

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-67

**СУБСТРАТНАЯ МОДУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФОСФОЛИПАЗЫ A2:
ВЫЯВЛЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ АКТИВНОСТИ ОТ СУБСТРАТА****SUBSTRATE MODULATION OF PHOSPHOLIPASE A2 ACTIVITY:
ELUCIDATING ITS SUBSTRATE DEPENDENCE**

В. В. Волков, В. В. Бессонов

ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва

V. V. Volkov, V. V. Bessonov

Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow

✉ vova.volkov.00@list.ru

Аннотация

Исследована активность фосфолипазы A2 (ФЛА2) методом потенциометрического титрования на фосфатидилхолине, соевом и яичном лецитине. Выявлена зависимость активности ФЛА2 от природы субстрата: фосфатидилхолин показал максимальную активность, соевый лецитин — минимальную. Обсуждены причины субстратной модуляции, намечены направления дальнейших исследований с учетом важности выбора субстрата для точного анализа активности ФЛА2.

Abstract

The activity of phospholipase A2 (PLA2) was investigated using potentiometric titration on phosphatidylcholine, soybean, and egg lecithin. A dependence of PLA2 activity on substrate nature was revealed: phosphatidylcholine showed maximum activity, while soybean lecithin exhibited the lowest. The reasons for substrate modulation were discussed, and directions for further research were outlined, emphasizing the importance of substrate selection for accurate PLA2 activity analysis.

Фосфолипазы — это семейство гидролитических ферментов, которые катализируют расщепление сложноэфирных связей в фосфолипидах [1, 2]. Их активность является критически важной для мембранного гомеостаза, синтеза и деградации липидов, а также для генерации широкого спектра биоактивных молекул, участвующих в клеточной сигнализации [3]. Существуют различные классы фосфолипаз (PLA1, PLA2, PLC, PLD), каждый из которых расщепляет определенную сложноэфирную связь в молекуле фосфолипида, генерируя уникальные продукты (например, лизофосфолипиды, жирные кислоты, диацилглицерол, фосфатидная кислота, инозитолфосфаты) [4–6]. В настоящем исследовании изучена субстратная специфичность фосфолипазы A2 с использованием трех различных фосфолипидных субстратов: соевого лецитина, чистого фосфатидилхолина и лецитина из куриных яиц. Определение активности фосфолипазы A2 производилось методом потенциометрического титрования с использованием рН-электрода компании Metrohm. Титрование осуществлялось стандартным раствором NaOH известной концентрации — 0,05N, позволяющим фиксировать изменение рН по мере нейтрализации продуктов ферментативной реакции. Реакцию проводили при температуре 38 °C и рН 7,0, оптимальных для работы фермента в течение 25 мин. Точку эквивалентности определяли графическим методом, строя кривую титрования — зависимость рН от объема добавленного титранта — и выявляя точку, соответствующую эквивалентной точке реакции. Для более точного определения активности фосфолипазы отбиралось 7 точек от начала титрования (проба без добавления фермента, спустя 3 мин работы фермента, 5, 10, 15, 20, 25 мин) (см. рисунок).

Значения гидролитической активности фосфолипазы U, мкмоль/(см³ эмульсии×мин) и удельной активности фосфолипазы Ауд, U/г (см³) были получены математически, путем вычисления двойных обратных координат и квадрата коэффициента корреляции R и построения линейного графика зависимости Y_n от X_n , описанных в ГОСТ 71137-2023. Результаты демонстрируют, что ферментативная активность фосфолипаз не является универсальной, а проявляет выраженную субстратную специфичность и зависит от химического состава и структуры субстрата. Наиболее высокую каталитическую активность фосфолипаза A2 проявила в отношении чистого фосфатидилхолина (60 ± 3 U/г), что указывает на оптимальное взаимодействие фермента с его компонентами. Активность фермента была существенно ниже с лецитином из яиц (50 ± 3 U/г), а минимальная активность наблюдалась с соевым лецитином (40 ± 3 U/г). Такое различие в активности, возможно, обусловлено наличием в соевом лецитине и лецитине из яиц дополнительных липидных компонентов (например, других фосфолипидов,

