую активность митохондриальной фосфолипазы D определяли по образованию холина или этаноламина в 0,25 М сахарозе и 2 мМ трис-НС1 буфере (рН 7,4) после инкубации при 30°C в течение 60 мин. Реакцию останавливали добавлением 1,5 мл хлороформа. После центрифугирования при 5000 g в течение 15 мин, водный слой отделяли и определяли в нем содержание холина с помощью йодного реагента [19]. Перед определением содержания этаноламина в водном слое, его предварительно нагревали на кипящей водяной бане в течение 15 мин (эта процедура необходима для денатурации белков, которые мешают определению этаноламина). После центрифугирования 15 мин при 5000 g в концентрации этаноламина определяли нингидриновым реактивом [20]. Для контроля определяли исходное содержание холина и этаноламина в инкубационной смеси до инкубации. Активность фермента выражали в наномоль холина или этаноламина, выделившихся за 1 мин в расчете на 1 мг белка.

Трансферазную активность фосфолипазы D определяли по образованию фосфатидилэтанола и фосфатидилметанола. Инкубационная смесь имела тот же состав, что и при определении гидролитической активности фермента, но содержала еще этанол (6% по объёму) или метанол (4% по объёму). Смесь инкубировали при 30°C в течение 60 мин, затем экстрагировали фосфолипиды, как описано выше, и анализировали их двумерной тонкослойной хроматографией в следующих системах растворителей: в 1-м направлении – хлороформ-метанол-28% аммиак (65:25:5), во 2-м направлении – бутанол-уксусная кислота-вода (60:20:20) [21]. Для идентификации фосфатидилэтанола и фосфатидилметанола эти фосфолипиды синтезировали искусственно с помощью фосфолипазы D из среднеазиатской редьки и использовали их в качестве свидетелей. Синтез осуществляли согласно методике [22].

Содержание фосфатидилэтанола и фосфатидилметанола, так же как и других фосфолипидов, определяли в экстракте после сжигания хлорной кислотой по фосфору, используя реактив Васьковского [23]. Трансферазную активность фосфолипазы D выражали в наномолях фосфатидилэтанола или фосфатидилметанола, выделившихся за 1 мин в расчете на 1 мг белка.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Сезонные изменения гидролитической активности фосфолипазы D митохондрий печени крыс в условиях *in vitro* после инкубации в течение 60 мин приведены в таблице 1. Видно, что летом по сравнению с зимой каталитическая активность фосфолипазы D митохондрий печени повышается: по гидролизу общих фосфолипидов в 3,85 раза, по образованию фосфатидной кислоты – в 3,40 раза. Летом активность фосфолипазы D по гидролизу фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина выше чем зимой в 3,08 раза и в 3,96 раза соответственно. Независимо от сезонов года более предпочтительным субстратом для фосфолипазы D митохондрий печени является фосфатидилэтаноламин, чем фосфатидилхолин, что согласуется с данными работ [1–3]. Однако летом гидролиз фосфатидилэтаноламина по сравнению с фосфатидилхолином протекает быстрее, чем зимой: если зимой - в 1,37, то летом – в 1,78 раза.

Таблица 1. Сезонные изменения гидролитической активности фосфолипазы D митохондрий печени крысы (n = 8-12).

| Сезоны | Активность фосфолипазы D, мкг/час/мг белка |                     |               |               |
|--------|--|---------------------|---------------|---------------|
|        | Продукты гидролиза                         |                     |               |               |
|        | Общий фосфолипид                           | Фосфатидная кислота | Холин         | Этаноламин    |
| Зима   | 3,31±0,64                                  | 2,66±0,48           | 0,19±0,04     | 0,26±0,05     |
| Лето   | 12,76±1,35****                             | 9,05±0,90***        | 0,59±0,06**** | 1,05±0,08**** |
| %      | 385  | 340                 | 308           | 396           |

Примечание: здесь и в таблице 2 представлены средние арифметические ± ошибка средней; коэффициент достоверности обозначен звездочками: \*\*p<0,02, \*\*\*p<0,01, \*\*\*\*p<0,001.

