



УДК 577.311*4.042 : 547.565.2'2

© 1991 г.

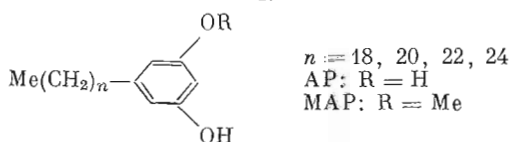
**К. Ю. Гордеев, В. В. Битков, Н. Н. Придачина,
В. А. Ненашев, С. Г. Батраков**

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ 5-*n*-АЛКИЛ(C₁₉—C₂₅)РЕЗОРЦИНЫ — НЕКОНКУРЕНТНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ФОСФОЛИПАЗЫ A₂

*Научно-исследовательская лаборатория биологически активных
веществ гидробионтов МЗ СССР, Москва*

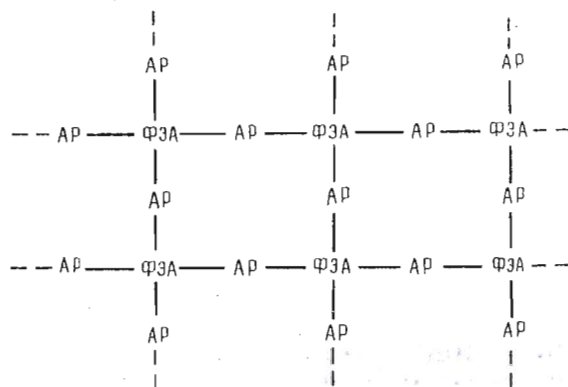
5-*n*-Алкил(C₁₉—C₂₅)резорцины, основные липиды азотфиксирующей бактерии *Azotobacter chroococcum*, ингибируют гидролиз фосфатидилхолина фосфолипазой A₂ яда кобры в диэтиловом эфире и бимолекулярных мембранах. Формирование мембран из смеси указанных липидов в водной среде, содержащей фосфолипазу A₂, удается при наличии в смеси не менее 30 мол.% алкилрезорцинов, причем с увеличением их доли стабильность бислоя возрастает. Результаты измерения электропроводности мембран, полученных из фракции алкилрезорцинов в присутствии и в отсутствие фермента, свидетельствуют о связывании последнего этими соединениями. Степень ингибирования гидролиза фосфатидилхолина в эфире зависит от количественного соотношения алкилрезорцины/фосфолипаза A₂ и практически не зависит от концентрации фосфолипида в реакционной смеси. Ингибирующий эффект моно-О-метилпроизводных алкилрезорцинов как в эфирном растворе, так и в мембранах значительно слабее и, скорее, вызван разбавлением субстрата на поверхности контакта с ферментом. Предполагается, что действие алкилрезорцинов обусловлено, по крайней мере главным образом, регио-неспецифическим присоединением их к фосфолипазе A₂. При этом молекула резорцинолипида связывает два участка белковой молекулы, что, вероятно, приводит к изменению ее конформации.

5-Алкилрезорцины (АР) с неразветвленной углеродной цепью C₁₉—C₂₅ (см. формулу) — основные мембранные липиды цист бактерий рода *Azotobacter* [1, 2]. В незначительных количествах они синтезируются, но выделяются в культуральную среду бактериями других таксонов [3]. Аналогичные липиды найдены в некоторых высших растениях [4—7]. Однако фракции растительных АР отличаются от бактериальных тем, что содержат компоненты с моноеновой углеводородной цепью (иногда до 50% фракции), а длина цепей у компонентов этих фракций варьирует в более широких пределах — от C₁₁ до C₂₇.



АР того и другого происхождения и синтетические аналоги, будучи включенными в искусственные фосфолипидные мембраны, существенно изменяют их физические свойства [8—14]. Они также способны подавлять дыхание митохондрий [11, 15] и бактериальных клеток [3, 8], что, как полагают, является следствием встраивания АР в соответствующие мембраны, обусловленного этим нарушением нативной структуры последних и дезактивирования мембраносвязанных дыхательных ферментов. Считают [8, 11], что механизм действия АР в обоих случаях заключается

Сокращения: АР и MAP — 5-*n*-алкилрезорцины и их моно-О-метилпроизводные, БЛМ — бислойные липидные мембраны, ФХ — фосфатидилхолин, ФЭА — фосфатидилэтаноламин.



