

**АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ АН РУз**

На правах рукописи

УДК 577.152.193:158.2:581.19

АБДУЛЛАЕВА МУБОРАК МАХМУСОВНА

**НЕКОТОРЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПРЕВРАЩЕНИЯ
ФОСФОЛИПИДОВ В СЕМЕНАХ ХЛОПЧАТНИКА И ДРУГИХ
ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ В ПРОЦЕССЕ ИХ ПРОРАСТАНИЯ И
СОЗРЕВАНИЯ**

03.00.04 - Биохимия

А в т о р е ф е р а т

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Ташкент – 2006

Работа выполнена на кафедрах биохимии и биотехнологии
биолого-почвенного факультета Национального университета Узбекистана.

Научный консультант: доктор биологических наук, проф. Валиханов М.Н.

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук,
академик АН РУз

А.П. Ибрагимов

Доктор биологических наук,
профессор

Т.А. Бабаев

Доктор биологических наук

Р.М. Усманов

**Ведущая организация: Институт Биоорганической химии АН
РУз им. академика А.С. Садыкова**

Защита состоится " ____ " _____ 2006 г. в ____ часов на заседании
Специализированного Совета Д 015.16.01 по защите диссертаций на соискание
ученой степени доктора наук при институте Биохимии АН РУз по адресу:
700143 Ташкент-143, ул. Х. Абдуллаева, 56. факс: (998) 162-24-41, тел. (998
71) 162-25-66.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института Биохимии
АН РУз.

Автореферат разослан " ____ " _____ 2006 г.

**Ученый секретарь
Специализированного Совета,
кандидат биологических наук**

Усманова Г.У.

Характеристика работы

Актуальность проблемы. Обмен фосфорсодержащих соединений в растительном организме продолжает привлекать внимание исследователей. В нем участвуют такие важнейшие макромолекулы, как белки, нуклеиновые кислоты, углеводы и липиды. Фосфолипиды, содержащие небольшую (1-5%) долю общего фосфора семян, занимают в фосфорном обмене особое место. Это обусловлено тем, что являясь основными компонентами клеточных мембран, они определяют их функциональную и структурную целостность. В процессах прорастания, вегетации и созревания семян происходит интенсивное обновление клеточных мембран (X.Wang, 2000, 2002) и, как следствие, отмечаются глубокие изменения как в составе фосфолипидов, так и в их количественном соотношении.

Обновление фосфолипидов клеточных мембран осуществляется, как известно, следующими путями (Кребс, 1981):

1. синтез фосфолипидов в микросомах и их последующий транспорт с помощью липидпереносящих белков;
2. обмен с липопротеидами, происходящий на наружной поверхности плазматической мембраны;
3. замена жирнокислотных и (или) полярных групп фосфолипидов путем ферментативных превращений.

Наименее изучен третий из перечисленных путей. Имеются лишь данные о том, что в обновлении фосфолипидов может принимать участие фосфолипаза Д (Фл-Д) (M. Heller, 1978). Поскольку сравнительные сведения о фосфолипидах семян и целого растения хлопчатника и других растений в онтогенезе явно недостаточны, в литературе имеется сравнительно мало работ, имевших своей целью исследование роли Фл-Д при прорастании и созревании семян хлопчатника. Данные по участию Фл-Д в процессах превращения фосфолипидов, по-видимому, следует считать предварительными. Также отсутствуют четкие экспериментальные доказательства из какого источника и каким образом поступает необходимый фосфор при синтезе и обновлении фосфолипидов в семенах, проростках при вегетации и созревании семян хлопчатника и других растений.

Экспериментально доказана лишь центральная роль фитина как основного фосфатсодержащего запасного вещества семян. В этой общей картине метаболизма фосфора у хлопчатника (и других растений) все еще остаются недостаточно изученными некоторые важные вопросы, которые делают ее неполной. Так, недостаточно изучена взаимосвязь изменений фосфолипидного состава вегетативных и генеративных органов хлопчатника, которая, несомненно, поможет глубже понять основные закономерности фосфорного обмена целого растения. Достаточно значимыми представляются полученные в ходе работы данные о непосредственной связи между накоплением фосфора в составе фосфолипидов и потреблением фитина у хлопчатника в период прорастания семян. Вышеизложенное и обусловило актуальность и новизну проведенного исследования.

Настоящая работа выполнена в рамках тематики «Фосфорный метаболизм растений», разрабатываемой на кафедре биохимии и является логическим продолжением оригинальных сравнительных исследований фосфорного обмена хлопчатника и некоторых других растений и имела своей целью изучение закономерностей превращений фосфолипидов в ходе развития растений от семени до семени, а также принципов функционирования и регуляции основных ферментов, принимающих участие в этих превращениях.

Цель и задачи работы: Основной целью диссертационной работы явилось сравнительное исследование фосфолипидного состава семян, проростков, частей растения, созревающих семян хлопчатника и оценка динамики фосфолипидов хлопчатника и других растений в онтогенезе; получение прямых экспериментальных доказательств участия фосфолипазы Д в процессах обновления фосфолипидов мембран в ходе прорастания, вегетации и созревания семян хлопчатника; установление одного из возможных путей трансформации фосфора семян хлопчатника при обновлении фосфолипидов и выяснение роли принимающих участие в его обмене ферментов.

В соответствии с поставленной целью в работе решались следующие задачи:

- изучение основных закономерностей превращений фосфолипидов хлопчатника и некоторых других растений в онтогенезе;
- выявление механизмов превращений фосфолипидов по стадиям развития растений и ключевой роли ферментов в этих процессах;
- исследование процессов накопления фосфолипидов в ходе созревания семян;
- изучение закономерностей функционирования ключевых ферментов в процессах превращения фосфолипидов в модельных системах;
- разработка на основе полученных в работе экспериментальных сведений некоторых новых биотехнологических процессов.

Научная новизна. Впервые проведено систематическое сравнительное исследование фосфолипидного состава вегетативных и генеративных органов хлопчатника и некоторых других растений (арахиса, сои, пшеницы, кукурузы и фасоли) в процессе их развития, выявившее некоторые общие закономерности изменений состава фосфолипидов в процессах роста и развития;

- впервые исследована динамика изменения содержания фитина в созревающих семенах хлопчатника;
- выявлена взаимосвязь между активностью фитазы и фосфолипазы Д в созревающих семенах хлопчатника, оказывающая непосредственное влияние на содержание в них фитина и фосфолипидов;
- впервые продемонстрирована возможность синтеза фосфатидилметанола *in vivo* растениями хлопчатника при поливе растворами, содержащими метанол и дейтерометанол (CD_3OH).

Практическое значение. Подробно проанализирована реакция трансалкилирования фосфолипидов Фл-Д из хлопчатника *in vivo* и в модельных системах (силикагель-лецитин-вода). Подобраны оптимальные условия ферментативного синтеза необычного для природных объектов фосфолипида - фосфатидилметанола. Изучено действие различных соединений на активность и стабильность фосфолипазы Д. Система фитаза – фосфолипаза Д предлагается для синтеза редких или необычных фосфолипидов из доступных источников. Впервые предложена технологическая схема выделения мио-инозита из доступного сырья.

Полученные в работе данные способствуют пониманию закономерностей сопряженного функционирования фитазы и Фл-Д в хлопчатнике и некоторых других важных технических культурах. Результаты исследования роли фитазы и фосфолипазы Д несомненно имеют теоретическое значение и представляют практический интерес в качестве основы для использования биотехнологических препаратов с целью получения ценных соединений для фармакологической и медицинской промышленности, а также в плане разработки новых подходов в селекционном процессе.

Материалы диссертации вошли в спецпрактикум «Биохимия липидов», в практические учебные занятия «Большой практикум» кафедры Биохимии и учебно-методические пособия.

Основные положения, выносимые на защиту:

- характеристика изменений фосфолипидного состава семян хлопчатника и некоторых высших растений при прорастании, развитии и созревании;
- общие закономерности изменений в составе фосфолипидов вегетативных и генеративных органов хлопчатника в процессе развития от семени до семени;
- основные закономерности функционирования фитазы и фосфолипазы Д в процессах развития растений хлопчатника и других технических культур;
- характеристика условий реализации трансферазной функции фосфолипазы Д растений (хлопчатник) в модельных системах;
- исследование синтеза фосфатидилинозита из фосфолипидов и мио-инозита фосфолипазой Д из растений; разработка методики получения препаратов фосфолипазы Д и фитина из хлопчатника и оптимизация условий ферментативного получения мио-инозита в системе вода-органический растворитель;

Апробация работы. Результаты исследования доложены и обсуждены на I съезде физиологов растений Узбекистана (Ташкент, 1991), V конференции биохимиков республик Средней Азии и Казахстана (Ташкент, 1991), научной конференции "Структура и функция биологических мембран" (Ташкент, 1995), научной конференции "Современные проблемы биологии и экологии" (Ташкент, 1995), Международной конференции "Действие физических и химических факторов на процессы обмена веществ в

организме" (Андижан, 1997), II Республиканской научной конференции молодых ученых и студентов (Ташкент, 1997), Международной конференции "Состояние и перспективы развития биотехнологии растений" (Алматы, 1997), научной конференции "Проблемы современной микробиологии и биотехнологии" (Ташкент, 1999), Международном симпозиуме "Современные проблемы микробной биохимии и биотехнологии (Пушино, 2000), II Балканском конгрессе (Стамбул, 2000), Конференции "Биологик, экологик ва агротупрокшунослик таълими муаммолари ва истикболи" (Ташкент, 2001), конференции «Биология –наука XXI века» (Пушино, 2002), конференции «Биотехнологиянинг амалий истикболлари» (Ташкент, 2002), 9 Международном симпозиуме по химии природных соединений (Пакистан, Карачи, 2004), конференции «Биология –наука XXI века» (Пушино, 2004), конференции «Биология–наука XXI века» (Пушино, 2005), конференции «Ёш олимларнинг фан-техника тараккиётида тутган урни» (Тошкент, 2005).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 56 работ, из них журнальных статей - 29, тезисов - 24, получено 3 патента.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 233 стр. машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы (1 глава), описания объектов и методов исследования (1 глава), изложение результатов собственных исследований и их обсуждение (3 главы), заключения, выводов и списка цитированной литературы, включающего 351 наименование. Работа иллюстрирована 33 рисунками и 22 таблицами.

Благодарности. Выражаю искреннюю и глубокую признательность научным консультантам - профессору Валиханову М.Н. и профессору Рахимову М.М. за всестороннюю помощь и постоянное внимание к моей работе. Считаю своим приятным долгом выразить благодарность сотрудникам кафедр биохимии и биотехнологии биолого-почвенного факультета Национального университета Узбекистана за поддержку и методическую помощь при выполнении настоящей работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава 1 диссертационной работы посвящена анализу современного состояния исследований фосфолипидного обмена растений, основных путей превращения фосфолипидов в процессе развития растения от семени до семени, роли растительных фосфолипаз и других гидролитических ферментов в регуляции клеточных функций и биотехнологических способов получения фосфолипидов, а также других ценных препаратов для фармакологии, медицины и сельского хозяйства.

МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили: хлопчатник (*Gossypium hirsutum L.*) сорта 108-Ф, арахис (*Arahyus hypogaea L.*) сорта Перзуван 46/2, соя (*Glycine hispida L.*) сорта Дустлик, кукуруза (*Zea mays L.*) сорта БЦ - 6661, пшеница (*Triticum aestivum L.*) сорта Юна и фасоль (*Phaseolus vulgaris L.*) сорта Вигна штамбовая 661. В работе использовали додецилсульфат натрия (Colnbrook Bucks, England), Трис и наборы для диск-электрофореза (Reanal, Hungary), носители и белки-свидетели для гельфильтрации, хроматографии, электрофореза и определения молекулярных масс ферментов (Pharmacia, Sweden), силикагель марки КСК-2, ацетат натрия, кислоты: серную, соляную, уксусную и хлорную, квалификации х.ч. (Реахим, Россия). Остальные использованные реактивы имели квалификацию ч.д.а.

Фосфолипиды из органов хлопчатника и других исследованных растений выделяли по методу, предложенному Давсоном и др. [1967]. Фосфолипидный состав определяли, используя микро-ТСХ [Кейтс, 1975]. Фосфолипиды разделяли двумерной хроматографией с использованием следующих систем растворителей: 1) хлороформ:метанол:25%-ный аммиак (65:25:5), 2) хлороформ:ацетон: метанол: ледяная уксусная кислота:вода (6:8:2:2:1). После разделения фосфолипиды выявляли и идентифицировали с помощью специфических реагентов [Бергельсон и др., 1982] Количественно фосфолипиды определяли методом Васьковского [1998].

Фосфолипазу Д из семян хлопчатника выделяли по методу Бабаева и др. [1990].

Гидролитическую активность фосфолипазы Д определяли по методу Давсона и Хемингтона [1967], измеряя количество выделившегося в реакции холина при ферментативном гидролизе.

Трансalkилирующую активность фосфолипазы Д оценивали по убыли исходных фосфолипидов с учетом продуктов гидролиза или непосредственно по количеству вновь образующегося фосфолипида после их предварительного разделения на тонкослойных пластинках. В качестве субстратов для определения активности Фл-Д использовали суммарные фосфолипиды и очищенные фракции фосфолипидов из яичных желтков или семян хлопчатника.

Фитин определяли по методу А.Л. Курсанова [1976], осаждая фитин магниезальной смесью.

Активность фитазы определяли в супернатанте (6500g, 20 мин) экстракта водорастворимых белков семян хлопчатника по количеству выделившегося ортофосфата методом Бернблюма и Чейна в модификации Вайль-Малербе и Грина [1951], используя в качестве субстрата фитат натрия.

Белок определяли по методу Лоури [1951].

Статистическую обработку результатов проводили по Лакину [1990]. Приведенные в иллюстрациях и таблицах результаты представляют собой средние величины 4-5-кратных повторностей опытов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Изучение фосфолипидного состава некоторых растений в онтогенезе

Исследование динамики изменения основных фосфолипидных компонентов семян хлопчатника показало, что содержание суммы фосфолипидов и их отдельных фракций в ходе прорастания меняется вследствие ферментативных превращений, основную роль в которых играют фосфолипаза Д и фитаза. При этом в проростках возрастает содержание фосфатидной кислоты (ФК). Действительно, содержание фосфатидилхолина (ФХ) неуклонно падает. Аналогичным образом ведет себя фосфатидилэтаноламин (ФЭА). Что касается изменения в содержании фосфатидилинозита (ФИ), оно не падало, как ожидалось, а напротив, в начальный период прорастания возрастало. Сходные изменения наблюдались в процессе прорастания семян других растений (арахис, соя, пшеница, кукуруза и фасоль). Представляло интерес охарактеризовать основные закономерности превращений фосфолипидов (ФЛ) в ходе развития растения от семени до семени и показать роль сопряженной ферментной системы фосфолипаза Д – фитаза в этих процессах.

Эти изменения фосфолипидного состава осуществляются, вероятно, благодаря трансферазной реакции фосфолипазы Д, как это ранее уже было нами установлено для прорастающих семян (табл.1). Аналогичные изменения основных фосфолипидных компонентов установлены и для других исследованных растений. Обнаруженные различия касаются, в основном, отдельных фосфолипидов.

Таблица 1

Изменение содержания основных фосфолипидов при прорастании
семян хлопчатника

Дни прорастания	Содержание фосфолипидов, %				
	ФИ	ФХ	ФЭА	ФК	Другие ФЛ
покоящиеся семена	22,1±0,59	56,8±1,43	13,8±0,36	3,6±0,1	1,1±0,03
1	22,5±0,59	55,1±1,47	12,4±0,32	5,5±0,15	2,2±0,04
3	32,2±0,10	36,5±1,1	9,1±0,26	16,5±0,43	2,5±0,06
5	39,8±1,1	22,5±0,60	4,1±0,11	29,0±0,71	1,7±0,05
7	26,0±0,70	20,8±0,52	3,8±0,11	43,1±1,1	2,0±0,034
9	16,5±0,46	18,0±0,44	5,3±0,13	44,0±1,1	2,9±0,09

Так, арахис и соя (масличные растения), как и хлопчатник, содержат аналогичные основные фосфолипиды, подвергающиеся изменениям при прорастании.

Таблица 2

Изменение содержания основных фосфолипидов арахиса и сои
при прорастании

Дни прорастания	Содержание фосфолипидов, %				
	ФИ	ФХ	ФЭА	ФК	Другие ФЛ
	СОЯ				
пок.сем.	2,2±0,3	60,2±1,7	17,2±0,4	1,54±0,01	8,9±0,2
1	5,1±0,1	58,0±1,6	16,7±0,4	2,4±0,01	7,8±0,2
3	9,0±0,7	48,1±1,4	14,6±0,3	3,9±0,1	2,4±0,04
5	16,1±0,4	46,1±1,4	12,8±0,3	7,5±0,1	9,0±0,2
7	6,5±0,1	42,0±1,4	9,7±0,2	14,1±0,3	7,3±0,2
9	5,1±0,1	40,9±1,1	6,5±0,1	28,9±0,8	7,9±0,2
АРАХИС					
пок.сем.	12,5±0,3	63,7±1,7	18,2±0,4	0,3±0,01	5,3±0,01
1	13,9±0,31	58,7±1,5	16,9±0,4	2,3±0,01	8,2±0,2
3	29,0±0,7	50,7±1,4	13,5±0,3	3,51±0,1	3,4±0,1
5	35,81,1 3	43,3±1,2	12,4±0,3	6,1±0,18	2,4±0,04
7	22,9±0,52	42,7±1,2	10,1±0,3	16,5±0,4	7,8±0,2
9	17,9±0,4	40,1±1,1	7,6±0,3	25,1±0,6	9,3±0,2

Данные, приведенные в табл.2 (арахис и соя), показывают, что количество основных фосфолипидов – фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, также как и в случае с хлопчатником изменяются примерно с одинаковой тенденцией и с первого дня прорастания снижаются. Содержание фосфатидной кислоты в первый день прорастания – минимальное, однако оно увеличивается в течение всего периода наблюдений и к 9 дню достигает максимума (увеличение в 33 и 23 раза соответственно для арахиса и сои). Динамика изменений фосфатидилинозита сходна с динамикой изменения фосфатидной кислоты, здесь максимум его содержания приходится на 5-ый день (увеличение примерно в 2 раза для арахиса и сои) и затем наблюдается его снижение. Содержание фосфатидилхолина изменяется как у арахиса, так и у сои одинаковым образом (снижение в течение всего периода), к 9-му дню содержание изучаемого фосфолипида уменьшилось в 1,5 раза.

Следующая серия экспериментов была посвящена изучению содержания основных фосфолипидов в зерне пшеницы и кукурузы, которые являются злаковыми культурами и в фасоли, являющейся бобовой культурой. Так, из основных фосфолипидов пшеницы фосфатидилэтаноламин в количественном отношении отличается от других растений и с первого дня прорастания его содержание систематически снижается. Фосфатидилинозит и фосфатидилхолин изменяются с одинаковой тенденцией как у сои, так и у

арахиса. В кукурузе и фасоли изменение количества фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина имеет одинаковое значение. В покоящихся семенах содержание фосфатидной кислоты невысокое и по мере прорастания оно увеличивается в несколько раз (табл. 3) При прорастании фосфолипиды также изменяются, однако эти изменения отличаются от тех, которые мы установили для других исследованных нами растений. Так, в пшенице при прорастании увеличивается содержание фосфатидилинозита в 1,8 раза на 5- день; остальные фосфолипиды – монотонно уменьшаются: фосфатидилхолинов – 1,6 и фосфатидилэтаноламинов – в 1,5 раза; в кукурузе и фасоли в процессе прорастания содержание фосфатидилинозита увеличивается до 3-дня, а затем уменьшается. Остальные фосфолипиды: фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин уменьшаются в 2 – 4 раза. Только содержание фосфатидной кислоты увеличивается в период с первого по 9-й дни в 18-20 раз.

Таблица 3

Изменение состава основных фосфолипидов в семенах пшеницы, кукурузы и фасоли при прорастании

Дни прорастания	Содержание ф о с ф о л и п и д о в %				
	ФИ	ФХ	ФЭА	ФК	Другие ФЛ
	П Ш Е Н И Ц А				
пок. семена	33,2± 1,02	24,4±0,6	36,8±1,1	1,2±0,05	4,4±0,13
1	36,8±1,1	22,8±0,6	34,8±1,1	1,8±0,05	3,8±0,11
3	41,3±1,1	20,7±0,6	29,2±1,09	3,4±0,1	5,4±0,16
5	46,4±1,35	18,7±0,5	25,1±0,6	4,6±0,12	5,2±0,15
7	41,5±1,10	16,6±0,4	24,2±0,6	12,5±0,2	5,4±0,16
9	34,4±1,01	12,7±0,3	21,2±0,58	23,2±0,5	8,5±0,25
К У К У Р У З А					
пок. семена	12,2±0,3	42,1±1,2	38,1±1,1	1,8±0,05	5,8±0,17
1	13,4±0,3	41,7±1,2	35,0±1,0	2,6±0,08	7,3±0,21
3	20,3±0,52	35,3±1,01	33,2±1,0	4,5±0,1	6,7±0,20
5	16,8±0,4	33,1±1,0	30,3±0,9	12,5±0,3	7,3±0,21
7	14,1±0,3	28,0±0,68	27,7±0,7	20,9±0,5	9,3±0,27
9	12,9±0,2	24,9±0,59	25,4±0,5	27,9±0,6	8,9±0,26
Ф А С О Л Ь					
пок. семена	9,5±0,2	43,8±1,2	36,8±1,1	2,5±0,1	9,0±0,27
1	11,7±0,29	39,6±1,1	35,5±1,09	3,8±0,09	9,4±0,28
3	13,7±0,35	36,8±1,1	32,9±0,99	7,6±0,11	9,0±0,27
5	15,6±0,43	35,0±1,1	28,9±0,7	13,0±0,3	7,5±0,22
7	12,2±0,3	32,7±0,89	27,2±0,6	18,7±0,5	9,2±0,27
9	8,4±0,2	30,1±0,99	25,3±0,59	28,3±0,7	7,9±0,23

Таким образом, на примере рассмотренных растений можно сделать вывод, что как качественный, так и количественный состав фосфолипидов семян исследованных растений мало различается между собой; изменения,

наблюдаемые в процессе прорастания, во многом сходны между собой, и они осуществляются, по-видимому, благодаря трансферазной реакции фосфолипазы Д.

