

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)

БИОАРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
BIOORGANIC CHEMISTRY

УДК 577.115.3+577.112.854
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-2-195-205>

Поступила в редакцию 11.03.2021
Received 11.03.2021

Н. М. Литвинко

Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

**ГИДРОЛИЗ УФ-ИНДУЦИРОВАННОГО ПЕРЕКИСНО-ОКИСЛЕННОГО
ФОСФАТИДИЛХОЛИНА ФОСФОЛИПАЗАМИ РАЗНОЙ
СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ**

Аннотация. Исследована активность фосфолипазы A_2 из панкреатической железы свиньи и яда кобры по отношению к фосфатидилхолину, имеющему разную надмолекулярную организацию и заряд межфазной поверхности (мицеллы с дезоксихолатом натрия и липосомы) в условиях УФ-облучения (180–400 нм). Показано, что УФ-облученная липидная фаза характеризуется увеличенным индексом окисления фосфатидилхолина и отсутствием в УФ-спектре докозагексаеновой кислоты пика с максимумом 235,5 нм, отражающем наличие непредельных связей, который сохраняется в присутствии антиоксиданта тролокса. Установлена активация обеих фосфолипаз A_2 после УФ-облучения субстрата независимо от его супрамолекулярной организации, заряда межфазной поверхности и субстратной специфичности ферментов. С помощью динамического рассеяния света в облученных мицеллах фосфатидилхолина обнаружено 0,3 % частиц большего размера. Полученные результаты указывают на то, что в облученной модельной мембране могут формироваться участки скопления гидропероксидированных липидов, которые служат местом усиленной атаки для фосфолипаз.

Ключевые слова: фосфолипаза A_2 панкреаса свиньи, фосфолипаза A_2 яда кобры, ПОЛ, мицеллы, липосомы, фосфатидилхолин

Для цитирования. Литвинко, Н. М. Гидролиз УФ-индуцированного перекисно-окисленного фосфатидилхолина фосфолипазами разной субстратной специфичности / Н. М. Литвинко // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2021. – Т. 57, № 2. – С. 195–205. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-2-195-205>

N. M. Litvinko

Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

**HYDROLYSIS OF UV-INDUCED PEROXIDIZED PHOSPHATIDYLCHOLINE INITIATED BY
PHOSPHOLIPASES OF DIFFERENT SUBSTRATE SPECIFICITIES**

Abstract. The activity of porcine pancreatic phospholipase A_2 and the same of cobra venom toward phosphatidylcholine having different supramolecular organization and interfacial charge (micelles with sodium deoxycholate and liposomes) under UV irradiation (180–400 nm) was studied. It was shown that the UV-irradiated lipid phase is characterized by an increased index of phosphatidylcholine oxidation and the absence of a peak with a maximum of 235.5 nm, related to the presence of unsaturated bonds in the UV spectrum of docosahexaenoic acid, but retained in the presence of the antioxidant trolox. The activation of both phospholipases A_2 after UV irradiation of the substrate was established, regardless of its supramolecular organization, the charge of the interfacial surface, and the substrate specificity of the enzymes. Using dynamic light scattering, 0.3 % of larger particles were found among the irradiated micelles of phosphatidylcholine. The results obtained indicate that areas of accumulation of hydroperoxidized lipids can be formed in the irradiated model membrane, which serve as a site of intensified attack for phospholipases.

Keywords: phospholipase A_2 of porcine pancreas, phospholipase A_2 of cobra venom, LPO, micelles, liposomes, phosphatidylcholine

For citation. Litvinko N. M. Hydrolysis of UV-induced peroxidized phosphatidylcholine initiated by phospholipases of different substrate specificities // *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2021, vol. 57, no. 2, pp. 195–205 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-2-195-205>

Введение. Самым характерным свойством ферментов, в том числе и семейства фосфолипаз A_2 (КФ 3.1.1.4, ФЛА₂), является субстратная специфичность, т. е. избирательность действия по отношению только к одному веществу (субстрату), определяемая как абсолютная специфичность, или очень небольшому числу близкородственных веществ (субстратов), характеризующаяся как групповая (относительная) специфичность, которая обычно выражается в каталитическом превращении субстрата при участии фермента с более высокими скоростями реакции по сравнению с другим субстратом (субстратами) [1].

Очень многие ферменты обладают высокой степенью специфичности. Сюда относятся прежде всего дегидрогеназы, киназы, синтетазы и амидазы. Так, уреазы, обладающая абсолютной специфичностью, катализирует гидролиз только мочевины. На противоположном конце шкалы находятся несколько гидролитических ферментов. Примерами могут служить эстеразы, действующие на обширный ряд эфиров карбоновых кислот; фосфатазы, действующие на эфиры фосфорной кислоты, и пептидазы, расщепляющие пептиды. Но и среди них имеются ферменты с высокой специфичностью, например фосфолипазы. Для ФЛА₂ характерна стерическая и позиционная специфичность, поэтому этот фермент является ценным инструментом в химии и биохимии липидов для установления позиционного распределения жирных кислот при анализе фосфолипидов, для разделения рацемических смесей липидов, а также в синтезе липидов для получения фосфолипидов со смешанным составом жирных кислот.

ФЛА₂ относятся к особой категории эстераз, в состав которой входят шестнадцать таксономических групп (IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XII, XIV), различающихся первичной структурой и расположением дисульфидных связей, эффективно действующих только на поверхности раздела между водой и нерастворимым субстратом – фосфолипидами, являясь ферментами, осуществляющими межфазный катализ. Для них, как и катализаторов межфазного переноса в органической химии, чрезвычайно важно локализовать реагенты в нужной точке пространства с учетом поверхности раздела фаз [2]. В связи с этим в активном центре всех групп фосфолипаз имеются два пространственно разобщенных домена: классический каталитический (эстеразный) центр и сайт распознавания поверхности раздела фаз (СРПФ). Таким образом, четко пространственно разграничены места для катализа, отдельно – для связывания с межфазной поверхностью «липид–вода» (рис. 1, А и В соответственно).

Известно, что ФЛА₂ поджелудочной железы свиньи и яда змеи *Naja naja oxiana* различаются по специфичности к «кислым» и «нейтральным» фосфолипидам [3, 4]. Работы, выполненные в лаборатории биоорганической химии НАН Беларуси под руководством академика А. А. Ахрема, в которых впервые на субстратсодержащих структурах, имеющих разную надмолекулярную организацию, установлена зависимость специфичности ФЛА₂ в первую очередь от супрамолекулярной организации субстрата, а затем уже от его химической структуры, являлись пионерскими [5].