Б

Рис. 1. Гипотетические схемы ассоциации липидов в БЛМ, сформированных из смеси АР и ФЭА в мольном соотношении 2 : 1 [9—11] (А) и АР и ФХ в эквимольном соотношении (Б)

в связывании мембранных фосфолипидов посредством водородных связей. Имеются сведения [16], что АР могут ассоциироваться, вероятно, тем же путем с белковыми молекулами и заметно изменять их конформацию.

Ранее нами было показано [9—11], что в бимолекулярных липидных мембранах (БЛМ), полученных из смесей АР с фосфатидилэтаноломином (ФЭА), фосфатидилглицерином или дифосфатидилглицерином, образуются олигомерные и полимерные комплексы, где молекулы АР играют роль связующих звеньев между фосфолипидными молекулами. При определенных мольных соотношениях АР/фосфолипид возникают регулярные полимерные сетчатые структуры (см., например, рис. 1А), и при тех же соотношениях регистрируется максимальная продолжительность жизни и минимальная электропроводность БЛМ.

В свете вышеизложенного можно ожидать повышенную устойчивость фосфолипидов в мембранах, содержащих АР, к ферментативному гидролизу. Экспериментальная проверка этого предположения представляет интерес, в частности, с точки зрения биохимии бактерий рода *Azotobacter*. Дело в том, что переход вегетативных клеток азотобактера в покоящееся состояние — цисты — сопровождается довольно быстрой деградацией мембранных фосфолипидов с почти полной заменой их вновь синтезируемыми АР и структурно родственными соединениями [2], причем, согласно одной из предложенных гипотез [17], свободные жирные кислоты служат исходным материалом в синтезе АР и их производных. Таким образом, взаимоотношения АР и бактериальных липаз требуют специального изучения. В настоящей работе в качестве первого шага к решению этой задачи исследовалось поведение АР, выделенных из штамма *A. chroococcum* 92 [18], в простой модельной системе: фосфатидилхолин (ФХ) — фосфолипаза A_2 (КФ 3.1.1.4) яда кобры *Naja naja oxiana*. Было изучено влияние АР на продолжительность жизни и электропроводность БЛМ, сформированных из смесей АР и ФХ в водной среде, содержащей названный фермент, а также воздействие их на скорость гидролиза ФХ в диэтиловом эфире.

Предварительно была установлена зависимость продолжительности жизни и электропроводности указанных БЛМ от содержания АР в исходной липидной смеси при отсутствии фосфолипазы A_2 (рис. 2, 3). Общая картина изменения обоих параметров не отличается принципиально от

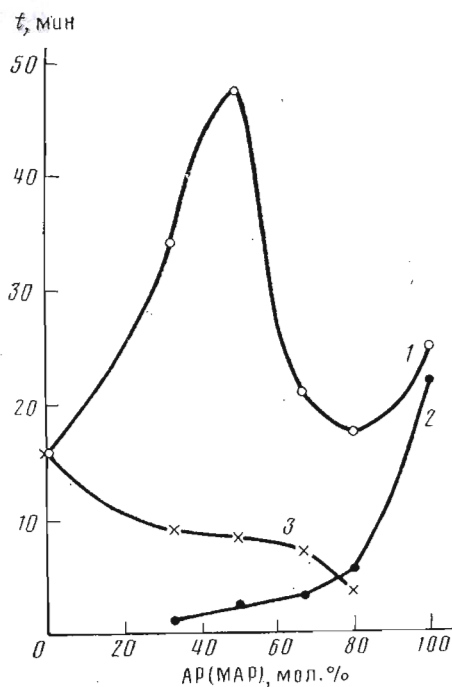


Рис. 2

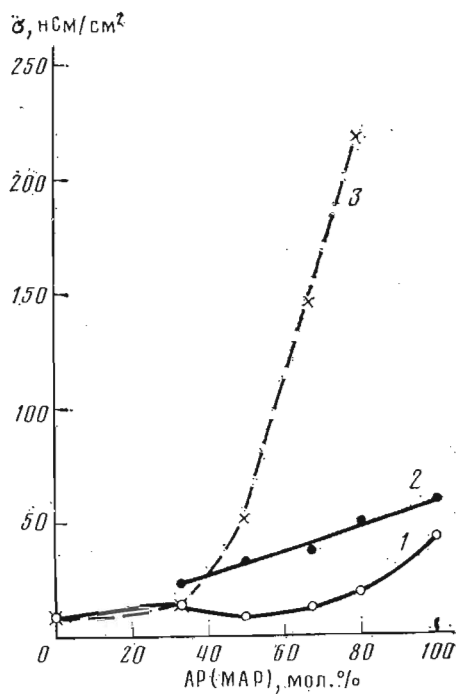


Рис. 3

Рис. 2. Зависимость продолжительности жизни (1) БЛМ, сформированных из смесей ФХ и АР (1, 3) или ФХ и МАР (2), от содержания АР (или МАР) в смеси в отсутствие (1, 2) и в присутствии фосфолипазы A_2 в водной среде (3)