Как показали наши исследования, главными фосфолипидами семян хлопчатника и ряда других растений (сои, арахиса, пшеницы, кукурузы и фасоли) являются фосфатидилинозит, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидная кислота. Остальные фосфолипиды содержатся в малых количествах. Мы исследовали изменения относительного содержания этих фосфолипидов при созревании семян хлопчатника, начиная с 10-го дня и до полного созревания (70 дней). Общее содержание фосфолипидной фракции, в том числе каждого из исследованных фосфолипидов, в период созревания семян резко растет и достигает максимального значения к моменту полного созревания. Однако накопление отдельных фосфолипидов в семенах происходит неравномерно. На ранних этапах формирования семян возрастает содержание фосфатидилинозита, которое имеет тенденцию увеличиваться вплоть до 40-го дня, а лишь затем уменьшается. Содержание фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, напротив, минимально на 30-40-й день от начала созревания, к концу созревания их содержание растет синхронно со снижением содержания фосфатидилинозита. При этом не наблюдается увеличения количества продукта гидролиза фосфолипидов – фосфатидной кислоты, напротив, характерно его снижение с 3,6 до 1,2% (табл. 4).

Таблица 4

Изменение содержания основных фосфолипидов семян хлопчатника при созревании

Дни созре- Вания	Содержание ф о с ф о л и п и д о в, %				
	ФИ	ФХ	ФЭА	ФК	Другие ФЛ
10	29,5±0,88	31,3±0,93	15,5±0,46	1,5 ±0,04	22,2±0,66
20	41,1±1,23	24,7±0,74	12,5±0,37	3,0±0,09	18,4±0,55
30	56,2±1,68	22,2±0,66	8,2±0,24	3,2±0,09	11,2±0,33
40	61,4±1,84	23,0±0,69	8,0±0,20	3,6±0,10	7,0±0,21
50	55,3±1,65	22,8±0,68	9,2±0,27	2,8±0,08	5,3±0,15
60	48,8±1,46	34,1±1,02	10,8±0,32	2,2±0,06	4,0±0,12
70	27,1±0,81	48,0±1,44	12,0±0,36	1,2±0,03	1,7±0,05

Эти результаты могут быть объяснены тем, что по мере созревания семян в клетке протекают процессы транспереэтерификации, катализируемые фосфолипазой Д при этом, вероятнее всего, образование других фосфолипидов происходит на основе фосфатидилинозита и соответствующих оснований, образующихся в результате биосинтеза.

2. Активность фосфолипазы Д и фитазы при прорастании и созревании семян хлопчатника

Семена хлопчатника содержат относительно более высокие, чем в других растениях, количества фосфолипазы Д, включая источники (капуста, арахис), из которых традиционно выделяют фермент [Рахимов М.М. и др., 1979]. Как уже отмечалось выше, одним из ферментов, катализирующих превращения фосфолипидов в семенах хлопчатника, является фосфолипаза Д. Такие ферментативные превращения фосфолипидов могут вносить существенный вклад в процессы обновления фосфолипидов мембран, протекающих в ходе развития семян хлопчатника при их прорастании. В основу этого предположения были положены следующие факты: 1) высокое содержание фосфолипазы Д в семенах хлопчатника [Рахимов и др., 1976]; 2) отсутствие значительных количеств продуктов гидролитического действия фосфолипазы Д на фосфолипиды в процессе прорастания семян [Юлдашев и др., 1970, Рахимов, Валиханов, 1985;]; 3) способность фосфолипазы Д катализировать обменные реакции между отдельными фосфолипидами и спиртами [Рахимов и др., 1979]. Вместе с тем количественные данные об изменении основных фосфолипидных компонентов в ходе прорастания семян хлопчатника малочисленны, отсутствуют и результаты сравнительных исследований.

Изменение фосфолипазной активности семян хлопчатника при их проращивании. Активность фосфолипазы Д хлопчатника в отличие от других гидролитических ферментов – липазы [Юлдашев и др., 1970], протеазы [Ihle, Dure, 1969], фитазы [Валиханов и др., 1984], и др., которые активируются при прорастании семян, не увеличивалась (табл. 5). При этом удельная активность фосфолипазы Д в расчете на белок даже несколько снижалась. При пересчете активности фермента на целое растение общая фосфолипазная активность за этот период увеличивалась примерно в 1,5 раза. При этом происходило ее перераспределение между образующимися вегетативными органами. Эти данные в целом согласуются с результатами, опубликованными в литературе при изучении прорастания семян сои [Guarles, Dawson, 1969], развития семян и растений *Brassica napus* (Novotna et al., 2003; Nekrasov et al., 2004).

Изменение фитазной активности семян хлопчатника при их проращивании. Сухие зрелые семена хлопчатника обладают небольшой фитазной активностью, но при их проращивании происходило увеличение активности фитазы. Как видно из приведенных в табл. 5 результатов, она, постепенно увеличиваясь, достигала максимума на 5-й день от начала проращивания. При этом она почти в 7 раз превышала первоначальное значение. В последующие дни проращивания фитазная активность постепенно снижалась. Эти результаты совпадают с данными, опубликованными в литературе для фитаз других растений [Chang, Scheimmer, 1977; Chen, Pan, 1977; Куваева, Кретович, 1978].

Таблица 5

Изменение фосфолипазной и фитазной активностей, а также содержания фитина и инозита в прорастающих семенах хлопчатника

Дни прорастания	Фосфолипазная активность, мкмоль/мин на мг белка	Фитазная активность, мкмоль/мин на мг белка	Содержание фитина, % сухого веса	Содержание инозита, мкмоль/г
пок.сем.	32,0±0,75	9,2±0,2	10,8±0,27	2,0±0,06
1	38,2±1,12	11,1±0,29	9,0±0,27	5,0±0,17
3	35,1±1,12	40,0±1,17	3,5±0,09	4,2±0,11
5	30,2±0,78	75,2±1,87	2,5±0,07	3,8±0,09
7	26,4±0,60	55,0±1,56	2,4±0,06	4,2±0,1
9	25,0±0,59	34,2±0,91	2,3±0,04	4,3±0,12

Изменение содержания фитина и инозита в процессе проращивания семян. Содержание фитина, запасенного в семени, в результате гидролитического действия фитазы с первых же дней прорастания уменьшалось (табл. 5). При этом сначала фитин из нерастворимой формы (в виде комплексов с белками и металлами) переходит в растворимую. Такая форма фитина эффективнее гидролизовалась фитазой, которая при этом активировалась [Валиханов и др., 1984]. Продуктами этой реакции являются неорганический фосфат и инозит. Неорганический фосфат, как хорошо известно, потребляется в целом ряде реакций, среди которых наиболее важной является его связывание с АДФ с образованием АТФ. Другой продукт реакции, катализируемой фитазой - инозит должен был бы накапливаться в семени, хотя бы в первые дни прорастания, пока интенсивность метаболических процессов, потребляющих инозит, еще низка. Однако результаты опытов показали, что в процессе снижения содержания фитина инозит не накапливался (табл.5). Его содержание не менялось существенно до 10-го дня, а абсолютное значение количества инозита находилось на весьма низком уровне. В доступной литературе мы не нашли систематических сведений относительно поведения инозита в ходе проращивания семян. Эти данные означают, что высвобождающийся инозит, по всей вероятности, принимает участие в реакциях, которые способствуют его переходу в связанное состояние.

Изменение содержания основных фосфолипидов, холина и этаноламина в ходе проращивания семян. Содержание основных фосфолипидов, таких как фосфатидилхолин, фосфатидилинозит и фосфатидилэтанолламин в сухих семенах хлопчатника разных сортов колеблется, соответственно, в пределах 48,5-55,2; 11,2-13,6 и 22,5-28,2% от общего количества фосфолипидной фракции соответственно. Другие фосфолипидные компоненты содержатся в минорных количествах – не более 3% [Бабаев и др., 1974]. При действии на них фосфолипазы Д, судя по

механизму катализируемой этим ферментом реакции, в результате гидролиза содержание этих фосфолипидов должно снижаться и должны накапливаться продукты: фосфатидная кислота и спирты – холин, этаноламин, инозит. Накопление инозита (табл. 5), наоборот, не происходило.

Рассмотрим динамику других компонентов. Относительное содержание фосфатидилхолина (в % к общему количеству фосфолипидов) падало в 2,5 раза, а фосфатидилэтаноламина – в 3,2 раза к 5-му дню от начала проращивания. Совсем другие результаты были получены при измерении относительного содержания фосфатидилинозита (табл. 6).

Таблица 6

Изменение содержания фосфолипидных компонентов, свободных холина и этаноламина при проращении семян хлопчатника

Дни проращивания	Фосфолипиды, % от общего количества				Спирты, мкмоль/г	
	ФИ	ФХ	ФЭА	ФК	Холин	Этаноламин
1	23,3±0,57	56,0±1,6	10,1±0,31	5,2±0,13	1,2±0,03	0,9±0,02
3	33,5±0,89	37,2±1,1	10,0±0,3	15,1±0,37	10,0±0,3	7,0±0,21
5	39,2±1,18	23,5±0,52	8,7±0,21	30,0±0,91	19,1±0,52	16,1±0,4
7	24,1±0,527	21,3±0,5	9,2±0,26	43,2±1,12	9,2±0,25	15,0±0,4
9	16,4±0,42	20,0±0,5	11,0±0,29	45,1±1,1	2,3±0,06	7,1±0,22

Содержание фосфатидилинозита не падало, как ожидалось, а, напротив, в начальный период проращивания даже возрастало и лишь в более поздний период отмечалось некоторое снижение. Эти факты не могут быть объяснены, исходя лишь из гидролитической функции фосфолипазы. Что касается продуктов гидролитического действия фосфолипазы Д, только фосфатидная кислота имела тенденцию к увеличению (табл. 6). Интересно поведение двух других продуктов реакции – холина и этаноламина, высвобождающихся из лецитина и кефалина соответственно. Измерения показали, что изменение их содержания по мере проращивания семян носит общий характер – вначале содержание этих метаболитов росло, доходило до максимума к 5-му дню от начала проращивания, а затем интенсивно уменьшалось (табл. 6). Однако количественный расчет показал, что между снижением содержания фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, а также между увеличением содержания холина и этаноламина нет соответствия, как это могло бы иметь место, если происходил только гидролиз фосфолипидов фосфолипазой Д. Эти данные получают свое объяснение, если учесть, что фермент катализирует две реакции: 1 - гидролиз фосфолипидов, приводящий к образованию фосфатидной кислоты и спиртов и 2 - реакцию трансалкилирования, приводящую к образованию нового фосфолипида. При этом донорная молекула спирта вытесняет из молекулы фосфолипида спиртовый остаток с образованием нового фосфолипида-фосфатидилметанола (рис.1).