Позже нами показано, что активность этих ферментов сильно зависит от разносторонней модификации межфазной поверхности раздела «липид–вода» (по заряду, надмолекулярной организации и упорядоченности упаковки липидов) [6].

В дальнейших наших экспериментах обнаружили изменение специфичности панкреатической ФЛА₂ к форме организации поверхности раздела фаз, т. е. приобретение ферментом в определенных условиях способности гидролизовать субстрат в непредпочтительной супрамолекулярной форме, на клеточном уровне. Наблюдали гемолиз с визуальным высвобождением гемоглобина из клетки при совместной инкубации панкреатической ФЛА₂ и не разрушаемых ею в обычных условиях эритроцитов крови в присутствии некоторых пестицидов циклогексан-1,3-дионового ряда, которые путем модификации поверхности мембраны инициировали ее гидролиз, что при потенциальном возникновении подобной ситуации в организме представляет серьезную опасность для здоровья человека [7]. Ультрафиолетовое излучение, модулирующее образование активных форм кислорода, способствующих множественной гидропероксидации фосфолипидов, также за счет модификации таким способом поверхности биомембраны может вызывать нежелательное по своим физиологическим эффектам изменение специфичности ФЛА₂.

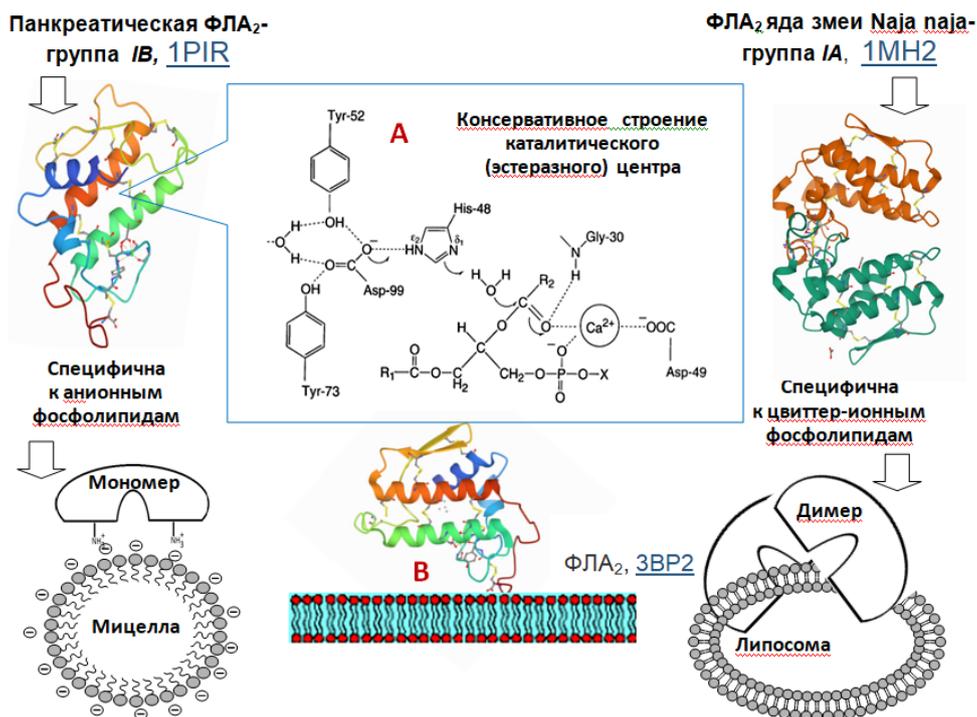


Рис. 1. Особенности взаимодействия ФЛА₂ с субстратом: два необходимых при катализе участка в активном центре фермента – эстеразный (А) и СРПРФ для взаимодействия с межфазной поверхностью (В). Структуры ферментов приведены с использованием PDB: панкреатическая ФЛА₂ – 1PIR (свиньи), 3BP2 (человека), яда кобры – 1MH2

Fig. 1. Features of the interaction of PLA₂ with the substrate: two sites in the active center of the enzyme necessary for catalysis – esterase (A) and the site of recognition of the interface for interaction with the interface (B).

Enzyme structures are shown using PDB: porcine pancreatic PLA₂ – 1PIR, 3BP2 (human), cobra venom – 1MH2

Механизм участия поверхности раздела «липид–вода» в функционировании липолитических ферментов в условиях УФ-облучения, как неблагоприятного экологического фактора, не изучен.

Установление закономерностей, характерных для функционирования мембранно-связанных ферментов, в том числе и внутриклеточных ФЛА₂, затруднено вследствие сложного состава биологических мембран и многообразия выполняемых функций. Поэтому широкое распространение нашло моделирование функций этих ферментов в относительно простых системах, состоящих из изучаемого объекта, его субстрата и кофактора. В связи с этим проведение исследований, направленных на установление особенностей проявления субстратной специфичности ФЛА₂ в условиях УФ-облучения фосфолипидных мембран с разной надмолекулярной организацией в модельной системе представляется актуальным, научно и практически значимым.

Цель работы – изучение закономерностей гидролиза фосфатидилхолина до и после УФ-облучения при участии ФЛА₂ поджелудочной железы свиньи и яда кобры *Naja naja oxiana* для выявления значимости гидропероксидации фосфолипидов в проявлении субстратной специфичности фосфолипаз А₂.

Эти ферменты были выбраны для наших экспериментов в связи с тем, что группы IA и IB, к которым относятся ФЛА₂ яда кобры и панкреаса свиньи соответственно, являются традиционными моделями при изучении метаболизма фосфолипидов и липидной энзимологии в целом. Кроме того, панкреатическая ФЛА₂ (группа IB) представляет собой потенциальную мишень, воздействие на которую приводит к развитию социально опасных болезней [8].

Экспериментальная часть. В работе использовали лиофилизированный препарат ФЛА₂ из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* (Опытный завод органического синтеза и биопрепаратов Института химии АН Эстонии) и панкреатическую ФЛА₂ (Sigma, P6534). Трис, ЭДТА, («Serva», Германия), гемоглобин, (Hb, мет-форма ≥ 95 % «Sigma-Aldrich», США) остальные реактивы были отечественного производства. Все органические растворители перед использованием очищались перегонкой.

Субстратом для фосфолиполиза служил фосфатидилхолин (ФХ) в мицеллярной фазе, сформированной детергентом дезоксихолатом натрия (ДОХ) или в виде липосом (ламеллярная фаза).

Хроматографически гомогенный ФХ выделяли из желтков куриных яиц [9] и хранили в хлороформе при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ в запаянных ампулах в атмосфере азота.