Рис. 3. Зависимость удельной электропроводности (σ) БЛМ, сформированных из смесей ФХ и АР (1, 2) или ФХ и МАР (3), от содержания АР (или МАР) в смеси в отсутствие (1, 3) и в присутствии фосфолипазы A_2 в водной среде (2)

таковой, описанной для БЛМ, сформированных из смесей АР с ФЭА или другими фосфолипидами [9—11]: с увеличением содержания АР устойчивость бислоя возрастает, достигает максимума при определенном соотношении липидов и затем падает с дальнейшим обогащением липидной смеси алкилрезорцинами; для проводимости же характерна обратная зависимость. В данном случае максимальная продолжительность жизни, равно как и минимальная электропроводность БЛМ, наблюдалась при эквимольных количествах ФХ и АР в смеси. Если эти результаты интерпретировать аналогично тому, как это делалось в работах [9—11], то экстремальные величины рассматриваемых параметров следует связать с возникновением в бислое линейных полимерных ассоциатов с чередующимися молекулами ФХ и АР (рис. 1Б). В изучавшихся ранее БЛМ, которые формировались из смесей АР и ФЭА с возрастающей мольной долей АР [9, 11], появление подобных ассоциатов мало отражалось на ходе изменения тех же параметров, а экстремальные величины последних соответствовали (по крайней мере формально) образованию сетчатых полимерных структур (рис. 1А). Однако необходимо учесть то обстоятельство, что в состав молекулы ФХ наряду с кислотной фосфатной группировкой входит сильноосновная четвертичная аммониевая группа, а поэтому вполне возможна стабилизация полимерных цепей Б (рис. 1) за счет ионных взаимодействий между ними. Введение в бислой дополнительных молекул АР, очевидно, препятствует созданию регулярной структуры, а это должно приводить к возрастанию электропроводности и сокращению жизни БЛМ, что и наблюдалось в эксперименте (рис. 2, 3).

Для проверки предложенного объяснения была определена зависимость электропроводности и продолжительности жизни БЛМ, сформированных из смесей ФХ и моно-О-метилпроизводных АР (МАР), от мольного соотношения компонентов. Молекулы МАР имеют лишь одну свободную гидроксильную группу, а поэтому неспособны выполнять функцию

связующего звена между молекулами ФХ подобно АР. Измерения показали, что с увеличением содержания МАР в липидной смеси устойчивость БЛМ снижается (рис. 2), а проводимость плавно возрастает (рис. 3). Указанные закономерности, очевидно, обусловлены разрыхлением мембран молекулами МАР, они же косвенно подтверждают вероятность образования в бислое олигомерных и полимерных ассоциатов типа Б (рис. 1) с участием АР.

Получение БЛМ из индивидуальной фракции ФХ в водной среде, содержащей фосфолипазу A_2 в концентрации 0,1 мкМ, оказалось невозможным, что согласуется с опубликованными данными (см., например, [19]). После добавления к ФХ около 30 мл.% АР бислой удовлетворительно формировался и сохранялся не менее 1 мин. С повышением доли АР в липидной смеси продолжительность жизни БЛМ увеличивалась, причем эта зависимость графически описывается плавной кривой (рис. 2). Отсюда есть основание полагать, во-первых, что АР ингибируют ферментативный гидролиз ФХ, а во-вторых, что фосфолипаза A_2 , связываясь с одним или двумя липидными компонентами БЛМ, препятствует образованию полимерных структур типа Б (рис. 1). Второе предположение подтверждается результатами измерения электропроводности тех же БЛМ. Они представлены на рис. 3. Можно видеть, что проводимость бислоя находится практически в линейной зависимости от мольной доли АР в липидной смеси. Поэтому мало вероятно, что в ходе увеличения этой доли в БЛМ происходят какие-либо значительные структурные модификации — возникновение олигомерных и полимерных ассоциатов и т. п. Важно отметить, что электропроводность БЛМ, состоящей только из АР, в присутствии фосфолипазы A_2 возрастает на ~40% (рис. 3), т. е. фермент безусловно связывается с этим липидом, что, скорее всего, и препятствует полимолекулярной ассоциации ФХ и АР. Замена АР на МАР в липидной смеси приводила к резкому снижению устойчивости бислоя. Так, продолжительность жизни БЛМ, полученных из смесей МАР и ФХ с мольными соотношениями 1 : 1 и 2 : 1, оказалась в 3 и 4 раза меньше соответственно по сравнению с временем существования БЛМ, сформированных из аналогичных смесей АР и ФХ.

