

УДК 577.152.3

Н. М. ЛИТВИНКО, Л. А. СКОРОСТЕЦКАЯ, Д. О. ГЕРЛОВСКИЙ

**ВЛИЯНИЕ N(ФОСФОНОМЕТИЛ)-ГЛИЦИНА
НА ФОСФОЛИПОЛИТИЧЕСКУЮ РЕАКЦИЮ С УЧАСТИЕМ ФОСФОЛИПАЗЫ A₂**

Институт биоорганической химии НАН Беларуси

(Поступила в редакцию 11.05.2015)

Введение. Фосфолиполитические реакции играют основополагающую роль в метаболизме липидов. Они происходят на границе раздела фаз «липид–вода» под действием ряда специфических гидролаз (фосфолипазы A₁, A₂, B, C, D), которые осуществляют межфазный катализ и обеспечивают обновление биологических мембран, сохранение их барьерной функции, передачу внешних сигналов на «внутренний язык» клетки [1].

Панкреатическая фосфолипаза A₂ (КФ 3.1.1.4, группа IB, ФЛА₂^{*}) – фермент, который в процессе пищеварения расщепляет фосфолипиды (фосфолиполиз) с образованием жирных кислот и лизолипидов [1]. При образовании пищевого химуса происходит эмульгирование пищи желчными кислотами, в процессе которого панкреатическая ФЛА₂ гидролизует фосфолипиды. Поэтому данная секреторная ФЛА₂, выделяемая из поджелудочной железы в просвет двенадцатиперстной кишки, в первую очередь становится мишенью для ксенобиотиков, поступающих с пищей, в том числе в остаточных количествах и пестицидов, которые, накапливаясь выше допустимых норм, могут оказывать негативное действие.

N(фосфонометил)-глицин (глифосат), относящийся к химическому классу фосфоноглицинов, является действующим веществом гербицида неизбирательного действия «Шквал». Этот гербицид, как и его глифосатсодержащие аналоги (Глиалка, Глифоган, Глисол, Раундап, Ураган, Пилараунд и др.), широко используются во всем мире для борьбы с сорной растительностью [2] не только на сельскохозяйственных полях, но и для обработки газонов, пешеходных дорожек, цоколей жилых домов, приствольных кругов вокруг плодовых деревьев и кустарников, придорожных полос и канав, а также при опрыскивании посевов зерновых культур (ячменя, ржи, пшеницы) за две недели до уборки для подсушивания зерна. В процессе обработки сельскохозяйственных культур [2] или при наличии N(фосфонометил)-глицина и его метаболитов в пищевых продуктах [3] млекопитающие и человек могут подвергаться воздействию этого пестицида.

Работы, посвященные изучению влияния пестицидов на активность фосфолипаз, практически отсутствуют. Среди пестицидов только параоксон, относящийся к классу органофосфатов и имеющий в структуре молекулы циклический нитрофенильный и фосфатный фрагменты, исследован по отношению к активности ФЛА₂ [4].

Полагают, что глифосатсодержащие пестициды менее токсичны для экологических систем по сравнению с действующими веществами других пестицидов [5]. Мишенью действия N(фосфонометил)-глицина и нескольких классов других гербицидов являются некоторые ферменты [6, 7], изменение активности которых используют для тестирования их негативного действия. Так, под действием пестицида Раундапа (действующее вещество – N(фосфонометил)-глицин) при концентрациях в 10–100 раз более низких, чем рекомендованные к применению в сельском хозяйстве, происходит ингибирование активности ароматазы – фермента, ответственного

* Принятые сокращения: ФЛА₂ – фосфолипаза A₂, ФХ – фосфатидилхолин, лизоФХ – лизофосфатидилхолин, ДОХ – дезоксихолат натрия, ТСХ – тонкослойная хроматография, K_i – константа ингибирования, MetHb – метгемоглобин.

за необратимую конверсию андрогенов в эстрогены. Это приводит к нарушению многих жизненно важных метаболических процессов, таких как репродукция, половая дифференциация, рост костей, клеточный цикл у морских ежей [8, 9]. При этом оказываемый неблагоприятный эффект имеет тенденцию со временем усиливаться [8, 9]. По нашим предварительным данным, *N*(фосфонометил)-глицин также оказывал влияние на активность панкреатической ФЛА₂ и течение фосфолиполиза [10]. Нами ранее на примере тралкоксидима (действующего вещества пестицида Грасп) и ряда его метаболитов, относящихся к производным 1,3-циклогександиона, с использованием разделения продуктов ферментативного гидролиза фосфолипидов с помощью ТСХ показана перспективность применения фосфолиполитических реакций как модели для предварительной оценки безопасности пестицидов [11–13].

Количественная характеристика эффекта *N*(фосфонометил)-глицина – орнанофосфата, имеющего функциональную группу, входящую в структуру субстрата фосфолипаз, на не исследованный в этом отношении фосфолиполиз, нарушения которого приводят к патологическим процессам, таким как острый некротический панкреатит, ревматоидный артрит, ишемия миокарда и другие болезни, представляет особый интерес [14].

Цель работы – количественная характеристика эффекта *N*(фосфонометил)-глицина на фосфолиполиз в условиях, имитирующих естественные, в качестве обоснованного выбора липолитической реакции для предварительной оценки в модельной системе безопасных доз ксенобиотиков на примере разных пестицидов.

Экспериментальная часть. В работе использовали *N*(фосфонометил)-глицин – действующее вещество гербицида «Шквал» (Yang zhou Hioneer Chemical Co Ltd, Китай) без дополнительной очистки. Использовали секреторную ФЛА₂ поджелудочной железы свиньи («Sigma», США, Р 6534). Концентрацию ФЛА₂ определяли спектрофотометрически, используя коэффициент удельного поглощения ФЛА₂ (280 нм) $A_{1\text{ см}}^{1\%} = 13,0$ [15].

В качестве субстрата применяли фосфатидилхолин (ФХ), который выделяли из яичного желтка с помощью метода флэш-хроматографии на силикагеле (система растворителей – хлороформ : метанол : вода (65:25:4), $R_f = 0,35$) [16]. Определение степени окисления препаратов фосфолипида производили с использованием соотношения оптической плотности раствора препарата в этаноле при двух длинах волн 233 и 215 нм, что позволило определить степень окисления ФХ, исходя из того, что 0,1% окисленных продуктов соответствует соотношению оптических плотностей, равному 0,07 [16]. В наших экспериментах степень окисления фосфолипидов в мицеллярной (смешанные мицеллы с детергентами) и ламеллярной (липосомы) фазах является вполне допустимой, поскольку не превышает 1,3%.