Получение фосфатидилхолина в мицеллярной фазе. Для получения мицелл из аликвоты ФХ упаривали хлороформ при помощи водоструйного насоса при комнатной температуре, после образования пленки дополнительно подсушивали еще 15–30 мин. Далее ФХ сольбилизировали детергентом – 72 мМ ДОХ в соотношении ФХ/ДОХ = 1/3 до полной прозрачности, разводили 0,05 М трис-НСl-буферным раствором, рН 8,0 до получения конечной концентрации субстрата 0,6 мМ. Параллельно готовили такой же концентрации дезоксихолат натрия для сравнения.

Получение фосфатидилхолина в ламеллярной фазе (липосомы). Пробирки с фосфолипидом упаривали под вакуумом до образования липидной пленки. Доводили до нужного объема буферным раствором Трис-НСl (0,05 М, рН 8,0), добавляли раствор хлорида натрия CaCl_2 (0,1 М) до концентрации 20 мкмоль/мл.

Смесь, находящуюся на ледяной бане, подвергали воздействию ультразвуковой обработке с помощью ультразвукового генератора УЗДН-2Т для образования липосом. Общая продолжительность такой ультразвуковой обработки – около 5–10 мин. Конечная концентрация ФХ в ламеллярной фазе (липосомах) – 1 мкмоль/мл.

УФ-облучение липидной фазы. Облучение субстрата осуществляли с помощью облучателя медицинского назначения ОКУФ 5 М, имеющего в качестве источника УФ прямую ртутно-кварцевую лампу ПРК-4, мощностью 250 Вт, диапазон излучения 180–400 нм. Под источник УФ на расстоянии 4 см от края облучателя помещали во флаконах мицеллы ФХ–ДОХ или раствор жирной кислоты (ЖК) в этаноле, мицеллы ДОХ, а также мицеллы, содержащие в качестве эталона сравнения Тролокс разных концентраций. Индекс окисления липидной фазы определяли по методике [9].

Для определения активности ФЛА₂ использовали: в случае ФХ в мицеллярной фазе – гемопроteidный метод [10], в случае липосом из ФХ – хроматографическое разделение (ТСХ) липидных компонентов из реакционной смеси [5]. Концентрация субстрата составляла 0,51 мкмоль/мл, соотношение субстрат/детергент 1:2. Количество фермента: ФЛА₂ змеи – 0,066 ед./мл; ФЛА₂ поджелудочной железы свиньи – 0,06 ед./мл. Общий объем реакционной смеси 1 мл. За единицу активности ФЛА₂ принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта / мин при 20 °С (ФЛА₂ змеи) или 37 °С (ФЛА₂ поджелудочной железы).

Препарат гемоглобина. Для приготовления раствора гемопротеина в трис-НСl-буфере с исходной концентрацией 100 мкМ (по гему) взвешивали лиофилизированный гемопроtein, исходя из расчетов, что 1 мг сухого порошка дает около 28 нмоль по гему. Добавляли буферный раствор Трис-НСl (0,05 М, рН 8,0) до концентрации 0,5–1 мг/мл. Оставляли на 0,5 ч для набухания, после чего раствор хорошо перемешивали и центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин для отделения нерастворившегося белка. Регистрировали спектр поглощения разведенного в 20–40 раз супернатанта на спектрофотометре «Specord UV-VIS» (Германия), либо определяли A_{423} на спектрофотометре «Solar PV 1251 C». Рассчитывали содержание гемопротеина (по гему) с учетом разведения и длины оптического пути, используя коэффициент молярной экстинкции гемоглобина и миоглобина – $162000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Раствор гемопротеина доводили буферным раствором Трис-НСl до концентрации 5 мкМ. Хранили в темноте при 4 °С до использования. Раствор использовали в тот же день.

Определение активности ФЛА₂ гемопроteidным методом. Определение активности ФЛА₂ проводили на спектрофотометре Specord uv-vis, (Германия), используя дифференциальную спектроскопию метгемоглобина (*Hb*) при его переходе в гемихром под действием жирной кислоты, отщепленной ФЛА₂ [10]. Дифференциальные спектры *Hb* характеризовали в единицах оптической плотности как разность поглощения (ΔD) в диапазоне длин волн 405–423 в опытной кювете по сравнению с контрольной.

Реакционная смесь, содержащая 0,05М трис-НСl-буферный раствор, рН 8;0; 1мМ CaCl_2 , указанное выше количество ФЛА₂, 5 мкМ гемоглобин (*Hb*), разливалась в две 1-см кюветы и пропи-

сывалась нулевая линия. По истечении выбранного периода времени по 100 мкл облученных УФ мицелл ФХ–ДОХ и ДОХ добавлялось одновременно к опытной и контрольной кюветам соответственно и сразу же регистрировались дифференциальные спектры в термостатируемых при 20 °С ячейках в режиме пропускания $T = 75\text{--}125\%$.

Каждый дифференциальный спектр Нв характеризовался максимальной ($\lambda = 423$) и минимальной ($\lambda = 403$) длинами волн и расстоянием между ними (ΔT). Откладывая по оси абсцисс время взаимодействия Нв с мицеллами, а по оси ординат значение ΔD , получали кинетическую кривую, отражающую накопление продукта за единицу времени ($V_0 = \Delta P / \Delta t$), т. е. начальную скорость реакции, и характеризующуюся определенным тангенсом угла наклона. Возрастание угла наклона кинетической кривой (тангенса) свидетельствовало об увеличении скорости реакции. Единицы пропускания ΔT (мм), полученные с помощью спектрофотометра, переводили в единицы поглощения ΔD (о.е.) по формуле:

$$\Delta D = 2 - \lg\left(100 - \frac{\Delta T}{3}\right), \quad (1)$$

где ΔD – единицы поглощения, ΔT – единицы пропускания.

Таким образом, активность ФЛА₂ выражали как тангенс угла наклона кинетической кривой зависимости ΔD (прямо пропорциональной приросту продукта реакции) от промежутка времени Δt . Контролем служила величина тангенса угла кинетической кривой фосфолипазной реакции с использованием мицелл субстрата и ДОХ в отсутствие облучения.

Определение активности ФЛА₂ с использованием ТСХ. Реакцию гидролиза фосфолипида в ламеллярной форме инициировали добавлением к готовым липосомам ФЛА₂. На определенном промежутке времени (через 5, 20 и 40 мин) останавливали реакцию путем добавления 900 мкл аликвоты реакционной смеси, состоящей из 1 мл раствора хлороформ/метанол (2:1) и 350 мкл ЭДТА.

