

Влияние соединений кобальта на активность фосфолипазы D мембран митохондрий печени крыс при γ -облучении**Influence of connections of cobalt on activity phospholipase d membranes mitochondrion a liver of rats at and γ -irradiation**

Аннотация: Установлено, что при γ -облучении активность фосфолипазы D мембран митохондрий печени крыс значительно повышается. Соединения кобальта – Co_{102} (Транс- $Co(MemSCl)_3 \cdot 2H_2O$) и Co_{227} (Цис- $Co(MtmSCl)_3 \cdot 4H_2O$) являются ингибиторами каталитической активности фосфолипазы D мембран митохондрий печени облученных животных.

Abstract: It is established, that at and γ -irradiation activity phospholipase D membranes mitochondrion a liver of rats considerably raises. Connections of cobalt- Co_{102} (Trans- $Co(MemSCl)_3 \cdot 2H_2O$) and Co_{227} (cis- $(MtmSCl)_3 \cdot 4H_2O$) are inhibition catalytic activity phospholipase D membranes mitochondrion a liver of the irradiated animals.

Ключевые слова: ФЛ D - фосфолипаза D, ФХ - фосфатидилхолин, Мх - митохондрия, ЭТ-этаналамин, Х - холин, Фл - фосфолипид, ФК - фосфотидная кислота.

Key words: FLD - phospholipase D, FX - phosphatidylcholine, Mx- mitochondri, ET - Etonolaniny, X - holiny, FL- phospholipidy, FK-phosphatidic acid.

Существование фосфолипазы D в митохондриях печени было доказано в конце 80-х годов [1, 2]. Фермент проявлял максимальную активность при pH 5 и 7. Фермент более специфичен к фосфатидилэтаноламину как субстрату, чем к фосфатидилхолину [1, 3]. Фосфолипаза D мембран митохондрии печени помимо гидролиза фосфолипидов способна катализировать реакции трансфосфатидилирования [3, 4]. Было установлено, что трансферазному действию фермента в большей степени подвержен фосфатидилхолин. На основании полученных результатов авторы сделали вывод, что фосфолипиды мембран митохондрий значительно модифицируются под действием эндогенной фосфолипазы D. Такая модификация может приводить к изменению структурной организации мембран, которая в свою очередь влияет на многие мембранные процессы.

При активации фосфолипазы D стимулируется гидролиз фосфолипидов с образованием фосфатидной кислоты, который в свою очередь ведет к формированию в мембранах небислойных структур типа обращенных мицелл, что приводит к нарушению целостности мембраны, формированию каналов проницаемости [5-7]. Возможно, способность фосфатидной кислоты транспортировать через искусственные мембраны Ca^{2+} с эффективностью, близкой к действию кальциевого ионофора, вызвано такой модификацией структуры липидного бислоя. Кроме того, фосфатидная кислота в присутствии Ca^{2+} индуцирует фазовое разделение: переход из жидко-кристаллического состояния в гелевое [8, 9]. Трансферазная активность этого фермента приводит к замене полярных участков молекул фосфолипидов, что может вызывать локальные изменения зарядов на мембране [10].

Задачей дальнейшего исследования явилось изучение гидролитической активности фосфолипазы D мембран митохондрий печени при γ -облучении (на 4 сутки эксперимента) до и после введения в организм животных соединений Соши €0227-.

Исследования проводилось 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 ^{60}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 [11], 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.

Гидролитическую активность митохондриальной фосфолипазы Д определяли по образованию холина, этаноламина, фосфатидной и лизофосфатидной кислоты в ходе инкубации при 37°C в течение 1 часа при рН 7,0. В качестве контроля использовались сведения о содержании холина, этаноламина, фосфатидной и лизофосфатидной кислот в инкубационной смеси до инкубации. Степень гидролиза фосфолипидов под действием фосфолипазы Д определяли по накоплению холина, этаноламина, фосфатидной и лизофосфатидной кислот, экстрагируя фосфолипиды по мере гидролиза [1, 4] и разделяя их с помощью одномерной микротонкослойной хроматографии [12] в системе растворителей хлороформ - метанол - вода (65:25:4). Количество фосфолипидов определяли по фосфору. Удельную активность фосфолипазы Д выражали в мкг/час мг белка.