Индикатором фосфолиполиза служил гемоглобин человека («Sigma», США) с содержанием метгемоглобина (*MetHb*) соответственно техническим характеристикам (не менее 80%) в 0,05 М трис-НСl буфере, рН 8,0, в концентрации 100 мкМ по гему. Предварительно гемопротеид подвергали набуханию в течение 2–3 ч и центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин. Концентрацию *MetHb* определяли при использовании коэффициента молярной экстинкции ($\epsilon_{406\text{ нм}}$) $162\,000\text{ М}^{-1}\text{ см}^{-1}$, исходя из расчета, что при растворении 1 мг сухого порошка *MetHb* его ожидаемая концентрация с учетом разведения в 20–40 раз супернатанта должна быть 28 нмоль/мл по гему. Органические растворители хлороформ и метанол перед употреблением очищали перегонкой. Для приготовления трис-НСl буфера, рН 8,0 использовали аммониевую соль Триса («Serva», Германия).

Смешанные мицеллы готовили добавлением водного раствора дезоксихолата натрия (ДОХ, 48 мМ) к пленке фосфолипида (108 мкмоль/мл хлороформа), образовавшейся после выпаривания растворителя на роторном испарителе, интенсивно перемешивали и с целью достижения расчетной концентрации добавляли буферный раствор (0,05 М трис-НСl, рН 8,0) [11].

Применяемая аппаратура – роторный испаритель, вакуумный насос, спектрофотометры «Specord UV-VIS» (Германия), и «Solar» PV 1251 С (Республика Беларусь).

Фосфолиполиз в системе ФЛА₂ – мицеллы ФХ-*MetHb*. Фосфолиполиз проводили при рН 8,0, температуре 37 °С с использованием субстрата в виде мицелл с желчной кислотой ДОХ в оптимальном соотношении (1:3, моль/моль), что обеспечивало условия, близкие к деградации фосфолипидов под действием панкреатической ФЛА₂ в двенадцатиперстной кишке. Смешанные мицеллы

выдерживали в холодильнике 1–2 ч до окончательного просветления, что обеспечивало полную гомогенность и прозрачность реакционной смеси. Определение активности ФЛА₂ осуществляли с использованием спектральных изменений *MetHb*, как индикатора реакции, при его превращении в гемихром под действием отщепившейся при гидролизе липида жирной кислоты [17].

Реакционную смесь, содержащую 0,05 М трис-НСl буферный раствор (рН 8,0), 0,1 М СаСl₂ (конечная концентрация 1 мМ), *MetHb* (конечная концентрации 5·10⁻⁶ М), смешанные мицеллы ФХ (0,1 мкмоль ФХ на 1 мл мицелл) с желчной кислотой ДОХ (2%-ный раствор), перемешивали, разливали в две пары сухих кювет с длиной оптического пути 1 см. Проводили предварительную инкубацию реакционной смеси 5 мин при 20 или 37 °С в термостатируемых кюветах спектрофотометра «Specord UV-VIS» (Германия) или «Solar» PV 1251 С (Республика Беларусь), что обеспечивало полную гомогенность реакционной среды. Реакцию начинали добавлением в опытную кювету с помощью микрошприца раствора ФЛА₂ (2 мкг). Количество ФЛА₂ подбирали в предварительном эксперименте таким образом, чтобы линейный участок кинетической кривой располагался в интервале 3–4 мин от начала реакции. Исследование действия глифосата на активность ФЛА₂ проводили после преинкубации этого фермента с эффектором в течение 60 мин.

Регистрация разностных спектров MetHb в контрольной пробе без эффекторов. До начала реакции записывали «нулевую» линию в режиме пропускания «Specord UV-VIS» (регистр 75–125%, от 390 до 450 нм). После добавления в кювету ФЛА₂ следили за образованием продукта реакции по увеличению во времени суммарной величины интенсивности поглощения между максимумом ($\lambda = 423$ нм) и минимумом ($\lambda = 405$ нм) в разностном спектре *MetHb*, его амплитуды, $\Delta D = D_1 + D_2$, в режиме пропускания (Т, 75–125%) в диапазоне длин волн 360–450 нм [18]. Спектры регистрировали каждые 30 с в течение 3–8 мин.

Регистрация разностных спектров MetHb в опытной пробе с эффектором. Предварительную инкубацию реакционной смеси проводили в течение 5 мин в термостатируемых кюветах спектрофотометра «Specord UV-VIS» (Германия) или «Solar» PV 1251 С (Республика Беларусь). Записывали «нулевую» линию. Добавляли в кюветы расчетное количество раствора эффектора, инкубировали в течение 4 мин и записывали спектр *MetHb*. Реакцию начинали добавлением в опытную кювету с помощью микрошприца раствора ФЛА₂ (2 мкг). Изменение спектральных характеристик *MetHb* регистрировали каждые 30 с в течение 3–8 мин.

Повторные эксперименты проводили таким же образом с использованием другого препарата смешанных мицелл субстрата в обратной последовательности: сначала опытная, потом контрольная реакции. Пересчет единиц пропускания ΔT в единицы поглощения ΔD осуществляли по формуле: $\Delta D = 2 - \lg(100\% - \Delta T/3)$.

Для определения торможения или активирования ФЛА₂ под действием определяемого эффектора строили кривые зависимости ΔD от Δt (первичный график). О степени влияния эффектора судили по изменению начальной скорости реакции, как величины тангенса угла наклона кинетической кривой фосфолипидной реакции $\Delta D/\Delta t$ в присутствии *N*(фосфонометил)-глицина по сравнению с контролем [19]:

$$\text{активность ФЛА}_2 = \frac{\frac{\Delta D_{\text{опыт}}}{\Delta t}}{\frac{\Delta D_{\text{контроль}}}{\Delta t}} \times 100\% = \frac{\text{tg } \alpha_{\text{опыт}}}{\text{tg } \alpha_{\text{контроль}}} \times 100\%.$$

Фосфолипоз в системе ФЛА₂ – липосомы ФХ. *Приготовление липосом фосфолипида.* В случае формирования ламеллярной фазы субстрата (липосомы) получали пленку фосфолипида из его раствора в хлороформе (исходная концентрация 108 мкмоль/мл) с применением роторного испарителя и вакуумного насоса. Отбирали необходимое количество липида и выпаривали растворитель. Удаляли остаточное количество растворителя, затем добавляли буферный раствор (0,05 М трис-НСl, рН 8) при 37 °С и интенсивно перемешивали. Для получения малых однослойных везикул полученные многослойные везикулы подвергали действию ультразвука с использованием диспергатора «УЗДН-2Т» (22 кГц, 20 МА): 5 раз по 0,5 мин с перерывом в 1 мин [20]. *N*(фосфонометил)- глицин использовали в виде водного раствора.