Изложенные выше данные позволяют назвать три возможные причины повышения устойчивости БЛМ алкилрезорцинами в условиях ферментативного липолиза: 1) регионеспецифичное связывание АР с молекулами фосфолипазы A_2 , которое изменяет конформацию последних, снижая их каталитическую активность, или/и затрудняет ориентацию, необходимый для ассоциации с ФХ; 2) образование каталитически неактивных комплексов типа ФХ—АР—фермент; 3) соединение липидов в низкомолекулярные комплексы типа ФХ—АР, АР—ФХ—АР и т. п., в которых конформационная подвижность ФХ ограничена, что затрудняет ее ассоциацию с активным центром фермента. Для оценки вероятности перечисленных путей ингибирования было изучено влияние АР на скорость гидролиза ФХ в органическом растворителе — диэтиловом эфире.

Известно [20], что скорость гидролиза липидов водными растворами липаз в присутствии органического растворителя или без него в значительной степени зависит от площади поверхности раздела фаз. Для того чтобы максимально устранить ошибку, связанную с этой зависимостью, в настоящей работе избрана методика [21], согласно которой гидролиз проводят при концентрации воды, не вызывающей расслоение реакционной массы. Такая методика, во-первых, обеспечивает практически одновременное участие в реакции всех молекул фермента, находящихся в реакционной смеси, во-вторых, сводит к минимуму различие в соотношении концентраций субстрата (в данном случае ФХ) и негидролизуемого компонента смеси (АР) в растворе и в зоне реакции, т. е. на поверхности контакта с ферментом, а в-третьих, позволяет анализировать с высокой точностью состав липидов в ходе гидролиза при помощи ВЭЖХ отбираемых проб. Для упрощения обработки и интерпретации результатов эксперимента во всех проведенных опытах для гидролиза ФХ как в присутствии, так и в отсутствие АР использовалось одинаковое количество фосфоли-

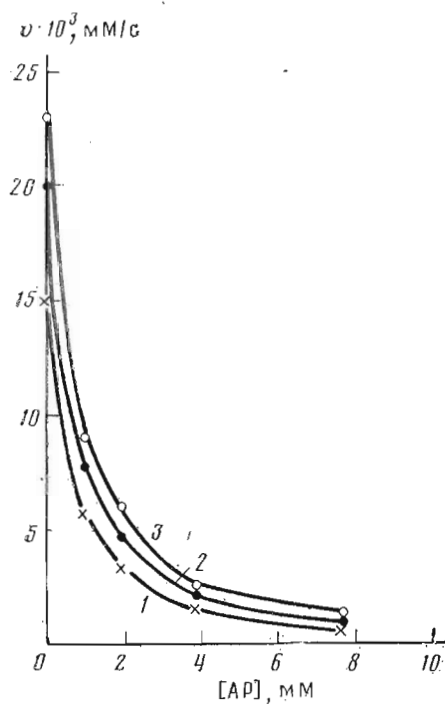


Рис. 4

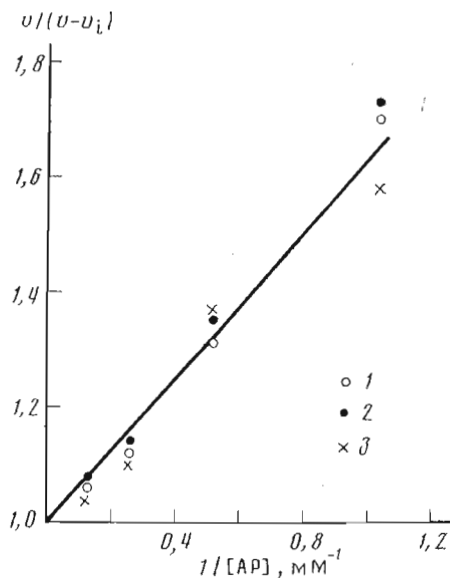


Рис. 5

Рис. 4. Зависимость скорости гидролиза (v) ФХ от концентрации АР в реакционной смеси при $[\text{ФХ}]_0$: 1 — 2,05; 2 — 3,42; 3 — 4,78 мМ. Остальные условия см. в «Экспер. части»