Визуализацию липолиза проводили с помощью метода ТСХ. Для этого раствор после остановки реакции ЭДТА встряхивали на миксере ВП, центрифугировали на центрифуге ОПн-ЗУХЛ 4.2 при 1500 об/мин в течение минуты и отбирали нижнюю фракцию, содержащую липиды, продукты липолиза и хлороформ.

Нижнюю фракцию высушивали под вакуумом до образования липидной пленки, добавляли к ней 50 мкл хлороформа и проводили ТСХ. После проведения хроматографии пластинки окрашивали реактивом Васьковского для визуализации полученных продуктов липолиза фосфолипидов в виде синих пятен, которые выскребали в отдельные пробирки, добавляли 300 мкл хлорной кислоты HClO₄. Степень экстракции продуктов реакции из реакционной смеси составляла не менее 85 %. Пробирки ставили на песчаную баню на 20 мин. После охлаждения добавляли 4,8 мл реактива Васьковского, ставили на 15 мин на водяную баню (1000 °С), охлаждали. Измеряли оптическую плотность растворов фосфолипидов и продуктов фосфолиполиза на спектрофотометре Solar (825 нм) [11].

Для определения концентрации ФЛА₂ использовали спектрофотометрический метод [10]. ФЛА₂ (280 нм) = 13,0 коэффициент удельного поглощения [12]. Степень гидролиза (активность ФЛА₂) выражали как отношение количества фосфора в образовавшемся лизофосфатидилхолине к суммарному фосфору продукта и непрореагировавшего исходного субстрата.

Регистрация динамического светорассеяния. Для характеристики наночастиц мицелл РС-ДОС до и после УФ-облучения методом динамического рассеяния света (DLS) использовали систему анализа WYATT Technology/ DinaPro NanoStar (США). Условия: DLS время Acq 5 с (получение); DLS № 10, $t = 20$ °С, вязкость – 1 сП (сантипуазейли).

Результаты и их обсуждение. Для моделирования перекисного окисления липидов (ПОЛ) использовали УФ-облучение (180 до 400 нм) с целью исключения дополнительных реагентов в реакционной смеси, таких как перекись водорода, гидроперексид кумола и гематин, обычно используемых для инициации ПОЛ при исследовании фосфолипаз [13]. Развитие в биологической мембране ПОЛ при УФ-облучении под действием образующихся активных форм кислорода (АФК) априори связывают с гидропероксидацией остатков непредельных жирных кислот, входящих

в состав фосфолипидов. Степень окисления фосфолипида характеризуется по индексу окисления – отношению интенсивности поглощения A_{233}/A_{215} в УФ-спектре [9]. При УФ-облучении в широком диапазоне от 180 до 400 нм яичного ФХ как в виде пленки, так и в растворе смешанных мицелл с ДОХ, в наших исследованиях наблюдается почти трехкратное по сравнению с необлученным препаратом увеличение индекса окисления фосфолипида: с 0,135 до 0,316 оптических единиц (ОЕ). Без УФ-облучения в растворе мицелл наблюдалось незначительное окисление: от 0,135 ОЕ в начале процесса до 0,14 ОЕ при окончании.

Поглощение световой энергии в видимой и УФ-области связано с различным типом электронных переходов. Характеристические пики поглощения соединений, имеющие различные хромофоры, зависят от протяженности и расположения π -электронной системы, что позволяет распознавать различные соединения одного и того же ряда. Известно, что насыщенные карбоновые кислоты в этаноле (метаноле) имеют слабые максимумы поглощения при 205–210 нм ($\epsilon \approx 50$). $\alpha\beta$ -Непредельные карбоновые кислоты имеют интенсивную полосу поглощения ($\lg \epsilon \approx 4$) практически в области π - π^* перехода 220–200 нм, зависящую от наличия и положения алкильных заместителей. Теоретически рассчитаны и практически подтверждены инкременты для различных заместителей, сопряженных с двойной связью: от 10–12 нм для алкильной группы до +30 нм для β -гидроксигруппы [14].

УФ-спектр докозогоксаеновой кислоты (ДГК, C22:6) имеет два пика с максимумами при 212 и 235,5 нм, характеризующих наличие насыщенных и ненасыщенных связей соответственно (рис. 2, *a*).

Облучение ультрафиолетом ДГК, содержащей 6 двойных связей, приводит к гипохромному эффекту, выражающемуся в нивелировании интенсивности пика с максимумом 235,5 нм, при неизменности характеристик пика с максимумом 209,5 нм (рис. 2, *a*), что свидетельствует о воздействии облучения именно на область непредельных связей. Антиоксидант Тролокс в концентрации 10 нМ предотвращает существенное снижение интенсивности пика с максимумом 235,3 нм после совместного УФ-облучения с ДГК в течение 60 мин, что свидетельствует о прямой связи наблюдаемых в отсутствие антиоксиданта изменений в этом пике с процессами перекисного окисления при УФ-облучении в этой области (рис. 2, *b*).

Приведенные выше данные показывают, что липидная фаза (фосфатидилхолин и непредельные ЖК) является приемлемой и удобной субстанцией для моделирования ПОЛ с помощью УФ-облучения в модельных системах. При этом под действием УФ-облучения происходят суще-

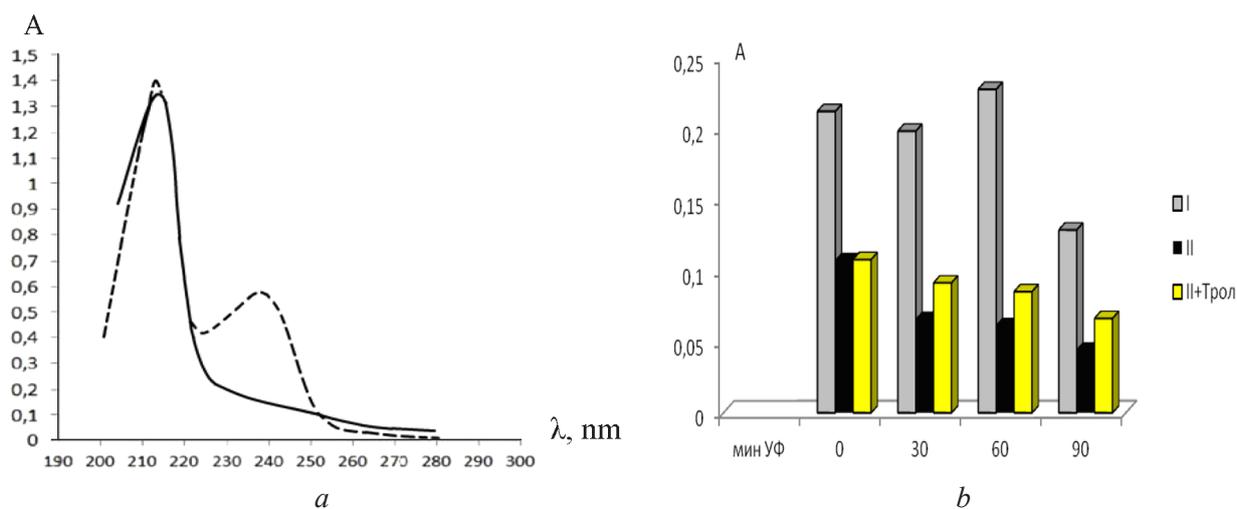


Рис. 2. УФ-спектр ДГК до (пунктир) и после (сплошная линия) УФ-облучения (*a*); действие антиоксиданта Тролокса (II+Трол) на 1-й пик (I) и на 2-й пик УФ-спектра ДГК (II) при совместном облучении ДГК с Тролоксом (*b*)