Приготовление реакционной смеси и проведение фосфолиполиза в ламеллярной фазе с использованием реактива Васьковского. К раствору субстрата, находящегося в составе ламеллярной фазы, добавляли раствор CaCl_2 , чтобы конечная концентрация составляла 2 мМ. Реакцию фосфолиполиза начинали добавлением ФЛА₂ (10 мкг/мл, 0,71 нМ). Пробы, содержащие 0,15 мкмоль фосфолипида, отбирали через установленные промежутки времени (2, 5, 10, 20, 30, 60 мин). Для остановки реакции использовали трехкратный избыток ЭДТА в сравнении с концентрацией ионов кальция в пробе. Экстракцию продуктов реакции и не прореагировавшего субстрата проводили двукратным объемом смеси хлороформ : метанол (соотношение по объему 2:1) по Фолчу [21]. Для полного разделения пробы центрифугировали при 1500 об/мин 10 мин, хлороформный слой отделяли, выпаривали и разделяли лизофосфолипид (продукт реакции) и не прореагировавший фосфолипид с помощью ТСХ, используя следующую систему растворителей: хлороформ : метанол : вода (соотношение по объему 65:25:4). На хроматограммах фосфолипиды проявляли реагентом Васьковского, который позволяет с высокой точностью [22] по эквивалентному содержанию неорганического фосфора определять количество фосфолипида в пробах. Окрашенные зоны лизолипида и липида вырезали, переносили в пробирки, минерализовали добавлением 0,3 мл 72% HClO_4 и в течение 20 мин при 180 °С прокаливали на песчаной бане.

Активность ФЛА₂ характеризовали по степени гидролиза субстрата, как отношение количества образованного лизоФХ к сумме непрогидролизованного субстрата и продукта (%). Скорость реакции выражается в количестве образованного продукта (мкмоль) в мин на мг белка.

Исследование кинетики фосфолиполиза. Для количественной характеристики процесса фосфолиполиза во времени в сравнительно простых условиях (фермент, кофактор, мицеллярный субстрат и эффектор) в отсутствие и в присутствии *N*(фосфонометил)-глицина использовали величину скорости реакции V и V_p , мкмоль · мин⁻¹ · мг⁻¹, величины констант связывания с поверхностью раздела «липид–вода» K_s и K_{si} , величины констант Михаэлиса K_m и K_{mi} , эффективную величину константы ингибирования K_i , мкМ. Кинетические исследования липолитических реакций выполняли в рамках двухкомпонентной модели, предложенной Деннисом и сотрудниками для гидролиза смешанных мицелл растворимых короткоцепочечных фосфолипидов с детергентами [23], в модификации, разработанной в нашей лаборатории для природных фосфолипидов [24], в соответствии с классическими рекомендациями по изучению кинетики ферментативных реакций [25]. Показано, что величины K_i адекватно отражают эффективность ингибиторов, меняются в широких пределах от нескольких до сотен мкМ и сильно зависят от типа и супрамолекулярной организации субстрата, а также химической структуры ингибитора [26]. Сравнение параметров реакции V , V_p , K_s , K_{si} , K_m , K_{mi} , K_i позволяет определить тип и механизм ингибирования, а также обосновать возможный путь регуляции ферментативного гидролиза фосфолипидов.

Для определения типа ингибирования строили кривые зависимости V_0 от начальной концентрации субстрата (B) в составе мицеллярной фазы (A – смешанная мицелла, включающая субстрат – B и детергент) в двойных обратных координатах (метод Лайнуивера – Берка) [23]. Каждую точку на первичных графиках кинетической зависимости $1/V$ от $1/A$ определяли на основе скорости реакции, соответствующей прямолинейному участку графика зависимости степени гидролиза субстрата под действием ФЛА₂ от продолжительности реакции, предварительно построенного не менее чем в двух повторениях.

Результаты исследований и их обсуждение. Определение активности фосфолипаз и количественная характеристика фосфолиполитических реакций, в том числе в присутствии эффекторов различного химического строения, как правило, затруднены в связи с нерастворимостью субстрата, поэтому традиционные методы, в том числе с использованием ТСХ, отличаются трудоемкостью, многостадийностью и длительностью проведения эксперимента [27].

Потребность в быстрой предварительной оценке биобезопасности пестицидов для пищеварения, в особенности переваривания фосфолипидов, как преобладающей составляющей клеточных мембран, обуславливает целесообразность изучения фосфолиполиза в условиях воздействия *N*(фосфонометил)-глицина с использованием более чувствительного метода определения активности панкреатической ФЛА₂ на основе спектральных изменений гемоглобина [28]. В качестве индикатора ферментативного разрушения фосфолипидов используется известная реакции пре-

вращения гемоглобина (*Hb*) в гемихром под действием отщепившейся при гидролизе фосфолипида жирной кислоты [29] с возникновением характерного разностного спектра при $\lambda = 423$ нм и минимума при $\lambda = 405$ нм, что обеспечивает надежный и быстрый спектрофотометрический мониторинг процесса фосфолиполиза [17].

Проведение фосфолиполиза в системе ФЛА₂ – мицеллы ФХ – *MetHb* в условиях, близких к деградации фосфолипидов под действием панкреатической ФЛА₂ в двенадцатиперстной кишке (37 °С, Ca²⁺, мицеллы яичного ФХ с желчной кислотой дезоксихолатом натрия в оптимальном соотношении 1:3, рН 8,0) в присутствии *N*(фосфонометил)-глицина в предельно допустимой дозе 100 мкг/мл [30], обнаруживает ингибирование фосфолиполиза.