Рис. 5. Графическое изображение по методу Уэбба ингибирования алкилрезорцинами гидролиза ФХ фосфолипазой A_2 при $[\text{ФХ}]_0$ 2,05 (1), 3,42 (2) и 4,78 (3) мМ. Остальные условия см. в «Экспер. части»

пазы A_2 при постоянном объеме реакционной смеси и содержании в ней воды.

На рис. 4 представлена найденная зависимость скорости гидролиза (v) ФХ от концентрации АР ($[\text{АР}]$) в реакционной смеси при трех исходных концентрациях фосфолипида ($[\text{ФХ}]_0$): 2,05; 3,42 и 4,78 мМ. Видно, что скорость гидролиза резко падает с увеличением концентрации АР от 0 до 3,5—4,0 мМ, но сравнительно мало изменяется при дальнейшем повышении ее. Концентрации АР, снижающие скорость реакции на одну и ту же долю, для всех трех $[\text{ФХ}]_0$ довольно близки. Так, уменьшение скорости на 50% при вышеуказанных $[\text{ФХ}]_0$ регистрировалось при концентрации АР $0,72 \pm 0,04$ мМ.

Из описанных наблюдений достаточно ясно, что степень ингибирования гидролиза ФХ зависит только от концентрации АР, а точнее, от количественного соотношения АР/фермент. Следовательно, ингибирование фермента происходит исключительно или, по крайней мере, главным образом за счет его неспецифичной ассоциации с АР, т. е. имеет место неконкурентное ингибирование согласно классификации Келланда [22]. Последнее подтверждается результатами графического анализа зависимости $v/(v - v_i)$ от $1/[\text{АР}]$ (v_i — скорость реакции в присутствии ингибитора) по методу Уэбба (рис. 5). Эта зависимость очень близка к линейной и практически одинакова для трех начальных концентраций ФХ, что характерно для указанного типа ингибирования [22].

В 7,7 мМ концентрации АР снижают скорость гидролиза ФХ на ~95%. В этих условиях на одну молекулу фосфолипазы A_2 приходится около 4500 молекул АР. Хотя на основании рассмотренных здесь данных нельзя даже приблизительно определить число молекул АР, присоединение которых необходимо для 95%-ной инактивации фермента, тем не

менее очевидно, что связь белковой молекулы, по крайней мере с большинством ассоциированных с ней молекул АР, весьма лабильна. Для сопоставления интересно упомянуть результаты работы [16], авторы которой изучали влияние 5-гексадецилрезорцина на триптофановую флуоресценцию спектрина. Было установлено, что снижение интенсивности флуоресценции на 30% происходит при мольном отношении АР/белок не менее 1000. С другой стороны, в экспериментах с той же фосфолипазой А₂, иммобилизованной на сфероне СН 300, нами установлено, что предварительное инкубирование ферментного препарата с 6,25 мМ раствором АР в эфире приводит к уменьшению скорости гидролиза индивидуальной фракции ФХ в 1,3 раза по сравнению со скоростью аналогичной реакции, катализируемой иммобилизованным ферментом, не подвергавшимся такой обработке. Поэтому можно думать, что какое-то число молекул АР относительно прочно присоединяется к белку, не оказывая существенного воздействия на ферментативную активность.