Как видно из данных рис.1 (кривая 2), внесение в реакционную смесь метанола приводило к образованию нового фосфолипида-фосфатидилметанола (ФМ). Метанол в концентрации 0,6-0,8% увеличивал количество синтезируемого фосфатидинозита до 45-50% (рис.1, кривая 1). Одновременно с фосфатидинозитом в реакционной среде образовывался фосфатидилметанол (рис. 1, кривая 2). Увеличение концентрации метанола выше 2% приводило к подавлению синтеза фосфатидинозита с доминирующим образованием фосфатидилметанола.

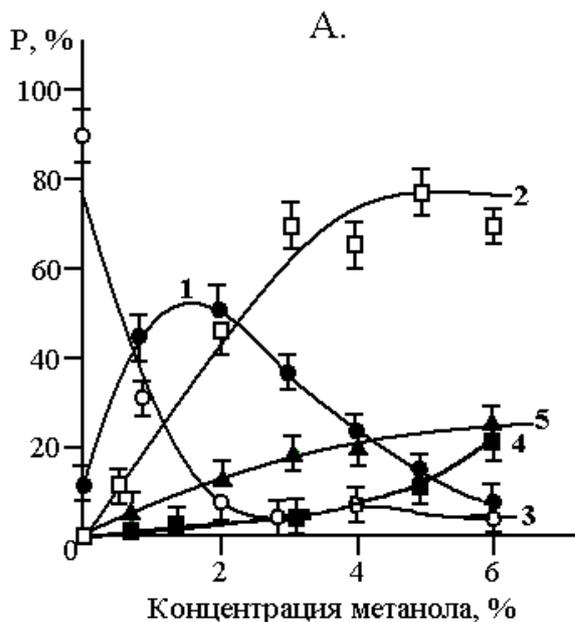


Рис. 1. Влияние метанола на трансферазной реакции. 1-ФИ, 2-ФМ, 3-ФХ, 4-ФК, 5-неидентифицированные фосфорсодержащие продукты.

При более высоких концентрациях метанола в реакционной среде образовывались также неидентифицированные фосфорсодержащие соединения (рис.1, кривая 5). Не исключено, что это инозитди- и инозитполифосфатиды. Интересно отметить, что в этих условиях содержание фосфатидной кислоты в реакционной среде снижалось до 5-7% от исходного (рис.1, кривая 4), то есть в выбранных экспериментальных условиях практически протекают только трансферазные реакции.

Для выяснения роли фосфолипазы Д в превращениях фосфолипидов в созревающих семенах была изучена гидролазная и трансферазная активности фермента на различных стадиях созревания семян хлопчатника (полученные результаты представлены на рис. 2.). Очевидно, что как гидролазная, так и трансферазная активности фермента в течение всего периода созревания семян хлопчатника в целом остаются примерно на одном уровне или недостоверно увеличиваются.

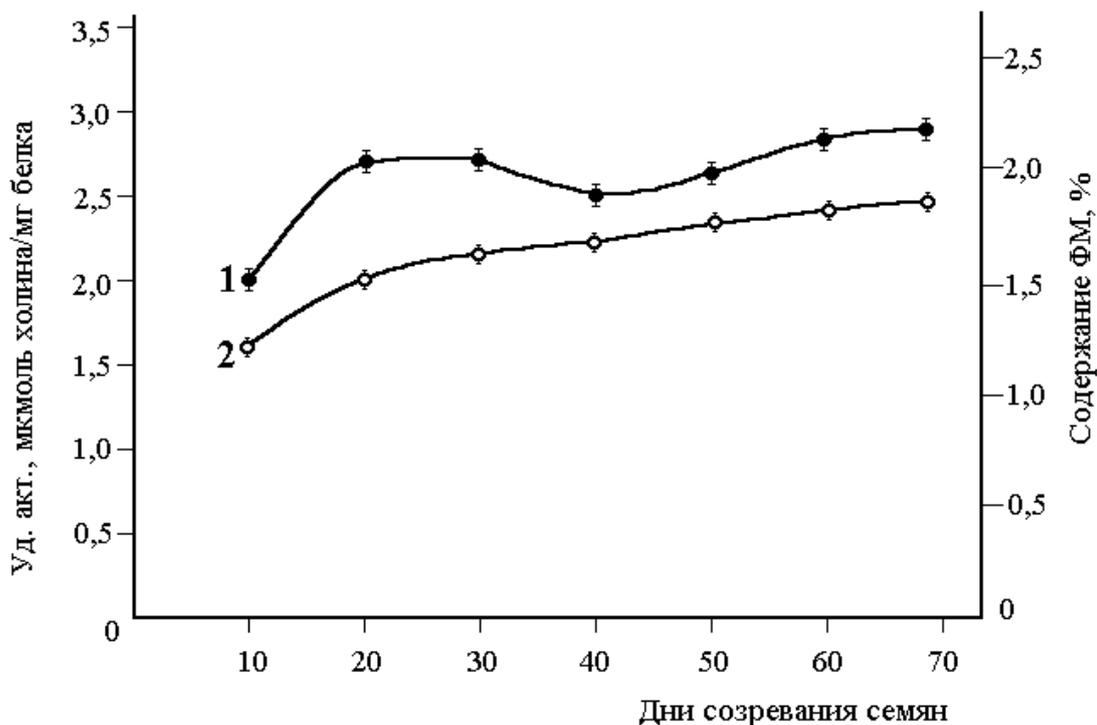


Рис. 2. Динамика изменения в созревающих семенах хлопчатника гидролазной активности фосфолипазы Д (1), оцениваемой по образованию свободного холина и трансферазной активности (2), оцениваемой по образованию фосфатидилметанола.

Полученные данные дают ещё одну возможность предположить, что метанол может участвовать в процессах трансалкилирования эндогенных фосфолипидов за счет реакций, катализируемых собственной фосфолипазой Д семян. При внесении в среду метанола происходит реакция трансалкилирования и это приводит к образованию фосфатидилметанола.

3. Роль фосфолипазы Д в каталитических превращениях фосфолипидов в гомогенатах покоящихся семян и проростков различных растений

В данных экспериментах изучено изменение эндогенных фосфолипидов в покоящихся семенах и проростках хлопчатника под влиянием собственной Фл-Д при длительной инкубации в водной среде. При этом в инкубационной среде происходило накопление фосфатидилинозита – его количество росло по мере инкубации и к 30-й минуте повышалось в 1,6 раза. Затем, достигнув максимума, оно постепенно снижалось, а после 5-часовой инкубации составляло уже менее половины исходного количества. Такой характер изменения содержания этого фосфолипида свидетельствовал о том, что в данном случае помимо гидролитических функций, характерных для фосфолипазы Д в условиях избытка воды, протекали и другие процессы, связанные с превращениями продуктов гидролиза. Что касается других фосфолипидов, для покоящихся семян содержание фосфатидилхолина снижалось в 1,6 раза, фосфатидилэтаноламина – в 2,4 раза, а количество фосфатидной кислоты, напротив, росло, причем значительно – в 18,4 раза.

Идентичные данные получены и при анализе содержания фосфолипидов в проростках (табл. 7).

Эндогенная фосфолипаза Д в прорастающих семенах других исследованных растений оказывает аналогичное действие. Так, в семенах арахиса и сои (табл.8) максимально изменяется содержание фосфатидилинозита (увеличивается в 1,6 - 2 раза на 60-й минуте инкубации как в 1-й, так и в 3-й дни прорастания и затем отмечается снижение до исходного уровня).

Таблица 7

Изменение содержания фосфолипидов хлопчатника под действием эндогенной фосфолипазы Д

Время прорастания сутки	Время инкубации, мин	Фосфолипиды, % от общего количества			
		ФИ	ФХ	ФЭА	ФК
покоящиеся семена	0	22,1±0,59	55,1±1,47	10,0±0,33	2,6±0,08
	10	29,2±0,78	52,0±1,39	19,0±0,53	12,8±0,35
	30	35,3±1,01	48,0±1,33	9,2±0,26	25,5±0,69
	60	30,0±0,94	38,0±1,19	3,3±0,10	34,2±0,91
	120	22,3±0,62	37,9±1,14	2,4±0,07	41,2±1,19
	300	10,2±0,29	35,1±1,13	4,2±0,01	49,1±1,42
1-дневные Проростки	0	24,4±0,68	52,7±1,51	10,8±0,34	6,9±0,18
	10	29,0±0,71	46,8±1,40	9,1±0,31	8,8±0,23
	30	38,1±0,09	35,3±1,09	6,0±0,19	10,2±0,31
	60	46,2±1,11	28,0±0,67	5,2±0,14	16,2±0,43
	120	22,0±0,57	25,0±0,59	6,8±0,17	21,5±0,59
	300	13,1±0,33	24,0±0,52	8,9±0,21	24,3±0,66
3-дневные Проростки	0	33,6±0,92	36,6±1,11	11,0±0,29	12,0±0,32
	10	35,0±1,01	34,6±1,10	10,3±0,27	13,0±0,34
	30	37,1±1,13	32,0±1,09	8,0±0,21	15,8±0,43
	60	42,1±1,15	32,0±1,09	4,2±0,11	18,1±0,49
	120	18,2±0,52	30,0±1,10	1,3±0,04	32,0±0,82
	300	11,2±0,30	30,0±1,09	6,0±0,17	42,2±1,18

Содержание фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина изменяется при инкубации с эндогенной фосфолипазой Д с первой минуты инкубации и количество этого фосфолипида снижается также и в проростках. Содержание фосфатидной кислоты увеличивается в тех же пределах (в условиях активации эндогенной фосфолипазы Д исследованных семян), что и при проращивании (табл. 8).

Таблица 8

Влияние эндогенной фосфолипазы Д на изменения состава основных фосфолипидов семян сои и арахиса при прорастании

Время прорастания, сутки	Время инкубации, мин.	Фосфолипиды %			
		ФИ	ФХ	ФЭА	ФК
		СОЯ			
покоящиеся семена	0	12,2±0,2	60,1±1,60	17,2±0,42	1,54±0,05
	15	15,1±0,3	49,1±1,50	9,3±0,28	2,3±0,09
	60	21,2±0,4	38,2±1,13	6,2±0,18	8,2±0,1
	120	14,1±0,3	34,3±1,01	5,1±0,14	12,5±0,2
1	0	15,1±0,33	58,9±1,69	16,7±0,41	1,54±0,02
	15	19,7±0,54	41,8±1,26	7,1±0,18	2,97±2,4
	60	27,0±0,60	37,6±1,13	5,8±0,18	7,70±0,20
	120	14,3±0,35	33,4±1,01	4,9±0,2	15,5±0,40
3	0	29,0±0,70	46,1±1,33	14,6±0,40	3,9±0,12
	15	38,1±1,20	45,6±1,16	10,0±0,30	8,7±0,23
	60	47,6±1,31	42,4±1,19	7,7±0,20	19,1±0,54
	120	39,5±1,10	32,2±1,01	3,3±0,10	24,6±0,66
АРАХИС					
покоящиеся семена	0	12,5±0,3	63,7±1,70	7,6±0,19	0,3±0,05
	15	16,1±0,4	57,1±1,50	5,5±0,16	2,05±0,09
	60	21,2±0,5	50,0±1,46	4,8±0,11	4,2±0,1
	120	13,1±0,02	43,1±1,20	3,7±0,10	8,6±0,2
1	0	12,5±0,36	58,7±1,5	18,2±0,42	2,3±0,09
	15	16,9±0,47	54,1±1,5	10,1±0,3	3,7±0,10
	60	22,4±0,58	51,7±1,46	7,3±0,12	4,5±0,11
	120	17,7±0,48	44,8±1,20	4,2±0,11	8,6±0,20
3	0	29,0±0,70	50,7±1,49	16,8±0,41	3,5±0,10
	15	33,4±1,01	47,5±1,30	13,3±0,34	7,4±0,12
	60	35,1±1,01	32,7±1,01	10,9±0,30	11,1±0,35
	120	28,1±0,64	21,7±0,5	5,9±0,17	14,7±0,32

Для семян пшеницы (табл. 9) при всех исследованных сроках проращивания влияние эндогенной фосфолипазы Д отмечено в виде достоверных изменений содержания фосфатидной кислоты (увеличение в 2-3 раза на 120-й минуте инкубации в 1-й и 3-й дни); содержание остальных исследованных фосфолипидов изменялось одинаково как в хлопчатнике, так и в других растениях.