На рис. 1, *a* представлен типичный спектр индикатора реакции *MetHb*, регистрируемый под действием продуктов фосфолиполитической реакции с участием ФЛА₂ в присутствии *N*(фосфонометил)-глицина (1) и без ингибитора (2). Характерный пик с минимумом поглощения при 405 нм и максимумом при 423 нм свидетельствует о появлении в реакционной среде жирной кислоты, отщепившейся в результате фосфолиполиза экзогенного субстрата.

Отсутствие изменений в амплитуде разностного спектра *MetHb* под действием экзогенно добавленной жирной кислоты в присутствии *N*(фосфонометил)-глицина и без него (рис. 1, *б*) убеждает в отсутствии какого-нибудь влияния этого ингибитора в концентрации 100 мкг/мл на спектры перехода метгемоглобина в гемихром.

На рис. 1, *в* показаны кинетические кривые накопления продукта ферментативного гидролиза ФХ в терминах суммарной интенсивности поглощения между максимумом и минимумом в разностном спектре метгемоглобина $\Delta D = D_1 + D_2$. Как видим, кинетика фосфолиполиза характеризуется линейной зависимостью в полном соответствии с ранее полученными данными о том, что изменение интенсивности между максимумом и минимумом в разностном спектре метгемоглобина растет пропорционально количеству жирной кислоты, образующейся в результате ферментативной реакции с участием ФЛА₂ яда кобры [17].

Снижение амплитуды разностного спектра *MetHb* (рис. 1, *a*) и уменьшение тангенса угла наклона кинетической кривой реакции, катализируемой ФЛА₂, в присутствии *N*(фосфонометил)-глицина (рис. 1, *в*) указывает на его ингибирующий эффект по отношению к фосфолиполизу.

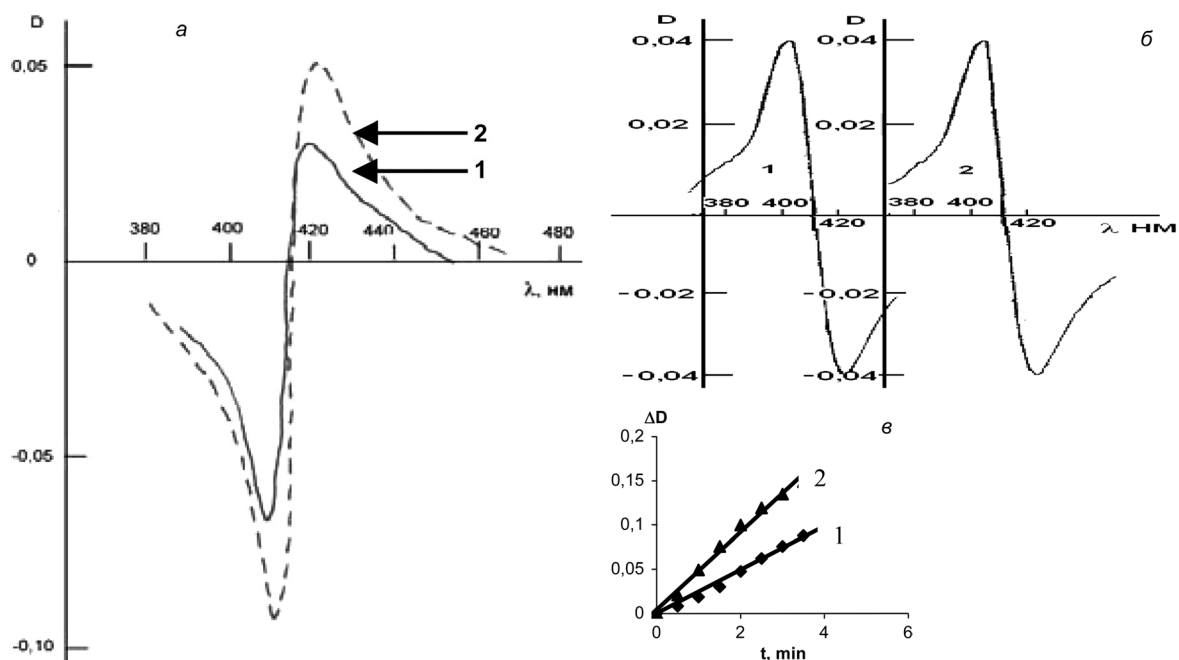


Рис. 1. Разностные спектры поглощения метгемоглобина при его переходе в гемихром под действием жирной кислоты: *a* – зарегистрированные при проведении фосфолипазной реакции в отсутствие (2) и в присутствии *N*(фосфонометил)-глицина 100 мкг/мл (1); *б* – в отсутствие *N*(фосфонометил)-глицина (2) и при его присутствии (1); *в* – изменение величины ΔD во времени в ходе фосфолипазной реакции в присутствии *N*(фосфонометил)-глицина (1) 140 мкг/мл и без него (2)

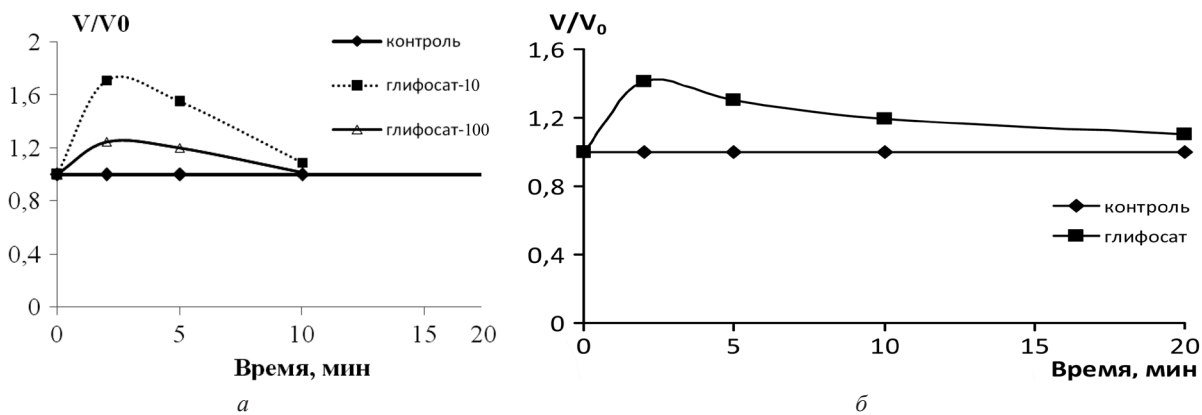


Рис. 2. Относительная скорость гидролиза ФХ в составе мицеллярной фазы, сформированной ДОХ, под действием ФЛА₂ в присутствии N(фосфонометил)-глицина, измеренная: *a* – по накоплению жирной кислоты с использованием спектральных изменений метгемоглобина, *б* – по накоплению лизофосфатидилхолина с использованием разделения продуктов ферментативного гидролиза фосфолипидов с помощью ТСХ