Выше говорилось, что влияние МАР на продолжительность жизни БЛМ, формируемых в водной среде, содержащей фосфолипазу А₂, невелико по сравнению с АР. Изучение эффекта этих производных на скорость гидролиза ФХ в эфире в условиях, принятых в настоящей работе, выявило лишь слабое ингибирование — при концентрации МАР 3,85 мМ и начальной концентрации ФХ 2,05 мМ отношение v/v_0 оказалось равным 1,9, тогда как для подобной смеси АР и ФХ оно было около 12. Не исключено, что наблюдаемый эффект МАР на самом деле — следствие «разбавления» субстрата на поверхности контакта с ферментом. Такое же влияние на скорость гидролиза фосфолипидов фосфолипазой А₂ оказывают некоторые другие амфифильные соединения [23, 24]. Молекула МАР, имея свободную гидроксильную группу, способна в принципе ассоциироваться с белком через водородную связь. Однако резкое различие в ингибирующем действии АР и МАР приводит к выводу, что главная причина подавления первыми каталитической активности фосфолипазы А₂ заключается в связывании молекулой АР двух участков белковой молекулы, что, видимо, отражается на конформации последней. В случае БЛМ при возникновении подобных связей, кроме того, особенно затрудняется ассоциация фермента с ФХ.

Результаты настоящей работы, конечно, не дают достаточного основания распространять обнаруженное свойство АР на взаимоотношения их с клеточными липазами азотобактера в процессе инцистирования. Если же АР все-таки оказывают на них аналогичное действие (что вполне вероятно, судя по обсуждавшимся здесь данным), то этим может быть обусловлено сохранение некоторого количества фосфолипидов (2—4%) в мембранах цист в условиях полного прекращения их синтеза. Предполагают [2], что оставшиеся фосфолипиды играют важную роль в формировании структуры липидного бислоя, состоящего главным образом из АР и близких по химической природе липидов.

Экспериментальная часть

Материалы и общие методы. Исследовалась фракция АР, выделенная из клеток *A. chroococcum* 92 [18], со следующим составом гомологов: $n = 18$ (30 мол. %), 20 (64), 22 (4), 24 (2). МАР получали из этой же фракции ранее описанным способом [10]. ФХ и ФЭА выделяли из головного мозга крупного рогатого скота [25]. Использовали фосфолипазу А₂ из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*, выпускаемую фирмой «Кемотех» (ЭССР), с активностью 1500 МЕ/мг.

Состав липидов в процессе гидролиза ФХ определяли при помощи ВЭЖХ на хроматографе «Милихром» снабженном колонкой (50 × 2 мм) с аминопропилированным силикагелем Silasorb NH₂, 5 мкм (Lachema, ЧСФР), в изократическом режиме элюирования системой MeCN—MeOH—0,15 мМ водный (NH₄)H₂PO₄ (6 : 3 : 1 по объему) [26]. Вымываемые липиды детектировали по оптической плотности элюата при 206 нм. В качестве внутреннего стандарта применяли указанный выше ФЭА. Время удер-

живания ФХ, жирных кислот, лизо-ФХ и ФЭА — 1,80; 0,85; 2,35 и 3,10 мин соответственно.

БЛМ получали из растворов индивидуальных липидов и смесей липидов в гептане (5—10 мг/мл). Водной средой служил раствор, содержащий 10 мМ трис-НСl и 150 мМ КCl (рН 7,2 $\pm$ 0,1); в соответствующих опытах к этому раствору добавляли фосфолипазу A_2 до 0,1 мкМ концентрации. Продолжительность жизни и удельную электропроводность БЛМ определяли при 20—22° С ранее описанными методами [9, 11]. Выше приведены средние величины этих параметров, каждая из которых вычислена по результатам не менее чем 10 измерений первого из них и 25 измерений второго. Стандартная ошибка среднего не превышала 20 и 10% соответственно.

Гидролиз ФХ раствором фосфолипазы A_2 . К термостатированному при 20° С раствору ФХ или смеси ФХ с АР либо МАР в 2 мл безводного эфира добавляли при интенсивном перемешивании 20 мкл ферментного раствора (активность — 75 МЕ), приготовленного растворением 5 мг фосфолипазы A_2 в 2 мл 0,2 М боратного буфера с рН 7,5. При непрерывном перемешивании из реакционной смеси отбирали пробы по 40 мкл через 20, 30, 40, 60, 120, 180, 300 и 480 с после добавления фермента. Каждую пробу смешивали с 2 мл MeOH и центрифугировали 20 мин при 8000g. Надосадочную жидкость упаривали досуха в вакууме, остаток растворяли в 20 мкл указанной выше хроматографической системы растворителей, содержащей 0,1 мкг ФЭА, и раствор анализировали при помощи ВЭЖХ. Скорость реакции вычисляли обычным способом [22].