Таблица 9

Влияние эндогенной фосфолипазы Д на изменение состава основных фосфолипидов семян пшеницы при прорастании

Время прорастания, сутки	Время инкубации, мин.	Фосфолипиды, %			
		ФИ	ФХ	ФЭА	ФК
покоящиеся семена	0	33,2±1,1	24,4±0,5	36,8±1,2	1,2±0,04
	15	36,8±1,2	22,3±0,5	33,1±1,1	5,2±0,13
	60	43,1±1,1	20,1±0,5	25,5±0,6	10,4±0,20
	120	29,0±0,7	16,4±0,43	15,2±0,42	15,1±0,42
1	0	36,8±1,1	22,1±0,5	34,8±1,1	1,8±0,01
	15	40,3±1,09	20,2±0,5	26,3±0,6	6,8±0,1
	60	42,1±1,2	14,5±0,3	16,6±0,4	12,1±0,2
	120	31,2±0,9	10,2±0,1	5,4±0,14	17,2±0,3
3	0	41,3±1,2	23,7±0,5	29,2±0,9	3,4±0,01
	15	49,1±1,4	17,7±0,4	26,5±0,6	15,3±0,3
	60	52,7±1,6	12,3±0,5	23,3±0,5	21,4±0,5
	120	23,8±0,5	4,7±0,11	16,9±0,4	28,8±0,6

Таблица 10

Влияние эндогенной фосфолипазы Д на изменение состава основных фосфолипидов семян кукурузы при прорастании

Время прорастания, сутки	Время инкубации, мин.	Фосфолипиды, %			
		ФИ	ФХ	ФЭА	ФК
покоящиеся семена	0	12,2±0,3	42,1±1,2	38,1±1,1	1,8±0,05
	15	19,1±0,5	20,3±0,5	26,1±0,7	7,6±0,19
	60	36,1±1,01	16,2±0,42	12,3±0,3	13,1±0,3
	120	14,1±0,3	7,1±0,17	10,2±0,2	20,2±0,52
1	0	13,4±0,3	41,7±1,2	35,0±1,01	2,6±0,08
	15	20,5±0,5	27,8±0,7	13,1±0,3	8,7±0,2
	60	38,3±1,1	12,8±0,3	10,1±0,3	15,9±0,4
	120	15,8±0,3	6,32±0,17	9,5±0,27	24,5±0,68
3	0	20,3±0,5	35,3±1,01	33,2±1,0	4,5±0,1
	15	27,3±0,7	15,1±0,3	13,5±0,3	7,7±0,2
	60	44,7±1,23	9,7±0,28	10,5±0,2	17,3±0,4
	120	17,5±0,4	8,1±0,2	6,8±0,16	28,5±0,65

Изменения состава основных фосфолипидов кукурузы и фасоли (табл. 10 и 11) под влиянием собственной фосфолипазы Д при проращивании, в основном, аналогичны отмеченным выше для хлопчатника и других исследованных культур - постепенное снижение содержания фосфатидилинозита, фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина (в 1,3 –

3,0 раза) и нарастание на этом фоне содержания фосфатидной кислоты (в 1,7 – 3,0 раза), что, вероятно, отражает интенсивность протекания процессов формирования новых клеток и тканей развивающегося растения [Васьковский В.Е., Некрасов Е.В., 1999.].

Таблица 11

Влияние эндогенной фосфолипазы Д на изменение состава основных фосфолипидов семян фасоли при прорастании

Время прорастания, сутки	Время инкубации, мин.	Фосфолипиды, %			
		ФИ	ФХ	ФЭА	ФК
покоящиеся семена	0	9,5±0,3	43,2±1,4	36,8±1,01	2,5±0,06
	15	10,1±0,28	20,1±0,54	19,1±0,5	10,1±0,28
	60	26,5±0,6	10,2±0,28	13,1±0,36	15,2±0,3
	120	3,8±0,09	8,5±0,20	8,9±0,26	25,5±0,6
1	0	11,7±0,29	39,6±1,4	35,5±1,01	3,8±0,09
	15	19,9±0,54	18,1±0,49	13,8±0,37	12,0±0,32
	60	41,4±1,2	9,5±0,28	9,45±0,27	14,8±0,39
	120	4,85±0,13	6,13±0,16	7,9±0,2	28,1±0,62
3	0	13,8±0,29	36,8±1,1	32,9±1,0	7,6±0,13
	15	16,6±0,44	14,8±0,39	12,5±0,34	10,5±0,26
	60	38,1±1,17	10,7±0,31	11,5±0,33	18,1±0,42
	120	7,40±0,19	8,7±0,33	8,4±0,2	36,1±1,1

Таким образом, эндогенная фосфолипаза Д в прорастающих и созревающих семенах исследованных растений активно участвует во всех превращениях фосфолипидов и в зависимости от срока или направления изучаемого процесса может в разной степени проявлять гидролазную или трансферазную функции.

4. Модельные эксперименты по изменению фосфолипидов хлопчатника в опытах *in vivo* и *in vitro*

Как известно, фосфатидилметанол не встречается в природных объектах. Литературные данные по его обнаружению среди фосфолипидов сои [Guartes R.H., Dawson R.M.C. 1969], хлопчатника [Рахимов М.М. и др. 1986], митохондриях [Алматов К.Т. и др. 1995] и др. объектах оказались артефактами выделения фосфолипидов в экспериментах, где растворителем для экстракции использовали метанол среди других органических растворителей.

Следующий раздел работы был посвящен опытам, в ходе выполнения которых мы попытались получить прямые доказательства возможности синтеза фосфатидилметанола *in vivo*, используя для этого метанол, дейтерометанол (CD₃OH) и Фл-Д проростков хлопчатника.

Эксперименты проводили в одинаковых условиях в следующих вариантах: семена хлопчатника проращивали, используя для полива: 1) водопроводную воду (контроль); 2) 2,5 М водный раствор метанола и 3) – 1% дейтерометанольный водный раствор. Фосфолипидный состав проростков соответствующего дня прорастания анализировали методом ТСХ; полученные после проявления пятна идентифицировали со свидетелями. Фракции фосфолипидов, а также фосфатидилметанола и его дейтеропроизводного гидролизovali 4 н HCl при 100 °C в течение 24 часов. Молекулярные массы составляющих гидролизатов фракций анализировали на масс-спектрометре MAT-311 (Varian, USA).

При сравнении масс-спектров гидролизатов соответствующих фракций фосфолипидов хлопчатника в первом и втором вариантах опытов на масс-спектрах второго варианта было идентифицировано 12 дополнительных пиков. Среди них был выделен пик с мол.массой 32 Дальтона (соответствующий метанолу), а также пики с массами 15 и 17 Дальтон (соответствующие метильному радикалу и гидроксильной группе). Масс-спектрометрия соответствующих гидролизатов третьего варианта опытов продемонстрировала пики дейтерометанола (CD_3OH , 36 Дальтон), CD_3 , 18 Дальтон и OH – 17 Дальтон.

Таким образом, опыты, проведенные с проростками хлопчатника в условиях подачи при поливе метанола и дейтерометанола, экспериментально доказывают возможность образования *in vivo* легкого и тяжелого необычного для растений фосфатидилметанола. Полученные результаты свидетельствуют также о конкуренции экзогенных спиртов в реакции образования фосфолипидов в проростках, что еще раз подтверждает важность трансферазной функции фосфолипазы Д хлопчатника как при проращивании, так и в онтогенезе в целом.

В процессе прорастания семян фитин интенсивно расщепляется фитазой, при этом образуются основные продукты – неорганический фосфат и миоинозит. Однако накопления свободного миоинозита в клетке не происходит – его содержание сохраняется постоянным и на весьма низком уровне [Рахимов и др., 1986; Валиханов, 1985]. Это связано с его интенсивным использованием в других метаболических процессах. Получены многочисленные данные о том, что основной путь использования инозита – биосинтез полисахаридов клеточных стенок [Курсанов, 1976; Толочко, Гамбург, 1978]. Так, меченый 2-^3H -инозит обнаруживается при прорастании в полисахаридах клеточных стенок: 47-52% в составе уроновых кислот, 20-24% - в арабинозе, 11-19% - в ксилозе [Sasalet , Taylor , 1984]. Вместе с тем, известно, что более 20% метаболизированного инозита входит в состав фосфолипидов в виде фосфатидилинозита и полифосфоинозитидов [Гулак ,1981]. Полагают, что ФИ образуется путем взаимодействия инозита с цитидинфосфат-диацилглицерином [Ленинджер , 1974].

Мы обнаружили, что в процессе прорастания семян инозит, входящий в состав фитина, может трансформироваться в ФИ с помощью двух ферментов – активированной формой фитазы и фосфолипазы Д.

Фитазная активность возрастает до 5-го дня от начала прорастания: к этому сроку она в 7-8 раз выше, чем в сухих семенах. Содержание фитина, запасенного в семени, как и следовало ожидать, снижалось в результате гидролитического действия фитазы с образованием неорганического фосфата, потребляемого в реакции образования АТФ и инозита, содержание которого не меняется существенно до 10-го дня проращивания семян, а абсолютное значение количества инозита находилось на низком уровне (4-6 мкмоль), т.е. он действительно участвует в реакциях, способствующих его переходу в связанное состояние.

Другой фермент – фосфолипаза Д – при проращивании, судя по экспериментальным данным, не активировался в ранние сроки прорастания. Напротив, активность фосфолипазы Д (в расчете на белок) снижалась в 1,4 раза. В то же время главные фосфолипидные компоненты семян хлопчатника подвергались при проращивании существенным изменениям. Так, содержание фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина снижалось (% от общего количества фосфолипидов) в 2,5 и 3,2 раза соответственно к 5-му дню от начала проращивания. Содержание фосфатидилинозита не снижалось, как ожидалось, а, напротив, в начальный период прорастания возрастало в 1,3-1,7 раза. Этот факт не объясняется, исходя лишь из гидролитической функции Фл-Д. В отношении фосфатидной кислоты отмечается тенденция к повышению ее содержания.