Это объясняется структурой молекулы N(фосфонометил)- глицина, которая частично имитирует молекулу субстрата (ФХ), поскольку включает ионизированную фосфатную группу и положительно заряженную аминогруппу. Ранее нами показано, что преинкубация ФЛА₂ с фосфатсодержащими фрагментами субстрата и глицина приводит к существенному торможению фосфолиполиза липопротеинового комплекса яичного желтка: α- и β-глицерофосфаты (ингибирование 60 и 76% соответственно), фосфохолин (74%), глицин (34%) [31].

Представляет интерес изучение относительной скорости фосфолиполитической реакции в зависимости от концентрации ингибитора, так как нами в предварительных экспериментах было установлено разнонаправленное (активация, ингибирование) действие N(фосфонометил)-глицина на активность ФЛА₂ в зависимости от выбранной концентрации эффектора (22 и 100 мкг/мл) [10, 24].

На рис. 2, *a* показано действие различных концентраций N(фосфонометил)-глицина на скорость фосфолиполитической реакции в условиях гидролиза ФХ/ДОХ-мицелл, определяемой для каждой дозы эффектора, исходя из графиков, аналогичных представленным на рис. 1, *в* (первичный график): по изменению тангенса угла наклона кинетической кривой $\Delta D/\Delta t$ (*V*) при взаимодействии отщепившейся жирной кислоты с *MetHb* в присутствии ингибитора по сравнению с тем же показателем без пестицида (*V*₀) в интервале до 10 мин (вторичный график). Аналогичный профиль кривой изменения относительной скорости реакции во времени получен при идентификации другого продукта реакции – лизоФХ традиционным методом с помощью ТСХ (рис. 2, *б*). В этом случае скорость реакции выражается в количестве мкмоль лизоФХ, образовавшегося в минуту на 1 мг белка. Проведенные исследования обнаруживают, что в интервале концентраций от 1 до 1000 мкг эффектора/мл реакционной смеси влияние N(фосфонометил)-глицина на активность панкреатической ФЛА₂ имеет дозозависимый характер. Активирование липолиза (15–30%) при концентрации (дозе) эффектора до 100 мкг/мл сменяется прогрессивным снижением относительной активности при концентрациях пестицида выше указанной концентрации ингибитора, снижаясь до 20–25% от исходной активности при дозе препарата 1000 мкг/мл (рис. 3). Полученные результаты показывают, что N(фосфонометил)-глицин даже в дозах заведомо меньших предельно допустимых (допустимая суточная доза N(фосфонометил)-глицина – 0,1 мг/кг массы тела человека [30]) способен существенно изменять скорость деградации ФХ под действием ФЛА₂ в условиях, имитирующих процесс пищеварения.

Установленное нами существенное изменение активности ФЛА₂ под действием N(фосфонометил)-глицина подтверждает литературные данные о влиянии фосфорорганического соединения пароксона на эти сериновые гидролазы [2]. Поскольку активность ФЛА₂ сильно зависит от супрамолекулярной организации субстрата, далее изучается действие N(фосфонометил)-глицина в пограничной концентрации (100 мкг/мл) на фосфолиполиз субстрата, организованного в бислойную структуру в виде липосом, которая моделирует клеточную стенку.

Скорость реакции гидролиза фосфатидилхолина в ламеллярной фазе (липосомы), измеренная в присутствии N(фосфонометил)-глицина в концентрации 100 мкг/мл по образованию лизоФХ

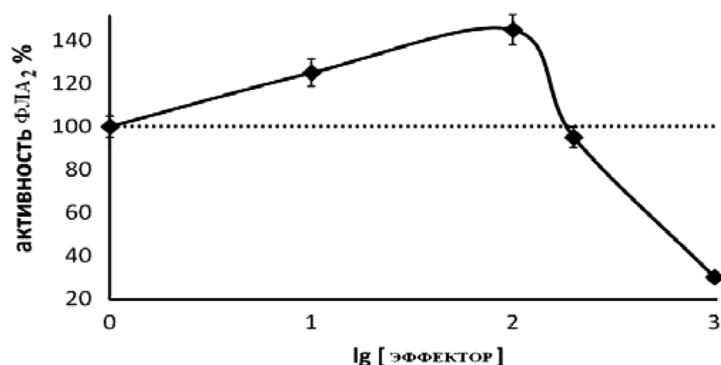


Рис. 3. Влияние концентрации N(фосфонометил)-глицина на активность панкреатической ФЛА₂, измеренной по спектральным изменениям метгемоглобина под действием отщепленной жирной кислоты

в результате разделения ТСХ продуктов фосфолиполиза (табл. 1), так же как и в мицеллярной фазе (рис. 2, б), превышает в 1,4–1,1 раза контрольные значения в исследуемом промежутке времени. Эти результаты полностью коррелируют с данными по действию N(фосфонометил)-глицина на активность ФЛА₂ при использовании гемоглобина как индикатора фосфолиполиза (рис. 3).

Т а б л и ц а 1. Скорость гидролиза ФХ в ламеллярной фазе (липосомы) в присутствии и в отсутствие соединения I (100 мкг/мл)

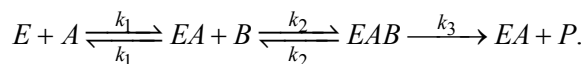
Время, мин	V, мкмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹	
	Контроль	N(фосфонометил)-глицин
2	14,0 ± 0,7*	19,8 ± 1
5	8,0 ± 1	10,5 ± 0,7
10	4,6 ± 0,8	5,5 ± 0,9
20	1,8 ± 0,9	2,0 ± 0,7

П р и м е ч а н и е. Каждый эксперимент проводился в 2–4 повторениях.