Fig. 2. UV spectrum of docosahexaenoic acid before (dotted line) and after (solid line) UV irradiation (*a*); the effect of the antioxidant Trolox (II+Trol) on the 1 st peak (I) and on the 2 nd peak (II) of the UV spectrum of DHA during co-irradiation of docosahexaenoic acid with Trolox (*b*)

ственные структурные перестройки межфазной поверхности, обусловленные окислительными процессами и разрушением непердельных связей.

Гидролиз облученных и необлученных фосфолипидов проводили в оптимальных для каждого фермента условиях. Так, по нашим более ранним данным, гидролиз за 10 мин ФХ-содержащих мицелл, сформированных нейтральным детергентом тритоном X-100, под действием ФЛА₂ яда змеи происходит на 38 %, а ФЛА₂ поджелудочной железы свиньи – только на 20 %. Обратная картина наблюдается при гидролизе ФХ в составе смешанных мицелл с дезоксихолатом натрия: под действием ФЛА₂ поджелудочной железы свиньи гидролизуется 36 % фосфолипида, а ФЛА₂ яда змеи – только 18 % [15].

Сначала изучали фосфолиполиз в условиях, предпочтительных для ФЛА₂ поджелудочной железы свиньи, которая в естественной среде гидролизует фосфолипидную составляющую пищи в виде отрицательно заряженных мицелл с желчными кислотами. В связи с этим формировали две модельные системы, включающие для каждого фермента отдельно один и тот же субстрат с одинаковой надмолекулярной организацией – мицеллярной фазой, сформированной яичным ФХ и ДОХ, и ионы кальция в качестве кофактора. В реакционной смеси такого состава нами ранее установлено, что изменение активности панкреатической ФЛА₂ при УФ-облучении субстрата адекватно отражает процессы ПОЛ и может служить его индикатором [16].

Активность ферментов определяли гемопротеидным методом по амплитуде дифференциального спектра Hb ($\Delta D = D_{423} - D_{405}$) в качестве индикатора отщепившейся в результате реакции жирной кислоты. При регистрации во времени разностных спектров поглощения Hb через 0,5 мин

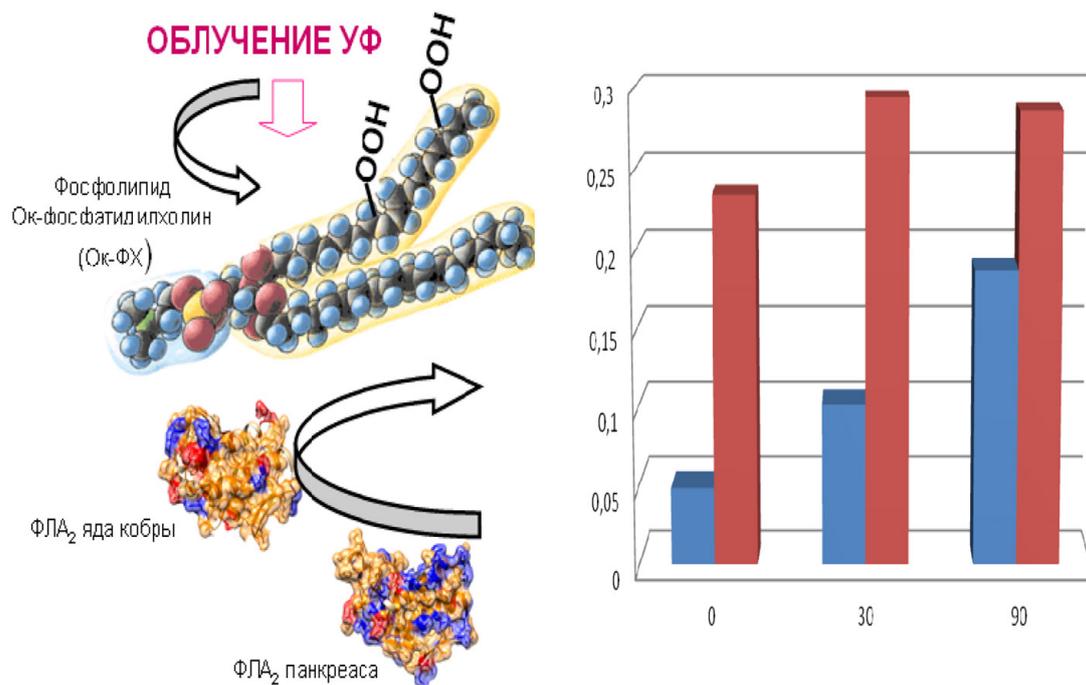


Рис. 3. Изменение амплитуды дифференциальных спектров гемоглобина (ΔD) в результате гидролиза ФХ под действием ФЛА₂ различного происхождения (синяя – змеиная, красная – поджелудочная) до и после УФ-облучения.

Структуры ферментов приведены с использованием PDB: панкреатическая ФЛА₂ – 4g5i (свиньи), яда кобры – 1mh7. Условия и ход эксперимента: 100 нмоль ФХ/мл Hb, 70 нг ФЛА₂/мл Hb. Реакционную смесь, содержащую буфер, Ca²⁺, Hb разливали в 3 пары кювет. К опытной кювете каждой пары добавляли 20 мкл ФХ (0 мин) или УФ-облученного ФХ (60 мин), через 2 мин прописывали данные (60 мин УФ), далее инкубировали при комнатной температуре 30 мин и прописывали еще раз (60+30)

Fig. 3. Changes in the amplitude of differential spectra of hemoglobin (ΔD) as a result of PC hydrolysis under the action of PLA₂ of various origins (blue – snake, red – pancr.) before and after UV irradiation.