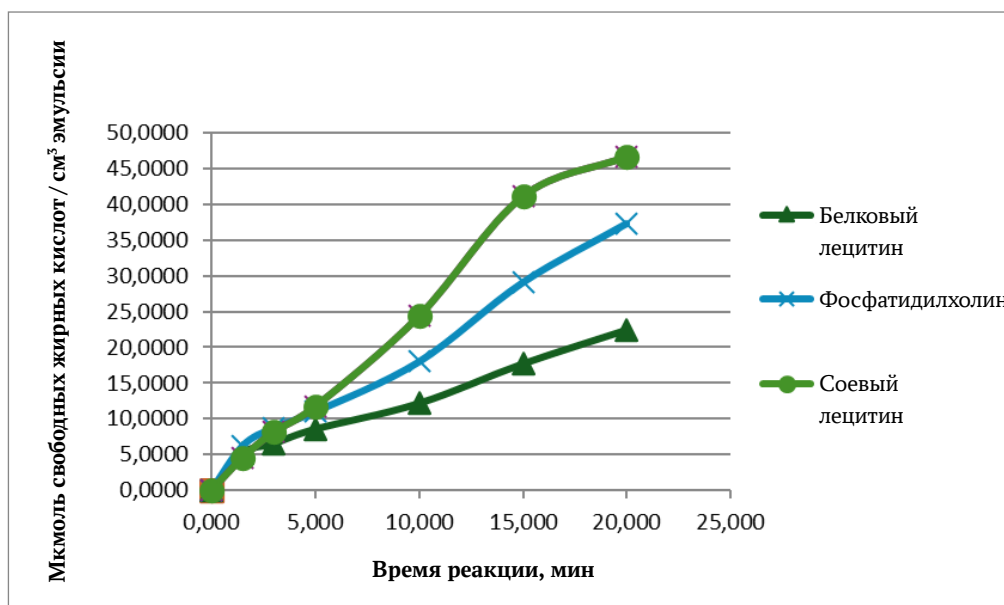


График нарастания содержания свободных жирных кислот
в зависимости от времени взаимодействия фермента с субстратом

жирных кислот или стероидов), способствующих менее эффективному связыванию с ферментом и/или изменению его конформации, что препятствует катализу. Различия в активности также могут быть вызваны и чистой анализируемой фосфолипазой, в которой могут присутствовать другие гидролазы, ингибиторы, или препарат может содержать большое количество посторонних белков. Все это может повлиять на ход анализа и приводить к неточным и неверным значениям активности. Данное исследование подтверждает важность тщательного выбора субстрата при изучении кинетики фосфолипазы A2 и подчеркивает выраженную субстратную модуляцию ее активности. Полученные данные являются основой для дальнейших, более глубоких исследований. Планируются работы по детализации механизма взаимодействия фосфолипазы A2 с различными фосфолипидами, включая структурный анализ формируемых мицелл, изучение влияния чистоты субстратов и их жирнокислотного профиля, оптимизацию методов определения активности с учетом выявленных субстратных особенностей, а также сравнительный анализ активности микробных, животных и растительных фосфолипаз A2 с целью выявления общих закономерностей и различий в их субстратной специфичности.

Литература

1. Камышников В. С. Клинико-патогенетическая и диагностическая значимость исследований общей активности фосфолипазы A2 при формах мембранной патологии, сопровождающихся развитием воспалительно-деструктивных процессов в организме: учеб.-метод. пособие / Белорус. мед. акад. последиплом. образов. Минск: БелМАПО, 2021. 30 с.
2. Кацнельсон Е. И., Чиркин А. А. Клеточная биология: учеб.-метод. комплекс / Витеб. гос. ун-т им. П. М. Машерова. Витебск: ВГУ им. П. М. Машерова, 2021.
3. Das U. N. Cell membrane theory of senescence and the role of bioactive lipids in aging, associated diseases and their therapeutic implications // *Biomolecules*. 2021. Vol. 11. P. 241.
4. Balboa M. A., Balsinde J. Phospholipases: from structure to biological function // *Biomolecules*. 2021. Vol. 11. P. 428.
5. Murakami M., Sato M., Taketomi Y. Updating phospholipase A2 biology // *Biomolecules*. 2020. Vol. 10. P. 1457.
6. Меркульева Ю. А., Чиркова В. Ю., Шарлаева Е. А., Щербаков Д. Н. Фосфолипазы С бактерий рода *Bacillus*: биологическая роль, свойства и области применения // *Биоорганическая химия*. 2021. Т. 47, вып. 4. С. 464–471.