Обнаруженное альтернативными способами инициирующее действие на активность ФЛА₂ фосфоросодержащего пестицида глифосата (N-(фосфонометил)-глицина) в дозе 100 мкг/мл в условиях, имитирующих процесс пищеварения, подтверждает перспективность модели определения безопасности гербицидов на основе фосфолиполиза и применения для этого гемоглобинового метода.

Как видно из зависимости «доза–эффект», представленной на рис. 3, превышение допустимой для человека концентрации N(фосфонометил)-глицина более чем в два раза вызывает значительное снижение активности фермента, что определяет целесообразность выяснения типа ингибирования ФЛА₂ на основе анализа изменения кинетических характеристик процесса фосфолиполиза в присутствии и в отсутствие N(фосфонометил)-глицина в концентрации 0,5 мМ, которая превышает допустимую суточную дозу глифосата более чем в 5 раз. Установлено, что максимально допустимым безопасным уровнем глифосата в пищевых культурах является концентрация от 0,1 мг/кг (виноград, масло подсолнечника) до 0,3 мг/кг (плодовые, цитрусовые, подсолнечник, зерно хлебных злаков, овощи, картофель, кукуруза) [30].

ФЛА₂ относится к ферментам, осуществляющим межфазный катализ. Поэтому липолитическая реакция, катализируемая ФЛА₂, характеризуется двумя константами: константой равновесия образования комплекса фермент-поверхность раздела фаз (K_s) и константой Михаэлиса (K_M) [23]. Используемая для расчета кинетических констант модель Денниса [32], представленная на нижеприведенной схеме, включала в себя: 1) связывание растворимого в воде фермента (E) с межфазной мицеллярной поверхностью (A – смешанная мицелла); 2) взаимодействие с фосфолипидами (B), входящими в состав мицелл; 3) каталитический гидролиз (P – продукты):



Таким образом, конкуренция между ингибитором и фосфолипидом (B) может идти за два пространственно разобщенных сайта связывания субстрата в молекуле фермента: с поверхностью раздела фаз (EAB) и каталитическим участком в активном центре фермента (E).

Для проведения данной работы формируются 4 серии мицелл, состоящих из ФХ и ДОХ при их разном соотношении (1:2, 1:5, 1:7 и 1:11), но в каждой серии с одинаковой суммарной концентрацией фосфолипида и детергента, что определяет конкретную долю липида ($B = 0,33, 0,167, 0,125, 0,083$) и обеспечивает изменение его концентрации в пределах межфазной поверхности (табл. 2, рис. 4). Такой подход позволяет создать условия для применения графического метода Лайнуивера-Берка и определения кинетических параметров липолитической реакции при использовании нерастворимого в воде природного субстрата, а не его растворимого короткоцепочечного аналога [30, 31].

Т а б л и ц а 2. Состав смешанных мицелл ФХ с ДОХ

A, мМ	1ФХ:2ДОХ, $B = 0,33$	1ФХ:5ДОХ, $B = 0,167$	1ФХ:7ДОХ, $B = 0,125$	1ФХ:11ДОХ, $B = 0,083$
12	4мМ + 8мМ	2мМ + 10мМ	1,5мМ + 10,5мМ	1мМ + 11мМ
9	3мМ + 6мМ	1,5мМ + 7,5мМ	1,1мМ + 7,87мМ	0,75мМ + 8,25мМ
6	2мМ + 4мМ	1мМ + 5мМ	0,75мМ + 5,25мМ	0,5мМ + 5,5мМ
3	1мМ + 2мМ	0,5мМ + 2,5мМ	0,375мМ + 2,6мМ	0,25мМ + 2,75мМ

П р и м е ч а н и е. A – общая концентрация липида и детергента, мМ; $B = \frac{P}{P+D}$, где P – концентрация фосфолипида, B – его мольная доля в межфазной поверхности.

Определение начальных скоростей реакций проводится при оптимальном времени (до 2 мин), соответствующем половине прямолинейного участка на кривой зависимости степени гидролиза субстрата под действием ФЛА₂ от продолжительности реакции с экстракцией продуктов липолиза через 2, 5, 10 и 30 мин (данные не приведены).

На рис. 4 *а, б* представлены данные по кинетике катализируемой ФЛА₂ реакции гидролиза ФХ в составе смешанных мицелл в соответствии с приведенной выше схемой при переменной величине $[A]$ и постоянной величине B . Удастся однозначно провести прямые линии через экспериментальные точки для 4 значений B (при соотношениях ФХ : ДОХ 1:2, 1:5, 1:7 и 1:11). Первые три прямые пересекаются в одной точке в левом квадранте графика. Малая доля ФХ ($B = 0,08$) в мицеллах при соотношении ФХ : ДОХ 1:11 и $[A]$, равном 3,0, не позволяет идентифицировать с помощью метода ТСХ продукты реакции и соответственно охарактеризовать ее скорость. Поэтому прямая для значений $1/V$ при соотношении ФХ : ДОХ 1:11 проводится таким образом, чтобы она проходила через экспериментальные точки при наибольших значениях $[A]$ (12,0, 9,0 и 6,0 мМ), которые удовлетворительно ложатся на прямую и общую точку пересечения (рис. 4).

Определение кинетических констант при начальных скоростях реакции осуществляется в системе, в которой концентрация фосфолипида в составе межфазной поверхности поддерживается постоянной ($[B] = \text{const}$), тогда как общая концентрация мицеллярных центров связывания ($[A]$) изменяется (рис. 4 *а, б*). Полная доступность для фермента всех молекул субстрата в мицеллярной фазе позволяет количественно охарактеризовать, как стадию связывания фермента с поверхностью раздела «липид–вода» (определение K_S , $K_S = \frac{k_{-1}}{k_1}$), так и каталитическую стадию (определение K_M , $K_i = \frac{k_{-2} + k_3}{k_2}$) и установить, на какой из них проявляется действие ингибитора (рис. 4, *в*).