Другая серия опытов проведена по изучению изменения фосфолипидов под действием собственной фосфолипазы Д в метанольной среде (табл.12). При инкубации фосфолипидов в метанольной среде наблюдается образование не встречающегося в растительной клетке фосфолипида – фосфатидилметанола. Как видно, из таблицы 12, наблюдается постепенное увеличение количества фосфатидилметанола, которое к 60 мин. инкубации достигает максимума, затем происходит постепенное снижение его количества в инкубационной среде.

Таблица 12

Изменение содержания фосфолипидов семян хлопчатника под действием собственной фосфолипазы Д в метанольном среде

Время инкубации, мин	Фосфолипиды, % от общего количества				
	ФИ	ФХ	ФЭА	ФК	ФМ
0	27,0±0,8	49,1±1,4	13,0±0,2	2,2±0,06	0,0±0
5	27,5±0,8	42,0±1,2	11,5±0,2	10,0±0,2	3,3±0,07
15	28,0±0,8	34,5±1,0	9,8±0,2	15,0±0,3	6,5±0,1
30	29,2±0,8	20,0±0,5	6,3±0,1	29,0±0,9	13,2±0,3
60	22,0±0,6	22,0±0,6	2,4±0,05	31,0±0,9	19,8±0,5
120	20,0±0,5	23,0±0,6	3,6±0,07	36,5±1,0	16,5±0,4
300	15,2±0,4	28,1±0,8	7,2±0,2	35,5±1,0	14,5±0,3

Анализируя полученные данные, можно полагать, что часть инозита участвует в трансферазных реакциях с эндогенными фосфолипидами и эта реакция катализируется фосфолипазой Д. Эксперименты, которые доказывают это предположение, можно разделить на три группы, в которых: 1) изучали возможность синтеза ФИ в модельной системе, содержащей ФХ, инозит и фосфолипазу Д; 2) показали, что в этой реакции с инозитом может конкурировать другой спирт – метанол; 3) проращивали семена в среде, содержащей MeOH, с целью проверки возможности биосинтеза нового, необычного для хлопчатника фосфолипида – фосфатидилметанола.

Было установлено, что фосфатидилинозит действительно синтезируется при инкубации лецитина (3 мг) и инозита (12 мг) в присутствии Фл-Д (2,7 мг по белку) с выходом порядка 12% (рис. 6). Метанол, добавленный в среду инкубации, стимулирует образование фосфатидилинозита (до 48%), но одновременно происходит и синтез фосфатидилметанола, причем его количество значительно растет (до 70%) при повышении концентрации метанола (рис.3, кривая 2), а синтез фосфатидилинозита резко затормаживается (рис. 3, кривая 1). Наконец, мы провели анализ фосфолипидного состава трехдневных проростков, выросших в среде с 1%-ным метанолом, исходя из предположения о наличии конкуренции метанола с инозитом. Действительно, методом ТСХ был обнаружен новый фосфолипид (рис.4Б, пятно8), который оказался идентичным фосфатидилметанолу, синтезированному в искусственных условиях. Максимальное содержание фосфатидилметанола у трехдневных проростков составило 23,3% (инкубация 60 мин), ФИ – 27,8 вместо 42,1 в контроле (без метанола).

Исследовав некоторые аспекты усвояемости метанола семенами хлопчатника в экспериментах *in vitro*, представляло интерес проверить такую возможность и в экспериментах *in vivo* на целых растениях. Для этого хлопчатник (сорт 108-Ф) выращивали в вегетационных сосудах и при поливе опытных растений к воде добавляли метанол в концентрации 7-8%. На разных этапах созревания из коробочек извлекали семена и определяли их фосфолипидный состав; пробы отбирали каждые 10 дней. Добавление к поливочной воде метанола вызывало замедление роста растений и приводило к появлению на листьях светлых пятен. Фосфолипидный состав созревающих семян в контроле (30-дневные семена) характеризовался следующими показателями (в %): ФИ – 55, ФХ - 23,8, ФЭА - 8,5 и ФК - 6,3 соответственно, а в опыте (50-дневные семена) - ФИ - 28,7, ФХ - 42,5, ФЭА - 8,7 соответственно. Из данных, суммированных на рис. 5., видно, что метанол в использованных концентрациях оказывает ингибирующее влияние на суммарное содержание фосфолипидов, при этом синтез фосфатидилинозита стимулируется (10-40 дни), вероятно, за счет образования фосфатидилметанола. На 70-й день созревания семян содержание всех исследованных фосфолипидов достоверно уменьшалось; количество фосфатидилметанола достигало своего максимума (рис.5).

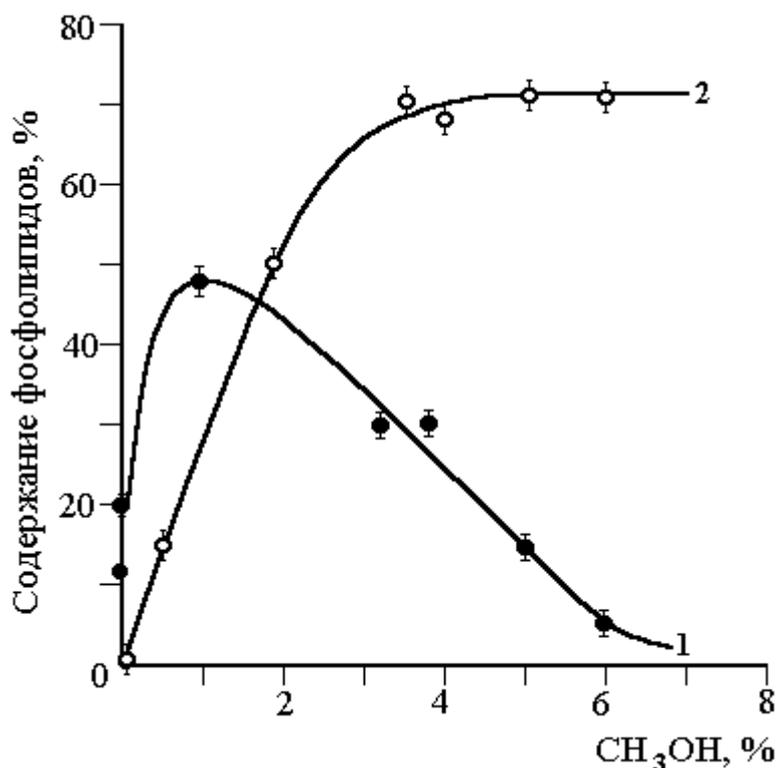


Рис. 3. Синтез фосфатидинозита (1) и фосфатидилметанола (2) из фосфатидилхолина в присутствии фосфолипазы Д. По оси ординат – количество синтезируемых фосфолипидов (%); по оси абсцисс – количество метанола в 0,1 М натрий-ацетатном буфере, рН 5,6; температура 37 °С, продолжительность инкубации 3 ч.

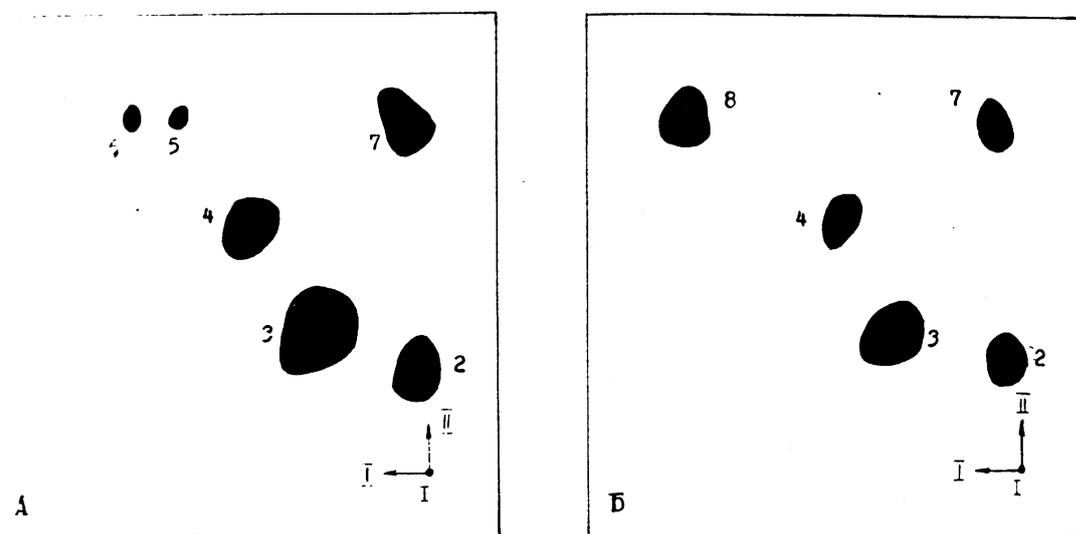


Рис. 4. Анализ фосфолипидного состава трехдневных проростков семян хлопчатника двумерной тонкослойной хроматографией. А – проростки, развивающиеся в водной среде; Б – то же, но с 1% метанолом; 2 – фосфатидинозит; 3 – фосфатидилхолин; 4 – фосфатидилэтаноламин; 5, 6 – полиглицерофосфолипиды; 7 – фосфатидная кислота; 8 – фосфатидилметанол.

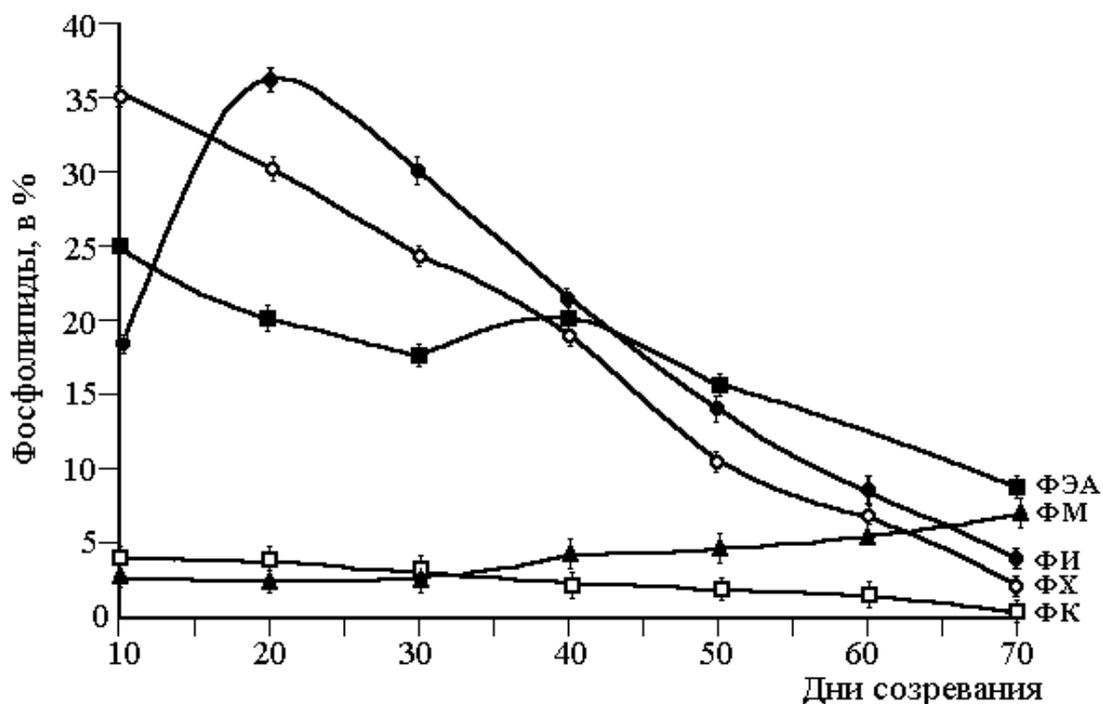


Рис. 5. Изменение содержания фосфатидилинозита (ФИ), фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтанолamina (ФЭА), фосфатидиловой кислоты (ФК) и фосфатидилметанола (ФМ) в процессе созревания семян хлопчатника в присутствии метанола.

