

Влияние соединений кобальта на активность лизофосфолипазы_{A1} мембран митохондрий печени крыс при γ -облучении**Influence of connections of cobalt on activity lysosofolipazyaj a_1 membranes mitochondrion ai liver of rats at and γ -irradiation**

Аннотация: Установлено, что при γ -облучении гидролитическая активность лизофосфолипазы A_1 митохондрий печени крысы повышается, особенно в отношении лизофосфатидилхолина. Показано, что при γ -облучении соединения кобальта (Co_{102} - Транс- $Co(MemSCl)_3 \cdot 2H_2O$ и Co_{227} - Цис- $Co(MtmSCl)_3 \cdot 4H_2O$) не только нормализуют активность лизофосфолипазы A_1 митохондрий печени, но и ингибируют ее в отношении лизофосфатидилхолина и лизофосфатидилэтаноламина.

Abstract: It is established, that at and γ -irradiation hydrolytic activity lysosofolipazyaj a_1 mitochondrion a liver of a rat raises, especially concerning lysosofatidilhonily.

It is shown, that at γ -irradiation of connection of cobalt (Co_{102} -trans- $Co(MemSCl)_3 \cdot 2H_2O$ and $Co(MtmSCl)_3 \cdot 4H_2O$ not only normalizes activity lysosofolihazyaj γ -mitochondrion a liver, but also inhibition it concerning lysosofatidilhonily and lysosofatidiletanolaminy.

Ключевые слова: Мх – митохондрия, ЛФЛ A_1 - лизофосфолипаза A_1 , ЛФЭ - лизофосфатидилэтаноламин, ФЛ A_2 - фосфолипаза A_2

Key words: Мх-Mitochondrion, LFL A_1 – lysosofolipazyaj A_1 , LFE- lysosofatidiletanolaminy, FL A_2 - fosfltipazyaj A_2

Первые работы, специально посвященные митохондриальной лизофосфолипазе A_1 , появились в конце 90-х годов [1]. Фермент локализован на наружной и внутренней мембранах митохондрии [2, 3], рН-оптимум фермента внутренней мембраны равен 6, а наружной - 7,4. Фермент термолabile. Удельная активность лизофосфолипазы A_1 наружной мембраны существенно выше, чем внутренней [3]. Более предпочтительным субстратом является лизофосфатидилэтаноламин чем лизофосфатидилхолин [2,3]. Митохондриальная лизофосфолипаза как и лизофосфолипаза А других органоидов клетки, не активируется Ca^{2+} и не ингибируется ЭДТА. Оптимум рН гидролитического действия фермента находится в пределах 6-7 [3].

Следует отметить, что митохондрии являются самой чувствительной частью клетки, их реакции и состояние определяют реакции и состояние всей клетки. Известно, что при разных видах патологии и стрессе активность эндогенных лизофосфолипаз A_1 резко возрастает и именно это часто является колючевым этапом развития патологии и приводит, в конечном счете к драматическим для клетки последствиям [4]. В результате гидролиза лизофосфолипидов под действием лизофосфолипазы A_1 накапливаются свободные жирные кислоты - известные протонофоры. В результате увеличения протонной проницаемости митохондриальной мембраны снижается мембранный потенциал, разобщается окислительное фосфорилирование и т.д.

Задачей настоящего исследования явилось изучение гидролитической активности лизофосфолипазы A_1 мембран митохондрии печени при γ -облучении (на 4 сутки эксперимента) до и после введения в организм облученных крыс Co_{102} и Co_{227} .

Исследования проводились на крысах - самцах массой 160-180 г. Животные были разделены на несколько групп по 10-12 животных в каждой: 1 группа - это здоровые животные, 2-облученные контрольные, которым вводили дистиллированную воду в объеме препарата кобальта; 3 - облученные, которым вводили в течение 5 дней до облучения препарат Co_{102} (Транс- $Co(MemSCl)_3 \cdot 2H_2O$) в дозе 4 мг/кг веса животных; 5 - соответственно до облучения в течение 5 дней вводили Co_{227} (Цис- $Co(MtmSCl)_3 \cdot 4H_2O$) в дозе 4 мг/кг веса животных. Крысы облучались γ -лучами в дозе 7 Гр, источник Co ,

мощность дозы - $5,93 \times 10^{-4}$ А/кг. Животных декапитировали на 2 и 4 день после ночного голодания.

Митохондрии выделяли из печени контрольных и опытных животных методом дифференциального центрифугирования [5], используя в качестве среды выделения 0,25 М сахарозу в 10 мМ трис-НС1-буфере, рН 7,4, содержащем 2мМ ЭДТА. Затем митохондрии промывались дважды средой выделения без ЭДТА.