Большой угол наклона кривых в двойных обратных координатах в присутствии N (фосфонометил)-глицина (рис. 4, *б*), чем без него (рис. 4, *а*), указывает на ингибирование фосфолипидолитической реакции. Как видно из положения кривых вторичной зависимости $1/(V)_B$ от $1/B$ (рис. 4, *в*), выведенной из зависимости $1/(V)_A$ от $1/A$, они пересекаются на оси ординат в одной точке, т. е. $V_{\max} = V_{\max} = 1 \cdot 10^3$ мкмоль·мин⁻¹·мг⁻¹, что убеждает в конкурентном типе ингибирования. Значения констант реакций в присутствии ингибитора ($K_{Si} = 20$ мМ, $K_i = 24$ мМ) и без него ($K_S = 20$ мМ), а также соотношение $K_{Mi}/K_M = 1,125$, полученные из положения точек пересечения кривых между собой и с осью абсцисс, подтверждают конкурентный характер действия N (фосфонометил)-глицина на фосфолиполилиз (рис. 4, *в*).

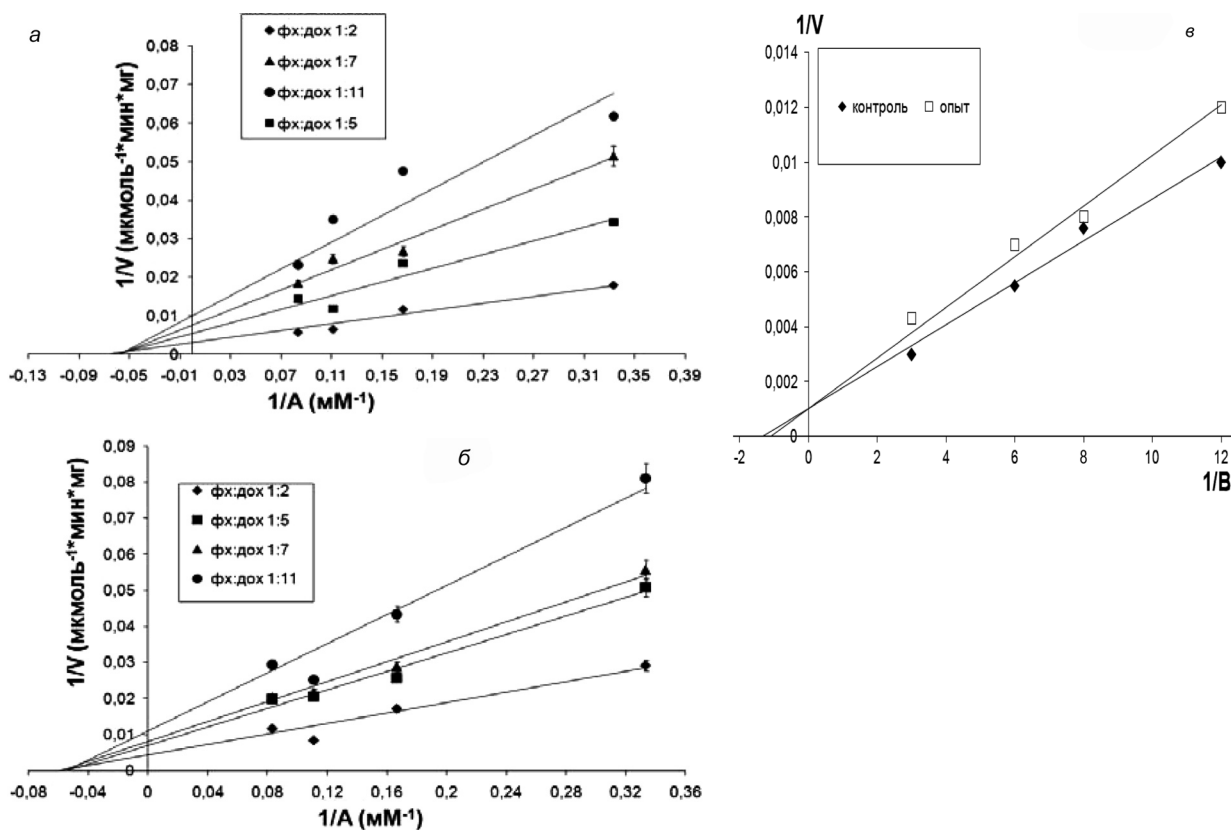


Рис. 4. Зависимость в двойных обратных координатах скорости гидролиза ФХ под действием ФЛА₂ (10 мкг/мл) от суммарной молярной концентрации ФХ и детергента при гидролизе смешанных мицелл ФХ : ДОХ в отсутствие (а) и в присутствии (б) 5 мМ N(фосфонометил)-глицина: A – общая концентрация фосфолипида и детергента в объеме, мМ) $B = \frac{P}{P + D}$, где B – мольная доля фосфолипида в межфазной поверхности, P – концентрация фосфолипида, D – концентрация детергента; в – зависимость в двойных обратных координатах скорости гидролиза ФХ ($1/V$) под действием ФЛА₂ (10 мкг/мл) от мольной доли липида в составе смешанных мицелл ФХ: ДОХ ($1/B$) в отсутствие (контроль) и в присутствии (опыт) 5 мМ N(фосфонометил)-глицина

Проведенное исследование с использованием модели, разработанной Деннисом с сотрудниками [32], обнаруживает отсутствие влияния данного ксенобиотика на стадию прикрепления ФЛА₂ к поверхности раздела фаз ($K_S = K_{Si}$).

Из изложенного выше следует, что фосфорорганическое соединение N(фосфонометил)-глицин способно в зависимости от концентрации (дозы) в разной степени оказывать влияние на активность не только своих молекулярных мишеней в организме растений [2], но и на ферменты фосфолиполиза человека и животных. В качестве механизма ингибирования активности ФЛА₂ в случае запредельных доз исследуемого гербицида можно предположить взаимодействие ионизированных групп N(фосфонометил)-глицина с соответствующими аминокислотными остатками в активном центре фермента, предназначенными для связывания ионизированных групп ФХ [33].

Количественная характеристика эффекта глифосата на фосфолиполиз в условиях, имитирующих естественные, в совокупности с результатами, полученными нами ранее при изучении действия циклогександионовых пестицидов и их метаболитов на гидролиз фосфолипидов [11, 20], доказывают, что экспресс-метод на основе использования *in vitro* фосфолиполитической реакции в качестве простой модели процесса разрушения фосфолипидов пищи и клеточных мембран перспективен в целях предварительной оценки безопасности для человека и животных широкого ассортимента средств защиты растений и имеет явные преимущества, поскольку не требует длительных испытаний на лабораторных животных [34, 35].