Приведенный экспериментальный материал позволяет сделать следующие выводы: метанол в использованных концентрациях тормозит рост и развитие растений и, по-видимому, нарушает синтез хлорофилла (появление белых пятен на листьях), однако некоторые его количества достигают семени и накапливаются в виде фосфатидилметанола.

Об обоснованности сделанного предположения свидетельствуют следующие факты. Во-первых, введение экзогенного фитина в инкубационную среду повышает содержание фосфатидилинозита, т.е. улучшив условия функционирования фитазы, мы добились лучшего функционирования фосфолипазы Д. Во-вторых, из распределения ацильных остатков фосфолипидов, выделенных из исходных семян и 3-дневных проростков, обнаружилось, что в составе фосфатидилинозитов по мере прорастания семян появились жирные кислоты (содержащие в своем составе 10 и 12 С-атомов), не присущие этой фракции. Наконец, наиболее значимыми оказались результаты прямых экспериментов: очищенная фитаза и Фл-Д катализировали образование фосфатидилинозита из чистого фитина и лецитина. Этот же фосфолипид был получен *in vitro* при совместной инкубации инозита, фосфатидилхолина и фосфолипазы Д.

Суммируя вышеизложенное, можно сделать следующее заключение: 1) полученные результаты указывают на важную роль обменной функции фосфолипазы Д в метаболизме фосфолипидов при развитии семян; 2) в проявлении трансферазной функции фосфолипазы Д немаловажную роль играет фитаза как поставщик инозита, необходимого для обменной реакции.

Таким образом, существует связь между функционированием фитазы и фосфолипазы Д – она осуществляется посредством обменной функции фосфолипазы Д и гидролитической – фитазы. Это свидетельствует о том, что ферментативные превращения фосфолипидов, катализируемые Фл-Д, вносят существенный вклад в процессы обновления фосфолипидов мембран. Одновременно таким образом впервые показано физиологическое значение обменной функции фосфолипазы Д.

5. Взаимосвязь активностей фитазы и фосфолипазы Д в созревающих семенах хлопчатника

Динамика активности фитазы в созревающих семенах не исследовалась, хотя именно эти данные могли бы ответить на вопрос, поставленный выше – является ли инозит, используемый для синтеза фосфатидилинозита на начальных стадиях развития семян продуктом гидролитического действия фитазы на фитин? Поиск ответа на этот вопрос и явился целью настоящего раздела работы. Для этого было проведено изучение активности фитазы на различных стадиях созревания семян хлопчатника; полученные результаты сравнивали с активностью фосфолипазы Д, а также с содержанием фосфатидилинозита и фитина. В связи с применением нами в ряде экспериментов метаноловой модели для оценки трансалкилирующей активности фосфолипазы Д и, принимая во внимание возможные связи между активностями фосфолипазы Д и фитазы, активность последней определялась в отсутствие и в присутствии метанола.

Как очевидно из данных, приведенных на рис. 6, семена характеризуются высокими значениями фитазы уже с 10 дня после цветения (60 день от посева), постепенно увеличиваясь, они достигают максимума на 40 день после цветения (90 день от посева). В последующие дни фитазная активность несколько снижается, вероятно, за счет образования неактивных фитин-белковых комплексов, что сопровождается общей потерей воды созревающими семенами.

Сравнение активностей фитазы и фосфолипазы Д, с содержанием фитина и фосфатидилинозита в созревающих семенах показывает совпадение хода кривых изменения активности фитазы и содержания фосфатидилинозита: сначала (до 40 дня от начала цветения - 90 дней от посева) они увеличиваются и затем - уменьшаются. Принимая во внимание данные литературы о том, что инозитол является активатором фосфолипазы Д в присутствии микромолярных концентраций ионов Ca^{2+} [Lambrecht & Ulbrich-Hofmann, 1993; Pappan & Wang, 1998; Wang, 2000], было сделано предположение, что начальный период созревания семян характеризуется образованием больших количеств инозита как следствие действия фитазы на фитин.

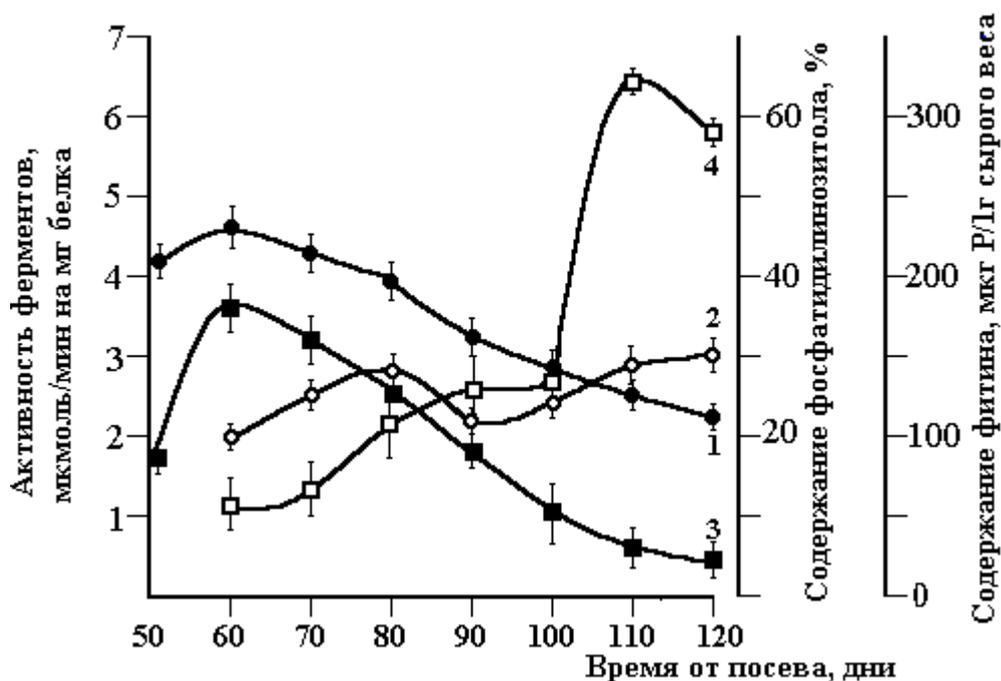


Рис. 6. Сравнение активности фитазы (1), фосфолипазы Д (2) и содержания фосфатидилинозита (3) и фитина (4) в семенах хлопчатника на различных стадиях созревания. Примечание: начало цветения 60-й день от посева.

Образовавшийся инозит не откладывается в семенах, а вовлекается в разнообразные метаболические реакции и способствует образованию фосфатидилинозита за счет активирования фосфолипазы Д. Отсутствие заметного увеличения активности фосфолипазы Д, которая соответствовала бы увеличению активности фитазы и увеличению содержания фосфатидилинозита, можно объяснить, вероятно, тем, что избыток инозита стимулирует трансферазную функцию фосфолипазы Д в результате чего синтезируется в основном фосфатидилинозит, а не другие фосфолипиды. Из таблицы 5 видно, что увеличение содержания ФИ в семенах коррелирует с уменьшением содержания ФЭА и ФХ.

Низкое содержание фитина в 100 -ый день от посева, вероятно, можно объяснить тем, что на ранних этапах созревания семян (когда формируется зародыш) инозит, образующийся в метаболических реакциях, под действием фосфолипазы Д превращается в фосфатидилинозитол. Кроме того, на основании полученных нами данных о высокой активности фитазы с 10 по 40 день от цветения (60 по 90 день от посева), небольшое увеличение содержания фитина в этот период можно объяснить также и его интенсивным ферментативным гидролизом.

Таким образом, сопоставление активностей фитазы и фосфолипазы Д, а также содержания фитина и фосфолипидов в созревающих семенах хлопчатника приводит к выводу о существовании связи между функционированием фитазы и фосфолипазы Д, реализуемой посредством сопряжения обменной и гидролитической функций фосфолипазы Д и фитазы соответственно.

6. Некоторые практические разработки на основе полученных данных

Данные наших экспериментов, изложенные в работе, создают предпосылки для разработки способа получения фосфатидилинозита (схема 1), а также аналитической методики определения мио-инозита (схема 2) в биологических жидкостях и различных модельных системах. Для этого в качестве специфичного для мио-инозита биотрансформирующего агента используют ферментный препарат фосфолипазы Д из растений (хлопчатника или редьки), субстратом для которого служит сумма фосфолипидов яичного желтка, а активаторами - детергенты (DS-Na) и органические растворители (гексан).

В разработанном нами двухстадийном способе получения фосфатидилинозита и препарата мио-инозита используются трансферазные свойства фосфолипазы Д. Благодаря трансферазной функции, в присутствии добавленных активаторов и ускорителей реакционной системы на первой стадии фосфолипаза Д катализирует синтез фосфатидилинозита, из которого во второй реакции (с метанолом) в двухфазной системе вода-органический растворитель, выделяется мио-инозит. На первом этапе из смеси изомеров мио-инозит специфично включается в состав фосфолипидного производного (фосфатидилинозита), а на втором - он вытесняется из образовавшегося фосфолипида более активным в трансферазной реакции первичным спиртом. Этот способ может составить основу для разработки биотехнологического процесса. Используются два реактора - в первом реакторе помещаются источники мио-инозита (гидролизаты, растворы, смеси изомеров или соответствующие биологические жидкости), доводится рН среды до 5,6, добавляются ионы Ca^{2+} (30-50 мМ) и раствор фермента - фосфолипазы Д (5 мг/мл по белку), затем добавляется гексан (2:1 v/v), схема 1. Полученная смесь интенсивно перемешивается в течение 1 часа при температуре 40°C и оставляется для разделения фаз. После разделения фаз отделяют декантацией органическую фазу, в которой содержится основное количество фосфатидилинозита и переносят ее во второй реактор. Добавляют водный раствор метанола (40-50 мМ) и проводят вторую реакцию, используя тот же препарат фермента (схема 2). Затем снова проводят разделение фаз и из водной фазы после соответствующей обработки выделяют мио-инозит кристаллизацией по известному методу. При необходимости выделяют фосфатидилинозит, образующийся на I этапе, двумерной хроматографии в тонком слое (для аналитических целей).