Conditions and course of the experiment: 100 nmol PC / ml Hb, 70 ng PLA₂ / ml Hb, The reaction mixture containing the buffer, Ca²⁺, Hb was poured into 3 pairs of cuvettes. To the experimental cuvette of each pair, 20 μ L of PC (0 min) or UV-irradiated PC (60 min) was added, after 2 minutes the data were recorded (60 min UV), then they were incubated at room temperature for 30 min and prescribed again (60 +30)

строятся кинетические кривые. На рис. 3 указано $\Delta D / 2,5$ мин. Тангенс угла наклона этой кривой к оси абсцисс отражает прирост продукта в единицу времени: $\Delta P/\Delta t$ и характеризует начальную скорость фосфолипазной реакции. Повышение во времени скорости реакции приводит к увеличению тангенса угла наклона кинетической кривой, что обеспечивает измерение активности фермента в условных единицах – ΔD .

Специфичность обоих ферментов хорошо проявляется по отношению к необлученным мицеллам ФХ, несущим отрицательный заряд (рис. 3, левая группа столбиков). Активность панкреатической ФЛА₂ превышает таковую фермента змеиного яда более чем в пять раз, что полностью коррелирует со специфичностью ферментов соответственно к отрицательно заряженной и нейтральной межфазной поверхности, формируемой субстратом.

Дальнейший анализ спектральных изменений гемоглобина (ΔD) показывает активацию обеих исследованных фосфолипаз в случае облученного ФХ независимо от их специфичности. По мере увеличения длительности облучения ФХ уровень активности панкреатической ФЛА₂ к 30 мин облучения выходит на плато, незначительно (в 1,2 раза) превышая к 90 мин исходное значение, в то время как активность фермента яда змеи увеличивается более чем в 4,5 раза к конечному времени УФ воздействия на субстрат.

В связи с тем что в природе фермент змеиного яда используется его носителем при взаимодействии с клеточными стенками кожных покровов, состоящими в основном из цвиттер-ионного ФХ, далее исследовали специфичность ФЛА₂ на бислоиных фосфолипидных моделях биомембран – липосомах. Наблюдается сходная с мицеллярной формой субстрата картина при фосфолиполизе с участием ФЛА₂ яда кобры и панкреаса свиньи субстрата в другой надмолекулярной форме – в виде липосом (рис. 4). На необлученном ФХ субстратная специфичность ФЛА₂ также сильно выражена: активность змеиного фермента, который гидролизует с большими скоростями цвиттер-ионный ФХ, выше, чем панкреатического, предпочитающего отрицательно заряженную межфазную поверхность субстрата, 35 и 5 % гидролитического расщепления ФХ соответственно.

После облучения ФХ картина значительно изменяется: активность панкреатической ФЛА₂ существенно возрастает (рис. 4, *b*): к 40 мин – более чем в 4 раза (гидролиз достигает 24 %), тогда как ФЛА₂ яда змеи до 30 мин остается практически неизменной (рис. 4, *a*) с превышением исходной активности в конечной точке всего в 1,3 раза (45 %).

Полученные данные находятся в соответствии с имеющейся в литературе информацией об активации ФЛА₂ яда змеи по отношению к перекисно-окисленным пероксидом кумола липосомам из ФХ или смеси ФХ и фосфатидилэтаноламина в разном соотношении. При этом увеличение

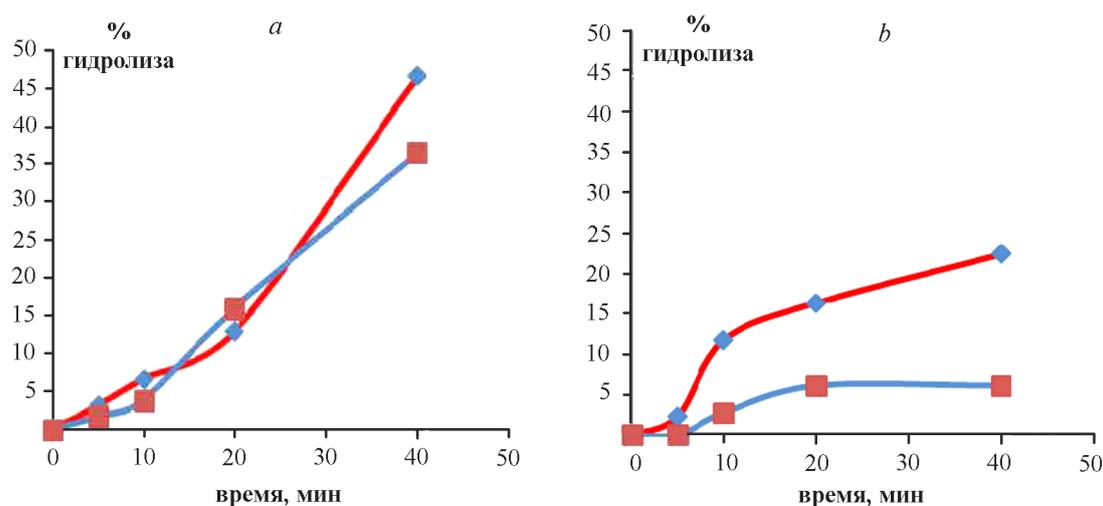


Рис. 4. Гидролиз ФХ в составе липосом ФЛА₂ яда змеи (*a*) и ФЛА₂ поджелудочной железы (*b*) до УФ-облучения (голубые линии и после – красные линии)

Fig. 4. Hydrolysis of PC contained in liposomes PLA₂ of snake venom (*a*) and PLA₂ of the pancreas (*b*) before UV irradiation (blue lines and after (red lines))

активности ФЛА₂ авторы связывают с повышением в результате ПОЛ кажущейся микровязкости везикул, установленной с помощью анизотропии поляризации флуоресценции дифенилгексатриена [13].

Таким образом, после УФ-облучения ФХ активность обеих ФЛА₂ независимо от надмолекулярной формы субстрата и заряда межфазной поверхности существенно возрастает, что свидетельствует о значительных структурных перестройках, формирования своеобразных «изъянов» на межфазной поверхности, связанных с появлением пула гидропероксидированных жирных кислот, поскольку известно, что этот фермент очень чувствителен к изменениям на межфазной границе раздела фаз [17].

Для того чтобы выяснить, имеются ли какие-либо изменения в субстратной организации после УФ-облучения, использовали динамическое рассеяние света (ДРС) для изучения ФХ в мицеллярной фазе, когда все молекулы фосфолипида за счет детергента находятся на поверхности раздела фаз в отличие от липосом, в которых 40 % ФХ находится во внутреннем слое.