Литература

1. Литвинко Н. М. Активность фосфолипаз A_2 и С при биохимическом моделировании. Минск: Технопринт, 2003. 350 с.
2. Acquavella J., Bruce H., Alexander B., Mandel J., Gustin C., Baker B., Pamela Chapman P., Bleeke M. // 2004. Environ Health Perspect. Vol. 112, N 3. P. 321–326.
3. Takahashi M., Horie M., Aoba N. // Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 2001. Vol. 42. P. 304–308.
4. Petroianu G., Helfrich U., Globig S., Fisher J., Rufer R. // J. Chem Biol Interact. 1999. Vol. 119–120. P. 497–502.
5. Williams G., Kroes R., Munro I. // Regul. Toxicol. Pharmacol. 2000. Vol. 31. P. 117–165.
6. Lamb D., Kelly D., Hanley S., Mehmood Z., Kelly S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998. Vol. 244. P. 110–114.
7. Schonbrunn E., Eschenburg W., Shuttleworth W., Schloss J., Amrhein N., Evans J., Kabsch W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. Vol. 98. P. 1376–1380.
8. Marc J., Mulner-Lorillon O., Boulben S., Hureau D., Durand G., Bellé R. // Chem. Res. Toxicol. 2002. Vol. 15. P. 326–331.
9. Walsh L., McCormick C., Martin C., Stocco D. // Environ. Health. Perspect. 2000. Vol. 108. P. 769–776.
10. Герловский Д. О., Скоростецкая Л. А., Литвинко Н. М. // Химия, структура и функция биомолекул: Материалы III Международ. конф. Минск: Право и экономика, 2008. С. 235–236.
11. Лахвич Ф. А., Литвинко Н. М., Кучуро С. В., Скоростецкая Л. А., Рахуба Г. Н., Герловский Д. О., Рубинов Д. Б., Желдакова Т. А. // Докл. НАН Беларуси. 2008. Т. 52, № 1. С. 70–74.
12. Патент Республики Беларусь 2011. № 14325.
13. Патент Республики Беларусь 2011. № 14326.
14. Dennis E. A., Cao J., Hsu Yang-Hao, Magrioti V. // Chem. Rev. 2011. Vol. 11, N 10. P. 6130–6185.
15. Pieterse W. F., Volwerk J. J., Haas G. D. // Biochemistry. 1974. Vol. 13, N 1. P. 1446–1454.
16. Бергельсон Л. Д., Дятловицкая Э. В., Молотковский Ю. Г., Батраков С. Г., Барсуков Л. И., Проказова Н. В. *Препаративная биохимия липидов* / ред. Л. Д. Бергельсон и Э. В. Дятловицкая. М.: Наука, 1981. 260 с.
17. Litvinko N. M., Andreyuk G. M., Kisel M. A. // J. Faseb. 1997. Vol. 11, N 9 (C. A 1306). P. 2618–2623.
18. Литвинко Н. М., Камышников В. С., Скоростецкая Л. А., Герловский Д. О. // ARS Medica. 2011. № 13(49). С. 66–75.
19. Скоростецкая Л. А., Литвинко Н. М., Рубинов Д. Б., Желдакова Т. А. // Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии. Сб. науч. тр. Минск: Беларус. наука, 2008. С. 221–230.
20. Лахвич Ф. А., Литвинко Н. М., Скоростецкая Л. А., Кучуро С. В., Антончик Г. Н., Герловский Д. О., Огейко Н. Г., Петрусевиц И. И. // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. 2009. № 2. С. 77–81.
21. Folch J., Lees M., Stanley G. H. S. // J. Biochem. 1959. Vol. 5, N 1. P. 120–132.
22. Vaskovsky, V. E., Kostetsky E. Y. and Vasendin J. M. // Journal of Chromatography. 1975. Vol. 114, N 1. P. 129–141.
23. Deems R. A., Eaton B. R., Dennis E. A. // J. Biol. Chem. 1975. Vol. 250, N 23. P. 9013–9020.
24. Герловский Д. О., Литвинко Н. М. // Химия, структура и функция биомолекул. Тез. докл. IV Междунар. конф. Минск, 2012. С. 43.
25. Уэбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма / ред. В. А. Яковлева. М.: Мир, 1966. 730 с.
26. Брагина Н. А., Чупин В. В., Булгаков В. Г., Шальнев А. Н. // Биоорг. химия. 1999. Т. 25. С. 83–96.
27. Остапенко О. В., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12, № 11. С. 1445–1468.
28. Скоростецкая Л. А., Литвинко Н. М., Рубинов Д. Б., Желдакова Т. А. // Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии. Сб. науч. тр. Минск: Беларус. наука, 2008. С. 221–230.
29. Ахрем А. А., Андреев Г. М., Кисель М. А., Курбако В. З., Киселев П. А., // Биохимия. 1987. Т. 52, № 11. С. 1927–1934.
30. Белан С. Р., Грапов А. Ф., Мельникова Г. М. Новые пестициды: Справ. М.: Грааль, 2001. 195 с.
31. Litvinko N. M., Khurgin Yu. I., Kaverzneva E. D. // Biokhimiya. 1977. Vol. 42, N 1. P. 68–75.
32. Hendrickson H. S., Dennis E. A. // J. Biol. Chem. 1984. Vol. 259, N 9. P. 5740–5744.
33. Литвинко Н. М., Герловский Д. О. // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. 2012. № 2. С. 77–81.
34. Патент Евразийской патентной организации. 2012. № 017271.
35. Патент Евразийской патентной организации. 2013. № 017381.

N. M. LITVINKO, L. A. SKOROSTETSKAYA, D. O. GERLOWSKI

THE EFFECT OF N-(PHOSPHONOMETHYL)-GLYCINE ON PHOSPHOLYTIC REACTION CATALYSED BY PHOSPHOLIPASE A_2

Summary

The effect of N(phosphonomethyl)-glycine (glyphosate), the active ingredient of the «Squal» herbicide in a wide range of concentrations (1–1000 $\mu\text{g/ml}$) on phospholipolysis catalyzed by pancreatic phospholipase A_2 (PLA₂, 3.1.1.4), under the conditions similar to digestion in the duodenum (pH 8.0, temperature 37°C, micellar form PC), has been studied. It has been shown that a rapid method based on the use of *in vitro* phospholipolytic reaction as a simple model of the process of destruction of food and phospholipids of cell membranes, is promising for preliminary evaluation of the pesticide safety to humans and animals.