Существенные изменения физико-химических характеристик мембран должны вызывать трансферазное действие фосфолипазы D. Замена полярных участков в молекулах фосфолипидов приводит к изменению локальных зарядов в мембране, мембранном потенциале, электрическом сопротивлении. Это должно сказаться на параметрах окислительного фосфорилирования, полиферментных систем, мембранного потенциала, ионного транспорта и т.д. Кроме того, реакции трансалкилирования с участием внемембранных доноров алкила приводят к обновлению фосфолипидов мембран и изменению их фосфолипидного состава. В результате изменяются и свойства мембраны: степень её гидрофобности, соотношение бислойных и небислойных участков, вязкость и др. [24].

Данные о содержании фосфатидилсерина, фосфатидной кислоты, фосфатидилметанола и фосфатидилэтанола в митохондриях печени в присутствии метанола и этанола в условиях *in vitro* после инкубации при 30°C в течение 60 мин в летнее и зимнее время года приведены в таблице 2.

Таблица 2. Изменение содержания минорных фосфолипидов митохондрий печени в присутствии спиртов в летнее и зимнее время года (n = 8-10).

| Сезоны | Вариант опыта | Содержание фосфолипидов, нмоль/мг белка |                     |                   |                  |
|--------|---------------|---|---------------------|-------------------|------------------|
|        |               | Фосфатидилсерин                         | Фосфатидная кислота | Фосфатидилметанол | Фосфатидилэтанол |
| Зима   | Контроль      | 1,14±0,22                               | 1,13±0,10           |                   |                  |
|        | Метанол       | 0,62±0,05****                           | 0,85±0,08**         | 0,18±0,06****     |                  |
| Лето   | Контроль      | 3,98±0,76                               | 3,96±0,34           |                   |                  |
|        | Метанол       | 1,78±0,16****                           | 2,68±0,27***        | 0,64±0,13****     |                  |
| Зима   | Контроль      | 1,14±0,22                               | 1,13±0,10           |                   |                  |
|        | Этанол        | 0,32±0,03****                           | 0,82±0,10**         |                   | 0,11±0,03****    |
| Лето   | Контроль      | 3,98±0,76                               | 3,96±0,34           |                   |                  |
|        | Этанол        | 0,47±0,08****                           | 2,25±0,18***        |                   | 0,32±0,06****    |

## ВЛИЯНИЕ СЕЗОНОВ НА ФОСФОЛИПАЗУ D МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ

Если зимой в митохондриях печени в контроле содержание фосфатидилсерина и фосфатидной кислоты составляет  $1,14 \pm 0,22$  и  $1,13 \pm 0,10$  нмоль/мг белка, то после инкубации с метанолом -  $0,62 \pm 0,05$  и  $0,85 \pm 0,08$  нмоль/мг белка, то есть оно уменьшается соответственно в 1,46 и 1,25 раза. При этом появляются аномальные фракции фосфатидилметанола. Аналогичные изменения наблюдаются и в летнее время. Однако, по сравнению с зимой оно происходит с более высокой скоростью: в контроле образование фосфатидилсерина и фосфатидной кислоты повышается соответственно в 3,49 и 3,50 раза. В присутствии метанола образование фосфатидилметанола летом по сравнению с зимой повышается в 3,55 раза. Аналогичный характер изменений наблюдается после инкубации митохондрий с этанолом: образование фосфатидилэтанола летом по сравнению с зимой повышается в 2,91 раза.