ДРС используется в лазерной корреляционной спектроскопии для определения размеров частиц в суспензии. Прозрачный раствор мицелл ФХ–ДОХ также способен изменять оптические характеристики. При прохождении пучка света через мицеллы происходит упругое, так называемое рэлеевское светорассеяние. В случае ДРС используют лазерное излучение, которое является когерентным и монохроматическим.

Полученные кривые динамического светорассеяния существенно отличаются для необлученных мицелл (0 мин) и УФ-облученных: 0 < 30 мин УФ < 50–75 мин УФ. За 60 мин УФ-облучения появляется 0,3 % частиц большего размера, обладающих повышенной интенсивностью. При этом наблюдается увеличение светорассеяния мицелл ФХ–ДОХ после УФ-облучения, которое практически не зависит от времени (дозы) облучения (рис. 5).

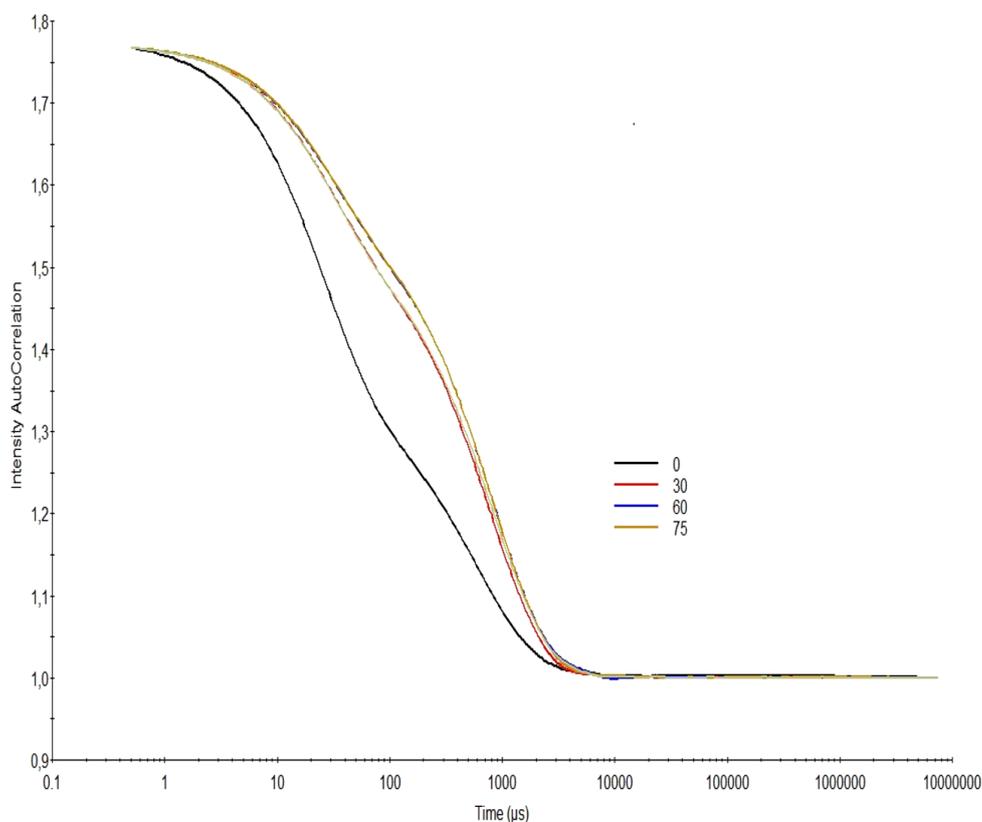


Рис. 5. Изменение интенсивности автокорреляции светорассеяния образцов (до УФ-облучения (0 мин) и с 30-, 60- и 75-минутным УФ-облучением мицелл ФХ-ДОХ (1/3, моль/моль)) в зависимости от времени затухания сигнала

Fig. 5. Change in the intensity of autocorrelation of light scattering of samples (before UV irradiation (0 min) and with 30-, 60-, and 75-minute UV irradiation of PC-DOC micelles (1/3, mol / mol)) depending on the decay time of the signal

Таким образом, УФ-облучение смешанных мицелл ФХ–ДОХ от 30 до 75 мин изменяет размеры части мицелл предположительно в связи с разрыхлением плотности упаковки молекул в составе межфазной поверхности за счет образования гидроперекисей жирных кислот, а также вторичных продуктов их окисления.

Заключение. Проведенное исследование показывает, что УФ-облучение в широком диапазоне от 180 до 300 нм липидной фазы приводит к увеличению по сравнению с нативными препаратами индекса окисления ФХ и нивелированию в УФ-спектре докозогексаеновой кислоты пика, характеризующего область непередельных связей.

Обнаружена активация ФЛА₂ панкреаса и яда кобры *Naja naja oxiana* по отношению к УФ-облученному субстрату независимо от его надмолекулярной организации, заряда липид-водной поверхности и исходной специфичности этих ферментов.

Сравнительный анализ активности ФЛА₂ из разных источников также показал, что УФ-модулированная гидропероксидация межфазной поверхности «липид–вода» оказывается перво-степенной для функционирования фермента, что закономерно, поскольку прикрепление ФЛА₂ к организованной субстратной поверхности с помощью СРПРФ является лимитирующей стадией фосфолиполиза. Увеличение размеров 0,3 % мицелл ФХ с ДОХ, установленное ДРС после их облучения ультрафиолетом, указывает на возможное разрыхление плотности упаковки молекул пограничного слоя этих частиц вследствие аккумуляции перекисных липидов с образованием ряда фракций в мембране, которые могут служить местом усиленной атаки фосфолипазы А₂.

Благодарности. Автор выражает благодарность всем сотрудникам Института биоорганической химии НАН Беларуси за помощь в проведении предложенного для этой работы эксперимента.

Acknowledgements. Author is grateful to all employees of the Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus for their help in carrying out the experiment proposed for this work.