Иммобилизация фосфолипазы A_2 . Для иммобилизации фермента на сфероне СН 300 (Lachema, ЧСФР), содержащем свободные гидразиновые группы, применяли обычную методику [27, 28] с незначительной модификацией.

К перемешиваемой при 0° С суспензии 600 мг сферона СН 300 (размер частиц 0,1—0,2 мм) в 25 мл 2 н. соляной кислоты добавляли по каплям в течение 30 мин 20 мл 2% водного раствора $NaNO_2$, после чего перемешивание продолжали еще 1 ч при 0—4° С. Сорбент отфильтровывали, промывали 0,1 М Na/K-фосфатным буфером с рН 7,6 (4 $\times$ 5 мл) и вносили в охлажденный до 0° С раствор 50 мг 1,6-диаминогексана (Serva, ФРГ) в 10 мл того же буфера. Смесь оставляли на 48 ч при 0° С, после чего обрабатывали 10 мл 0,01% раствора фенола в 10% водном Na_2CO_3 . Через 30 мин сорбент отфильтровывали и промывали на фильтре вышеуказанным буфером, разбавленным водой в 10 раз (4 $\times$ 5 мл), затем этим же раствором, содержащим 0,5 М NaCl (2 $\times$ 5 мл), и суспендировали в 10 мл 0,1 М водного раствора NaOAc (рН 4,5). К суспензии при 0° С добавляли 2,5 мг фосфолипазы A_2 и 2,5 мг хлоргидрата N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (Merck, ФРГ) и смесь перемешивали 22 ч при той же температуре. Иммобилизованный ферментный препарат отфильтровывали и промывали последовательно раствором, содержащим 0,1 М NaOAc и 1 М NaCl (рН 4,5), 0,01 М раствором NaOAc (рН 4,5) и 50 мМ раствором трис-НСl, содержащим 50 мМ EDTA (по 200 мл). Полученный ферментный препарат содержал 1,7 мг белка, имел активность 595 МЕ/г и относительную активность 14%.

Гидролиз ФХ иммобилизованной фосфолипазой A_2 . а) К термостатированному при 20° С раствору 5 мг ФХ в 2 мл эфира, содержащего 0,9% (по объему) воды, добавляли при интенсивном перемешивании иммобилизованный ферментный препарат (общая активность 70 МЕ). Перемешивание продолжали при той же температуре, контролируя ход гидролиза при помощи ВЭЖХ отбираемых проб, как описано выше.