При γ -облучении в митохондриях печени гидролитическая активность фосфолипазы Д повышается в 3,06 раза от уровня нормы (табл.1).

Таблица. 1 – Влияние препаратов кобальта на активность фосфолипазы Д мембран митохондрий печени крыс после γ -облучения ($M \pm m$; $n = 10-12$).

Варианты	Активность фосфолипазы Д, мкг/час мг белка		
	Продукты гидролиза		
	Фосфатидная кислота	Этаноламин	Холин
Здоровые животные	11,75±1,06	1,35±0,15	0,39±0,08
Облученные животные: контроль	35,93±4,46	3,97±0,97	1,22±0,36
%	305,8	294,5	312,6
Со Ю2	16,35±2,22	1,92±0,46	0,51±0,14
%	139,2	142,6	131,4
С0227	23,05±1,78	2,62±0,34	0,82±0,12
%	196,2	194,2	211,0

В этих условиях эксперимента активность фермента по гидролизу фосфатидилхолина повышается в 3,13 раза, а по гидролизу фосфатидилэтаноламина - в 2,94 раза. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при облучении активность фосфолипазы Д мембран митохондрии печени значительно повышается.

Соединения кобальта ингибируют активность фосфолипазы Д мембран митохондрий печени облученных животных. Однако полной нормализации не наблюдается. Так, если активность фермента в митохондриях печени облученных животных по образованию фосфатидной кислоты, этаноламина и холина повышается соответственно в 3,06; 2,94 и 3,13 раза, то после введения в организм этих животных Co_{102} всего лишь в 1,3У; 1,43 и 1,31 раза от уровня нормы, а после введение Co_{227} - в 1,96; 1,94 и 2,11 раза. Это означает, что по сравнению с Co_{227} Co_{102} более эффективно ингибирует активность фосфолипазы Д мембран митохондрий печени облученных животных.

Таким образом, соединения кобальта – Co_{102} (Транс- $Co(MemSCl)_3 \cdot 2H_2O$) и Co_{227} (Цис- $Co(MtmSCl)_3 \cdot 4H_2O$) являются ингибиторами каталитической активности фосфолипазы Д мембран митохондрий печени облученных животных.

Литература:

1. Обнаружение фосфолипазы Д в митохондриях печени крыс [Текст] / [К. Т. Алматов, О. Н. Горбатая, Н. И. Ходжаева и др.] // Украин. биохим. журнал. – Киев, 1987. – Т. 59. - № 4. – С. 93-96.
2. Мирталипов Д.Т. Фосфолипиды мембран митохондрий печени при аллоксановом диабете и роль эндогенных липолитических ферментов в их модификации/канд.биол.наук. Ташкент. 1990. –С.139 .
3. Алматов К.Т. Механизмы развития повреждений мембран митохондрий и роль липолитической системы. Автореф. докт. дне. 1990. –С.32.
4. Рахимов ММ., Горбатая О.Н., Алматов К.Т. Свойства фосфолипид Д митохондрий печени крыс//биохимия. 1989. Т. 54.вып.7. -С. 1066-1074.
5. Cullis P.R., de Kruijff B. Lipid polymorphism and the functional riles of lipids in biological membranes//Biochim. Bioptys. Asia, 1979. V. 559. N 3. P. 399-420.
6. Verkleji A.J., de Maard R., Leunissen-Bijvelt Y., De Kruiff B. Divalent cations and chlorpromasine can induce non-bilayer structures in phosphatidic acid-containing model membranes //Biochim. Biophys. Asia. 1982. Vol. 684. -№ 2. P. 255-282.
7. Шрагин А.С., Василенко И.А., Селищева Л.А., Швец В.И. Влияние метаболитов фосфолипидов на слияние модельных мембран различного состава /I Биол.мембраны. 1985. Т. 2.-№8. -С. 798- 794.
8. Borovjagin V.L., Vergara J.A., Me. Indoch Th. I. Morphology of the intecmediate stages in lamellar to hexagonal lipid transition /I J. memb. Biol, 1982. Vol. 69. P. 199-211.
9. Burt Y.M., Rich T.L., Longer G.A. Phospholipase D increases cell surface Ca^{2+} binding and positive entry in rat heart /I Amer. J. physiol, 1984. Vol. 247. N-5. P. 880-885.