Активность лизофосфолипазы A_1 митохондрий печени здоровых и облученных животных определяли по гидролизу общих фосфолипидов и лизофосфолипидов и по образованию глицерофосфохолина, глицерофосфо-этанолamina и СЖК в среде инкубации, как описано выше, при рН 6,0 [2, 3]. Мх инкубировали 1 час при 37°C, затем добавляли 3 мл смеси хлороформ-метанол (1:2), интенсивно перемешивали, затем центрифугировали и центрифугат упаривали на роторном испарителе, сухой остаток растворяли в 50 мкл смеси хлороформ-метанол-вода (1:2:0,8) и анализировали методом тонкослойной хроматографии. Для разделения фосфолипидов использовали двумерную хроматографию в системах растворителей хлоро-форм-метанол-28% аммиак (65:25:5) в первом направлении и хлороформ-ацетон-метанол-уксусная кислота-вода (6:8:2:2:1) во втором. Лизофосфатидилхолин и глицерофосфохолин, лизофосфатидилэтанолamin и глицерофосфоэтанолamin разделяли одномерной хроматографией в системе: хлороформ-метанол -3М трихлоруксусная кислота - вода (4:6:2:1). Значения R в этой системе были для лизофосфатидилхолина - 0,8, для глицерофосфохолина - 0,4. Идентификацию глицерофосфохолина проводили на основании положительной реакции с реактивом Драгендорфа, а также с помощью свидетеля, полученного в результате гидролиза лизофосфатидилхолина лизофосфолипазой A_1 из яда большого шершня. Количество фосфолипидов и глицерофосфохолина (или глицерофосфоэтанолamina) определяли по фосфору, как описано выше. Для контроля определяли исходное содержание фосфолипидов, свободных жирных кислот, глицерофосфохолина и глицерофосфоэтанолamina до инкубации. Удельную активность лизофосфолипазы A_1 выражали в мкг/час мг белка.

Полученные результаты свидетельствуют, что при γ -облучении каталитическая активность лизофосфолипазы A_1 мембран митохондрий печени повышается на 53,2%, то есть при облучении лизофосфолипаза A_1 митохондрий печени активизируется быстрее, чем фосфолипаза A_2 . При этом следует отметить, что лизофосфолипаза A_1 митохондрий печени предпочтительно гидролизует лизофосфатидилхолина, чем лизофосфатидилэтанолamin. Так, если фермент гидролизует Лизофосфатидилхолин в 2 раза быстрее, чем в норме, то лизофосфатидилэтанолamin - в 1,41 раза, т.е. образование глицерофосфохолина происходит в 2 раза быстрее, чем глицерофосфоэтанолamina. Таким образом, на наш взгляд, одной из возможных причин уменьшения содержания лизофосфатидилхолина в митохондриях печени облученных животных, является повышение активности лизофосфолипазы A_1 .

Таким образом, при γ -облучении гидролитическая активность лизофосфолипазы A_1 митохондрий печени повышается, особенно в отношении лизофосфатидилхолина. При этом следует отметить, что при облучении повышение активности лизофосфолипазы A_1 митохондрий печени происходит более заметно, чем фосфолипазы A_2 .

Таблица 1

Влияние препаратов кобальта на активность лизофосфолипазы A_1 мембран митохондрий печени крыс после γ -облучения ($M \pm m$; $n = 10-12$).

Варианты	Активность лизофосфолипазы A_1 , мкг/час мг белка
	Продукты гидролиза

	Свободные жирные кислоты	Глицерофосфо-холин	Глицерофосфо-этаноламин
Здоровые животные	0,88±0,15	1,12*0,14	1,71±0,26
Облученные животные: Контроль	1,35±0,21	2,24±0,24	2,42±0,31
%	153,2	200,0	141,4
Co Ю2	0,69±0,12	0,82±0,13	1,37±0,24
%	78,7	73,5	80,4
Co ₂₇	0,65±0ДЗ	0,80±0,12	1,34±0,17
%	73,6	71,8	78,2

После введения в организм облученных животных соединений Co₁₀₂ или Co₂₂₇ отмечается не только нормализация активности лизофосфолипазы A₁, но и в некоторой степени ингибирование образования свободных жирных -кислот (на 21,3 и 26,4% соответственно от уровня нормы). При исследовании субстратной специфичности было установлено, что при γ -облучении соединения кобальта более заметно ингибируют активность лизофосфолипазы A₁ митохондрий печени по отношению гидролиза лизофосфатидил-холинов, чем лизофосфатидилэтанолamina. Так, если Co₁₀₂ и Co₂₂₇ ингибируют активность фермента по гидролизу лизофосфатидилхолина на 25,5 и 28,2% соответственно от уровня нормы, то по гидролизу лизофосфатидилэтанолamina - на 19,6 и 22,8%. Таким образом, при γ -облучении соединения кобальта Co₁₀₂ и Co₂₂₇ не только нормализуют активность лизофосфолипазы A₁ митохондрий печени, но и ингибируют ее в отношении лизофосфатидилхолина и лизофосфатидилэтанолamina.

Литература:

1. Горбатая О.Н. Липолитическая система митохондрий и ее функциональная роль. Канд. биол. наук. Ташкент. 1988. –С.203.
2. Горбатая О.Н., Мирталипов Д.Т., Алматов К.Т., Рахимов ММ. Обнаружение лизофосфалипазы в мембранах митохондрий печени крыс. Украин. биохим. журнал. 1988. Т.60. № 6. - С.22-28.
3. Алматов К.Т. Механизмы развития повреждений мембран митохондрий и роль липолитической системы. Автореф. докт. дис. 1990. –С.32.
4. Алматов К.Т. Ферментативные превращения фосфолипидов мембран митохондрий. Ташкент: Университет. 1993. –С.30.
5. Schneider W.C., Hageboom G.H. Cytochemical studies of mammalian tissues: The isolation of cell components ba differential centrifugation // Cancer Research., 1951. Vol. 11, N-4. P. 1-56.