б) К раствору 5 мг АР в 2 мл эфира, содержащего 0,9% (по объему) воды, добавляли иммобилизованную фосфолипазу A_2 с общей активностью 70 МЕ. Суспензию перемешивали 20 мин при 20° С, после чего фильтровали, ферментный препарат промывали 5 мл указанного водного эфира и немедленно использовали для гидролиза ФХ в вышеописанных (а) условиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Su C.-J., Reusch R. N., Sadoff H. L. // J. Bacteriol. 1981. V. 147. № 1. P. 80—90.
2. Reusch R. N., Sadoff H. L. // Nature. 1983. V. 302. № 5905. P. 268—270.
3. Осипов Г. А., Эль-Регистан Г. И., Светличный В. А., Козлова А. Н., Дуда В. И., Капрелянц А. С., Помазанов В. В. // Микробиология. 1985. Т. 54. Вып. 2. С. 186—190.
4. Tzuman J. H. P., Tychopoulos V., Chan P. // J. Chromatogr. 1984. V. 303. № 1. P. 137—150.
5. Kozubek A. // Acta aliment. polon. 1985. V. 25. № 2. P. 185—198.
6. Scannell R. T., Barr J. R., Murty V. S., Hecht S. M. // J. Amer. Chem. Soc. 1988. V. 110. № 11. P. 3650—3651.
7. Bullock L. M., Drewes S. E. // S.-Afr. J. Chem. 1989. V. 42. № 2. P. 76—80.
8. Капрелянц А. С., Сулейменов М. К., Сорокина А. Д., Деборин Г. А., Эль-Регистан Г. И., Стоянович Ф. М., Лилле Ю. Э., Островский Д. Н. // Биол. мембраны. 1987. Т. 4. № 3. С. 254—261.
9. Битков В. В., Ненасhev В. А., Хашаев З. Х.-М., Придачина Н. Н., Шишлов Ю. В., Батраков С. Г. // Биол. мембраны. 1988. Т. 5. № 10. С. 1055—1060.
10. Битков В. В., Ненасhev В. А., Хашаев З. Х.-М., Придачина Н. Н., Батраков С. Г. // Биол. мембраны. 1990. Т. 7. № 2. С. 135—140.
11. Битков В. В., Ненасhev В. А., Придачина Н. Н., Проневич Л. А., Хашаев З. Х.-М., Батраков С. Г. // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1991. № 2. С. 190—201.
12. Kozubek A. // Acta biochim. polon. 1987. V. 34. P. 357—367.
13. Kozubek A. // Acta biochim. polon. 1987. V. 34. P. 387—394.
14. Kozubek A., Jezierski A., Sikorski A. F. // Biochim. et biophys. acta. 1988. V. 944. № 3. P. 465—472.
15. Ненасhev В. А., Придачина Н. Н., Проневич Л. А., Батраков С. Г. // Биохимия. 1989. Т. 54. Вып. 5. С. 784—787.
16. Sikorski A. F., Michalak K., Bobrowska M., Kozubek A. // Stud. Biophys. 1987. V. 121. № 3. P. 183—191.
17. Батраков С. Г., Придачина Н. Н., Кругляк Е. Б., Новогрудская Е. Д., Чекакина Е. В. // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1984. № 2. С. 177—184.
18. Батраков С. Г., Придачина Н. Н., Кругляк Е. Б., Новогрудская Е. Д. // Химия природ. соединений. 1977. № 4. С. 494—499.
19. Lesslauer W., Slotboom A. J., Postema N. M., De Haas G. H., van Deenen L. L. M. // Biochim. et biophys. acta. 1968. V. 150. P. 306—308.
20. Брокерхоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты: Пер. с англ. М.: Мир, 1978. С. 23—30.
21. Wells M. A., Hanahan D. J. // Biochemistry. 1969. V. 8. № 1. P. 414—424.
22. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1990. С. 183—268.
23. Hendrickson H. S., Dennis E. A. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. P. 5734—5739.
24. Yu L., Deems R. A., Hajdu J., Dennis E. A. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. № 5.
25. Rouser G., Kritchevsky G., Heller D., Lieber E. // J. Amer. Oil Chem. Soc. 1963. V. 40. № 5. P. 425—454.
26. Kikuo S. // Agr. and Biol. Chem. 1986. V. 50. № 10. P. 2643—2645.
27. Туркова Я. Аффинная хроматография. М.: Мгр, 1980. С. 202.
28. Аффинная хроматография. Методы / Ред. Дин П., Джонсон У., Мидл Ф. М.: Мир, 1988. С. 130—191.

Поступила в редакцию 14.III.1991

K. Yu. GORDEEV, V. V. BITKOV, N. N. PRIDACHINA,
V. A. NENASHEV, S. G. BATRAKOVBACTERIAL 5-*n*-ALKYL(C₁₀—C₂₅)RESORCINOLSARE NON-COMPETITIVE INHIBITORS OF PHOSPHOLIPASE A₂

Research Laboratory of Biologically Active Substances of Hydrobionts, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

5-*n*-Alkyl(C₁₀—C₂₅) resorcinols (AR), which are the major cell lipids of the nitrogen-fixing bacterium *Azotobacter chroococcum*, are found to inhibit the hydrolysis of phosphatidylcholine (PC) catalyzed by the cobra venom (*Naja naja oxiana*) phospholipase A₂ in both diethyl ether solution and bimolecular lipid membranes (BLM). In the phospholipase A₂-containing aqueous medium, the BLM could be formed from a mixture of PC and AR provided that AR content was at least 30 mol. %. Life-time of the bilayer extended with the increase of AR percentage in the parent lipid mixture. Measurements of the conductivity of the BLM prepared from AR alone in the presence or otherwise of the enzyme revealed association between AR and phospholipase A₂. Inhibition of the PC hydrolysis in the ether solution depended substantially on the AR/enzyme ratio but only slightly on the PC concentration. The inhibitory effect of mono-O-methylated AR on the same reaction was much weaker than of AR itself either in ether solution or in the BLM. Therefore this effect may well be attributed to «dilution» of the substrate on the surface, where it comes in contact with the enzyme. The observed effect of AR is assumed to be due to their non-specific binding to the phospholipase A₂ molecules, with an AR molecule combining with two sites of the protein thus giving rise to its conformational modification.