Таким образом, летом по сравнению с зимой как гидролитическая, так и трансалкилирующая активность фосфолипазы D митохондрий печени крыс повышается. Это означает, что летом скорость образования фосфолипидов в мембране митохондрий печени повышается. Возможно, что обнаруженные на уровне митохондрий гидролазно-трансферазные реакции фосфолипазы D являются закономерными звеньями единого механизма компенсаторно-приспособительных реакций организма на изменения сезонов года.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Алматов К.Т., Горбатая О.Н. и др. (1987) Укр. биохим. журнал, **59**(4), 93-96.
2. Рахимов М.М., Горбатая О.Н., Алматов К.Т. (1989) Биохимия, **54**, 1066-1074.
3. Алматов К.Т., Расулова В.Б., Рахимова Н.М., Клемешева Л.С., Рахимов М.М. (2001) Известия ВУЗов. Химико-биологические науки. Ташкент, 2-4, 56-58.
4. Алматов К.Т. (1990) Механизмы развития повреждений мембран митохондрий и роль липолитической системы. Дисс. докт. наук, ТашГУ, Ташкент.
5. Рахимов М.М., Алматов К.Т., Мурталипов Д.Т. (1989) Биохимия, **54**, 948-955.
6. Francescangeli E., Gorocci G., Porrevecchio P., Porceletti G. (1984) Ital. J. Biochem., **33**, 213-215.
7. Relech S.L., Vance L.E. (1984) Biochim. Biophys. Acta, **779**, 217-251.
8. Володина Т.В., Козельцов В.Л. (1978) Биохимия, **43**, 1816-1822.
9. David B.G., Jerry H.J., Dennis P.R., Olvin M.M. (1982) Biochim. Biophys. Res. Commun., **109**, 1276-1289.
10. Комов В.П., Стрелкова М.А. (1987) Биохимия, **52**, 1080-1087.
11. Баранска И. (1982) В кн.: Липиды биологических мембран. Ташкент: ФАН, с. 57-82.
12. Zvorowski J., Woitczek L. (1969) Biochim. Biophys. Acta, **187**, 73-84.
13. Daal N.L.W., Bremer J. (1970) Biochim. Biophys. Acta, **210**, 92-104.
14. Zvorowski J., Dugas A., Woitczek L. (1983) FEBS Lett., **157**, 179-182.
15. Ляхович В.В. (1976). Биологические науки, **2**, 36-45.
16. Hogeboom O.N., Schneider W.C., Pallade O.H. (1948) J. Biol. Chem., **172**, 619-641.
17. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal N.J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
18. Bligh E.G., Daer W.J. (1959) Can. J. Biochem. Physiol., **37**, 911-917.
19. Shapiro B. (1953) Biochem. J., **53**, 663-664.
20. Dawson R.M.C., Hemington N. (1967) Biochem. J., **102**, 76-86.
21. Бергельсон Л.Д., Дятловицкая Э.В., Молотковский Ю.Г., Батраков С.Г., Барсуков Л.И., Проказова Н.В. (1981) Препаративная биохимия липидов. Москва: Наука.
22. Рахимов М.М., Мадьяров Ш.Р., Бабаев М.У. (1979) Узбек. биол. журнал, **3**, 7-9.

23. *Vaskovsky V.E., Kostetsky E.G, Vasendin I.M.* (1975) *J. Chromatogr.*, **114**, 129-141.
24. *Алматов К.Т.* (1993) Ферментативные превращения фосфолипидов мембран митохондрий. Ташкент, М.

Поступила: 09. 11. 2007.

#### THE EFFECT OF SEASONS ON HYDROLYTIC AND TRANSALKYLATING ACTIVITY OF PHOSPHOLIPASE D IN THE MEMBRANES OF RAT LIVER

*G.Sh. Mirzaeva, L.S. Klemesheva, G.M. Irgasheva, K.T. Almatov*

Mirzo Ulugbek National University of Uzbekistan, Biologic-Soil Faculty, Department of Human and Animal Physiology, Universitetskaya ul., 1, Tashkent, 700174 Uzbekistan; tel.: (998712) 246-35-98

The seasonal effect on the hydrolytic and transalkylating activity of phospholipase D in the membranes of rat liver has been demonstrated. In summer the hydrolytic and transalkylating activity of the phospholipase D in rat liver mitochondria increased compared to the activity in winter. This implies that the rate of the formation of phospholipids in rat liver mitochondrial membranes is higher in summer. Perhaps, the revealed hydrolase-transferase reactions of phospholipase D are regular links in a single mechanism of seasonal compensatory-adapting responses of organisms.

**Key words:** liver, mitochondria, phospholipase D, phospholipids.