

ПРИМЕНЕНИЕ МИЦЕЛЛЯРНОЙ ФАЗЫ ФОСФОЛИПИДОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИЛИПОЛИТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА β -ТРИКЕТОНОВ ТИОФЕНОВОГО РЯДА

С.В. Кучуро, Н.М. Литвинко, Г.Н. Рахуба, Д.Б. Рубинов, Т.А. Желдакова

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь,
nata@presidium.bas-net.by*

Ранее нами показано, что ряд 3,5-дизамещенных производных тиотетроновой кислоты (ТТК 1-10) существенно ингибирует активность секреторных фосфолипаз A_2 (ΦLA_2 , К.Ф. 3.1.1.4)[1]. Наибольший ингибиторный эффект в описанных условиях проведения эксперимента проявили дихлорзамещенное производное ТТК-05 и не содержащее непредельных связей в алкилбензильном радикале ТТК-03. Целью настоящей работы является исследование потенциального антилиполитического действия других синтезированных *de novo* 3,5-функционализированных производных β -трикетонв тиофенового ряда ТК 11-13, на активность ΦLA_2 яда змеи *Naja naja oxiana*, специфичной к нейтральным фосфолипидам, а также исследование взаимосвязи между химической структурой исследуемых веществ и степенью их воздействия на активность ΦLA_2 . Для проведения экспериментов был использован этот секреторный фермент из семейства ΦLA_2 , поскольку он является признанным модельными объектом для исследования фосфолиполиза [2].

Смешанные мицеллы получали путём добавления раствора детергента к фосфолипидной плёнке, образующейся после упаривания хлороформного раствора фосфолипида. Стандартная система для исследования содержала 0,51 мкмоль фосфолипида, 1,02 мкмоль детергента, 2 мМ $CaCl_2$ в 0,05 М трис-НСl буфере рН 7,4. Реакцию начинали добавлением фермента (20,6 мкг). Отбирали пробы по 300 мкл и останавливали реакцию добавлением ЭДТА до конечной концентрации 15 мМ. Продукты реакции экстрагировали двукратным объёмом смеси хлороформ:метанол (в соотношении 2:1 по объёму). Нижний слой отделяли, упаривали и разделяли фосфолипид и лизофосфолипид с помощью ТСХ в системе 65:25:4 (хлороформ:метанол:вода). Пятна проявляли реагентом на фосфолипиды, пятна продуктов гидролиза выскребали и анализировали содержание в них фосфора с помощью реактива Васьковского [3]. До начала липолитической реакции, перед добавлением ΦLA_2 в реакционную смесь со смешанными мицеллами, фермент преинкубировали в течение 2 ч с изучаемыми 3,5-дизамещёнными производными β -трикетонами тиофенового ряда в соотношении фермент:эффектор 1:5. Скорость гидролиза субстрата оценивали по образованию лизопродукта в мкмоль/мин на 1мг белка (v_0 – начальная скорость реакции фермента в контроле, v_i – в присутствии эффектора). О влиянии исследуемых веществ на ΦLA_2 судили по соотношению начальной скорости реакции в присутствии эффектора и без него (v_i / v_0).

Показано, что для мицелл, сформированных из фосфатидилхолина (ФХ) с тритоном X-100 (ТХ-100), дезоксихолатом натрия (ДХ) и цетилтриметиламмоний бромидом (ЦТАБ) скорость гидролиза v (мкмоль $\cdot$ мин $^{-1}\cdot$ мг $^{-1}$) составляла $6,8 \pm 0,02$; $4,84 \pm 0,37$ и $0,7 \pm 0,23$ соответственно, а для фосфатидилэтаноламина (ФЭА) – $4,1 \pm 0,39$, $2,4 \pm 0,49$ и $1,01 \pm 0,56$ соответственно. Полученные результаты подтверждают специфичность ΦLA_2 яда змеи *Naja naja oxiana* к незаряженной межфазной поверхности субстрата. После преинкубации ΦLA_2 с ТК-11 выявлено значительное снижение скорости гидролиза v_i мицелл ФХ:ТХ-100, ФХ:ДХ и ФЭА:ТХ-100, ФЭА:ДХ на 40,3%, 16,0% и 81,3%, 38,8% соответственно. В присутствии ТК-13 процент

ингибирования фосфолиполиза для мицелл ФХ:ТХ-100, ФХ:ДХ составил 11,4% и 25% соответственно. При гидролизе мицелл ФХ и ФЭА с ЦТАБ наблюдалась значительная активация фермента в присутствии ТК-11 и ТК-13. Это, возможно, объясняется тем, что ТК-13, обладая 2-мя электроотрицательными заместителями, способствует взаимодействию фермента с организованной поверхностью субстрата, нейтрализуя положительный заряд, который ей придаёт ЦТАБ. Таким образом, электростатические взаимодействия фермента с организованной субстратной поверхностью в процессе фосфолиполиза имеют более существенную значимость по сравнению с гидрофобными (рисунок).