Список использованных источников

1. Диксон, М. Ферменты / М. Диксон, Э. Уэбб. – М.: Мир, 1982. – Т. 3. – 1120 с.
2. Островский, В. А. Межфазный катализ органических реакций / В. А. Островский // Соросовский образоват. журн. – 2000. – Т. 6, № 11. – С. 30–34.
3. Брокерхоф, Х. Липолитические ферменты / Х. Брокерхоф, Р. Дженсен; пер. с англ. – М.: Мир, 1978. – 396 с.
4. Murakami, M. Novel functions of phospholipase A₂s: Overview, BBA / M. Murakami // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2019. – Vol. 1864, N 6. – P. 763–765. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.02.005>
5. Study of the specificity of phospholipase A₂ on substrate-containing structures possessing different supramolecular organization / A. Aakhrem [et al.] // Biokhimiya. – 1989. – Vol. 54, N 4. – P. 542–547.
6. Литвинко, Н. М. Активность фосфолипаз А₂ и С при биохимическом моделировании / Н. М. Литвинко. – Минск: Технопринт, 2003. – 350 с.
7. Способ предварительной оценки безопасности циклогексанонсодержащего пестицида или его метаболита для человека и животных: пат. № 20668 Респ. Беларусь / Н. М. Литвинко, Д. О. Герловский. Оpubл.: 28.09.2016.
8. Tappia, P. S. Phospholipases in Health and Disease / P. S. Tappia, N. S. Dhalla. – New York: Springer, 2014. – 410 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0464-8>
9. Препаративная биохимия липидов / Л. Д. Бергельсон [и др.]. – М: Наука, 1981. – 256 с.
10. Андреюк, Г. М. Превращение гемоглобина в гемихром при взаимодействии со свободными жирными кислотами: автореф. дис. ... канд. хим. наук: 02.00.10 / Г. М. Андреюк. – Минск, 1988.
11. Vaskovsky, V. E. A universal reagent for phospholipid analysis / V. E. Vaskovsky, E. Y. Kostetsky, J. M. Vasendin // Journal of Chromatography A. – 1975. – Vol. 114, N 1. – P. 129–141. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)85249-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)85249-8)
12. Рахуба, Г. Н. Липолитические реакции с участием фосфолипаз А₂ и механизмы их регуляции по принципу обратной связи: дис. ... канд. хим. наук : 03.00.04 / Г. Н. Рахуба. – Минск, 2007. – 143 л.
13. Lipid peroxidation and phospholipase A₂ activity in liposomes composed of unsaturated phospholipids: a structural basis for enzyme activation / A. Sevanian [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 1988. – Vol. 961, N 3. – P. 316–328. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(88\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0005-2760(88)90079-3)
14. Вязьмин, С. Ю. Электронная спектроскопия органических соединений / С. Ю. Вязьмин, Д. С. Рябухин, А. В. Васильев. – СПб, 2011. – 42 с.
15. 3,5-дизамещенные производные тиотетрановой кислоты – новые ингибиторы секреторных фосфолипаз А₂ / С. В. Кучуро [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2004. – Т. 48, № 1. – С. 65–68.
16. Litvinko, N. M. The interaction of phospholipase A₂ with oxidized phospholipids at the lipid-water surface with different structural organization / N. M. Litvinko, L. A. Skorostetskaya, D. O. Gerlovsky // Chemistry and Physics of Lipids. – 2018. – Vol. 211. – P. 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.10.010>
17. Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention / E. Dennis [et al.] // Chem. Rev. – 2011. – Vol. 111. – P. 6130–6185. <https://doi.org/10.1021/cr200085w>

References

1. Dixon M., Webb E. *Enzymes*. NY, Academic Press, 1964. 950 p.
2. Ostrovskii V. A. Interphase transfer catalysis of organic reactions. *Sorosovskii obrazovatel'nyi zhurnal = Soros educational journal*, 2000, vol. 6, no. 11, pp. 30–34 (in Russian).
3. Brockerhoff H., Jensen R. *Lipolytic enzymes*. NY, Academic Press, 1974. 330 p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-134550-1.X5001-1>
4. Murakami M. Novel functions of phospholipase A₂s: Overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2019, vol. 1864, no. 6, pp. 763–765. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.02.005>
5. Akhrem A. A., Shumilina T. A., Litvinko N. M., Kissel M. A., Linnik O. I. Study of the specificity of phospholipase A₂ on substrate-containing structures possessing different supramolecular organization. *Biokhimiya*, 1989, vol. 54, no. 4, pp. 542–547.
6. Litvinko N. M. *Activity of phospholipases A₂ and C in biochemical modeling*. Minsk, Technoprint Publ., 2003. 350 p. (in Russian).
7. Litvinko N. M., Gerlovsky D. O. *Method for preliminary assessment of the safety of a cyclohexanone-containing pesticide or its metabolite for humans and animals*. Patent BY No. 20668. Publ. date 28.09.2016 (in Russian).
8. Tappia P. S., Dhalla N. S. *Phospholipases in Health and Disease*. New York, Springer, 2014. 410 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0464-8>
9. Bergel'son L. D., Dyatlovitskaya E. V., Molotkovskii Yu. G., Batrakov S. G., Barsukov L. I., Prokazov N. V. *Preparative biochemistry of lipids*. Moscow, Nauka Publ., 1981. 256 p. (in Russian).
10. Andreyuk G. M. *Conversion of hemoglobin to hemihrome when interacting with free fatty acids*. Minsk, 1988 (in Russian).
11. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin J. M. A universal reagent for phospholipid analysis. *Journal of Chromatography A*, 1975, vol. 114, no. 1, pp. 129–141. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)85249-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)85249-8)
12. Rakhuba G. N. *Lipolytic reactions involving phospholipase A₂ and mechanisms of their regulation on the feedback principle*. Minsk, 2007. 143 p. (in Russian).
13. Sevanian A., Wratten M. L., McLeod L. L., Kim E. / Lipid peroxidation and phospholipase A₂ activity in liposomes composed of unsaturated phospholipids: a structural basis for enzyme activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1988, vol. 961, no. 3, pp. 316–328. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(88\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0005-2760(88)90079-3)
14. Vyazmin S. Yu., Ryabukhin D. S., Vasilyev A. V. *Electronic spectroscopy of organic compounds*. St. Petersburg, 2011. 42 p. (in Russian).
15. Kuchuro S. V., Rakhuba G. N., Rubinov D. B., Zheldakova T. A., Babitskaya S. V., Litvinko N. M. 3,5-disubstituted thiotetronic acid derivatives new inhibitors of secretory phospholipases A₂. *Doklady Natsional'noy akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2004, vol. 48, no. 1, pp. 65–68 (in Russian).
16. Litvinko N. M., Skorostetskaya L. A., Gerlovsky D. O. The interaction of phospholipase A₂ with oxidized phospholipids at the lipid-water surface with different structural organization. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2018, vol. 211, pp. 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.10.010>
17. Dennis E., Cao J., Hsu Y.-H., Magriotti V., Kokotos G. Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chemical Reviews*, 2011, vol. 111, pp. 6130–6185. <https://doi.org/10.1021/cr200085w>

Информация об авторах

Литвинко Наталья Михайловна – д-р хим. наук, доцент, зав. лаб. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: al_h@mail.ru

Information about the authors

Natalia M. Litvinko – D. Sc. (Chemistry), Associate Professor, Head of the laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Science of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: al_h@mail.ru