Установлено, что максимальным ингибиторным действием по отношению к $\Phi\text{ЛA}_2$ при гидролизе мицелл ФИ:ТХ-100 обладает ТК-11 –44 %.

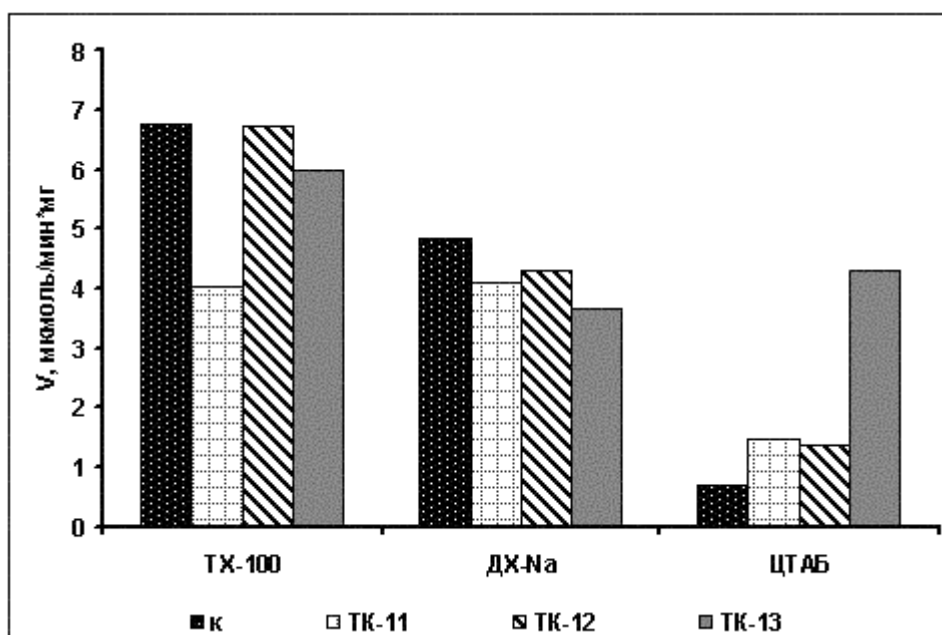


Рис. – Зависимость скорости гидролиза смешанных мицелл ФХ с ТХ-100, ДХ-Na и ЦТАБ $\Phi\text{ЛA}_2$ яда змеи *Naja naja oxiana* от заряда межфазной поверхности и наличия ТК-11, ТК-12 и ТК-13

Обработка полученных данных и определение кинетических характеристик процесса липолиза, в том числе v , v_i , с помощью стандартных приемов ферментативной кинетики в случае фосфолипаз связана с некоторыми трудностями, возникающими из-за сложности учета истинной концентрации нерастворимого в воде субстрата и его способности образовывать многослойные агрегаты, на которых в разной степени сорбируются фосфолипазы. Только часть субстрата, находящегося на внешней поверхности таких надмолекулярных структур, доступна для гидролиза ферментом. Таким образом, выбор мицеллярной формы организации субстрата для проведения кинетических исследований оптимален, поскольку в мицеллярной фазе все молекулы фосфолипида доступны для фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кучуро С.В., Рахуба Г.Н., Рубинов Д.Б., Желдакова Т.А., Бабицкая С.В., Литвинко Н.М. 3,5-дизамещенные производные тиотетрановой кислоты – новые ингибиторы секреторных фосфолипаз A_2 // Докл. НАН Беларуси. - 2004. - Т. 48, № 1, С. 65-68.
2. Six D.A., Dennis E.A. // Biochim. at biophys. Acta. – 2000. – Vol. 1488, N 1. – P. 1-19.
3. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin J.M. A universal reagent for phospholipid analysis // J. Chromat. - 1975. - Vol. 114, № 1. - P. 129 -141.