Таким образом, предлагаемым способом из доступного и относительно дешевого местного сырья можно получать мио-инозит и фосфатидилинозит, как ценные субстанции для нужд фармацевтической промышленности и медицины.

Способ получения фосфатидинозита

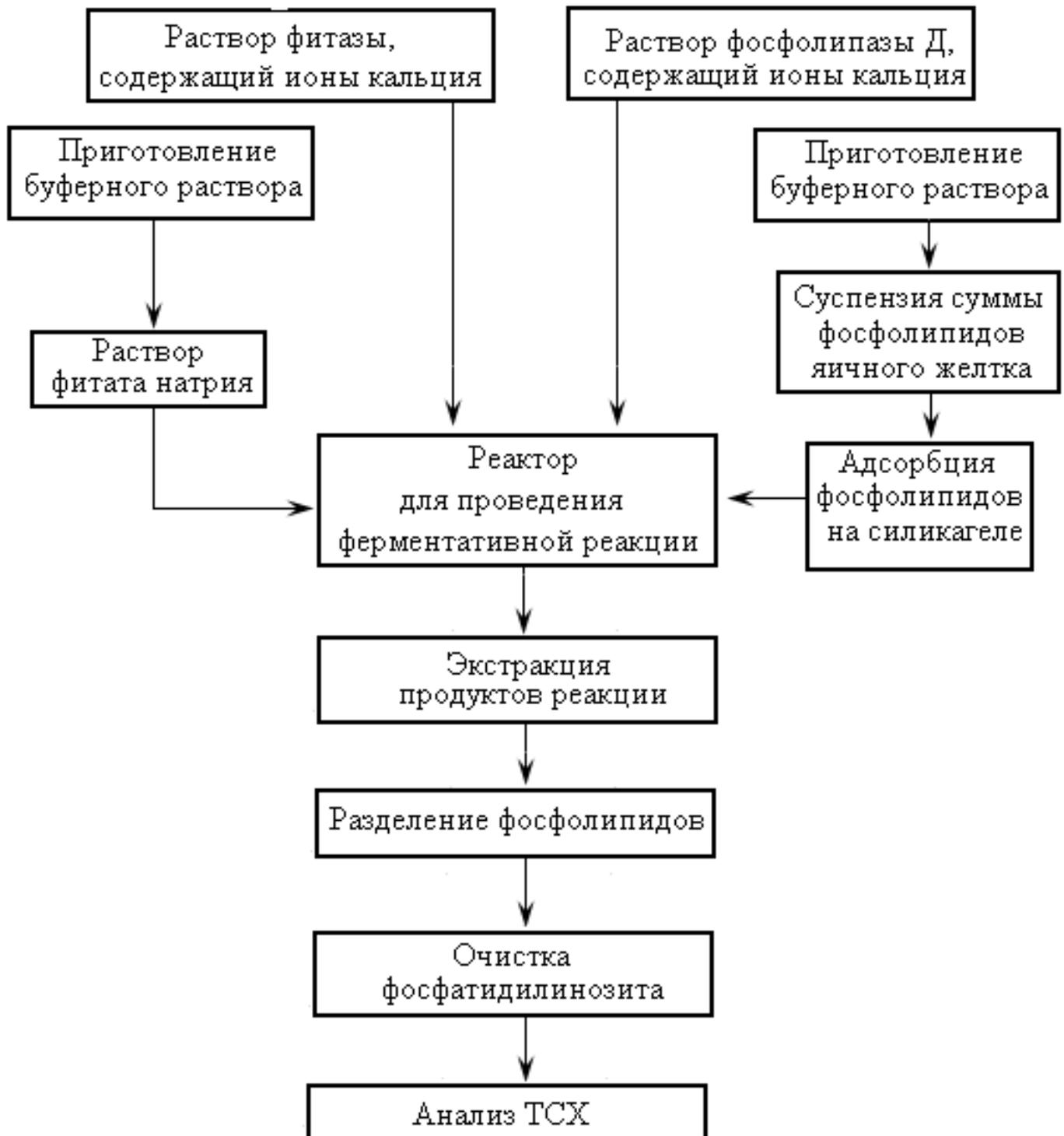
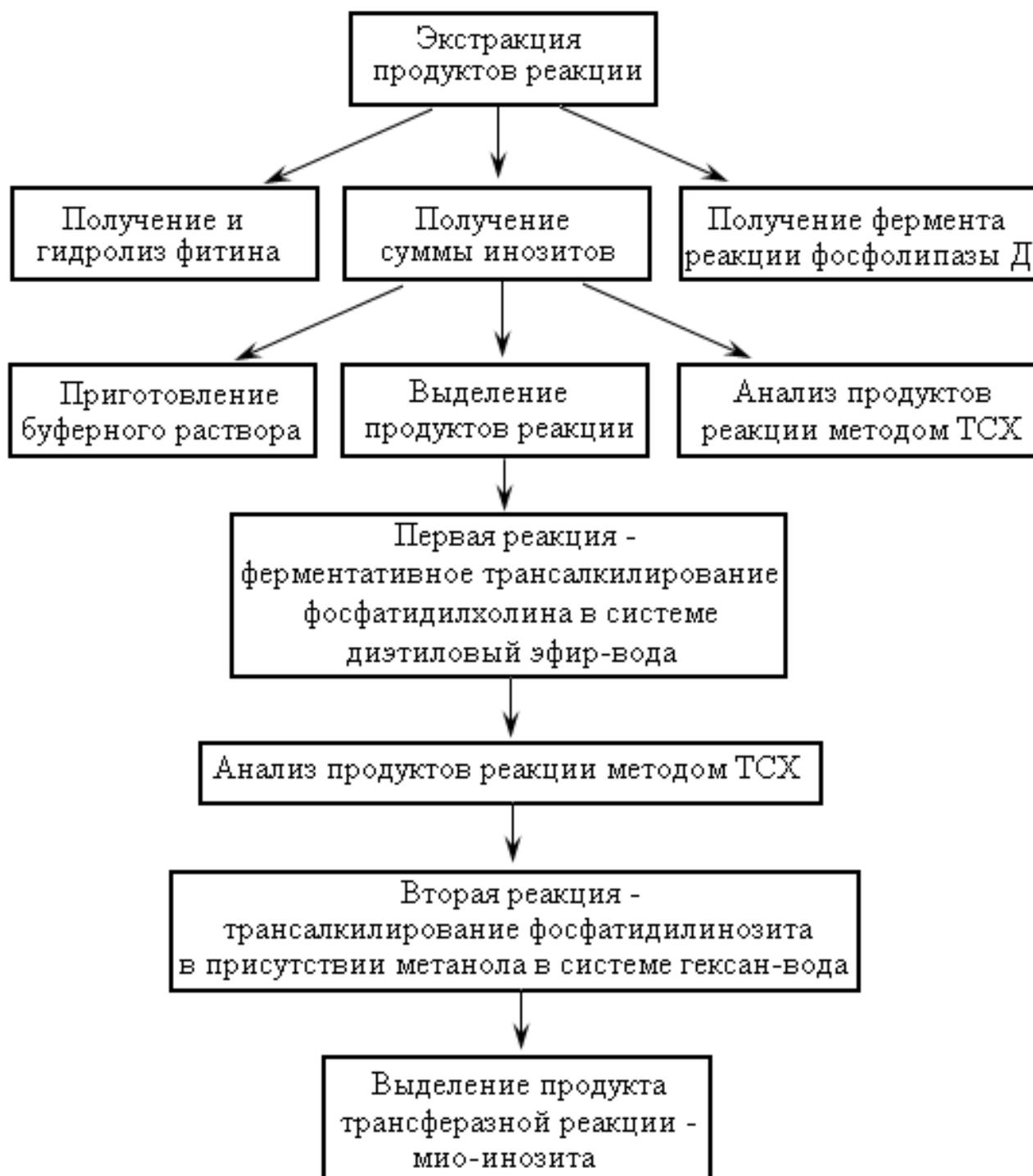


Схема получения мио-инозита



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Взаимопревращения фосфорсодержащих биомолекул в процессе развития растительного организма (от семени до семени) занимают важное место в общем обмене веществ. Принимая во внимание актуальность детального анализа механизмов этих процессов для фундаментальной науки и практики, в настоящей работе проведено сравнительное исследование важной и в тоже время одной из наименее изученных сторон фосфорного обмена – особенностей метаболизма фосфолипидов в онтогенезе хлопчатника и ряда других растений (сои, арахиса, фасоли, кукурузы и пшеницы). Выбор объекта исследования был обусловлен, с одной стороны, практической значимостью исследованных культур для народного хозяйства и, с другой - отсутствием в литературе к настоящему времени систематических сведений по обмену фосфолипидов в цикле развития этих растений от семени до семени.

В нашей предыдущей работе (Абдуллаева, 1990) количественно охарактеризованы изменения основных фосфолипидов хлопчатника: ФИ, ФХ, ФЭА и ФК в покоящихся и прорастающих семенах хлопчатника; параллельно была показана ключевая роль в этих изменениях основных ферментов обмена фосфолипидов – фитазы и фосфолипазы Д, а также инозита как субстрата Фл-Д в трансферазных реакциях. На примере прорастающих семян хлопчатника нами было показано и физиологическое значение обменной (трансферазной) функции Фл-Д.

Настоящая работа, являющаяся логическим продолжением этих исследований, характеризует количественные изменения основных фосфолипидов в вегетирующих растениях и созревающих семенах хлопчатника, а также прорастающих семенах сои, арахиса, фасоли, кукурузы и пшеницы. Установлена роль фитазы и Фл-Д в изменениях содержания основных фосфолипидов семян хлопчатника при созревании и других растений при их прорастании. В работе проведено сравнительное изучение фосфолипидного состава вегетативных и генеративных органов хлопчатника в процессе их развития и изучена роль фосфолипазы Д и фитазы в созревающих семенах хлопчатника. Были установлены общие закономерности в изменении фосфолипидного состава вегетативных и генеративных органов хлопчатника в их развитии. Так, показано преобладание фосфатидилинозита над фосфатидилхолином в молодых, интенсивно растущих органах растений, и наоборот, увеличение содержания фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина при уменьшении фосфатидилинозита в стареющих органах растений и в зрелых семенах. Выявлена взаимосвязь между активностями фитазы и фосфолипазы Д в созревающих семенах хлопчатника, причем фосфолипаза Д в зависимости от сроков созревания может в разной степени проявлять как гидролазную, так и трансферазную функции. В работе также продемонстрирована возможность синтеза *in vivo* фосфатидилметанола растениями хлопчатника. Показано, что метанол может выступить в качестве спиртового субстрата для Фл-Д и способен конкурировать с инозитом в реакциях трансфосфатидилирования; образующийся при этом специфический метаболит (фосфатидилметанол) является главным тестом, характеризующим протекание трансферазных реакции.

Активность фитазы, основного фермента расщепления фитина в прорастающих семенах, при их созревании снижается за счет накопления конечного продукта реакции (фитина), а также вследствие уменьшения влаги в созревающих семенах (50 – 90-й дни наблюдения). Полученные результаты также показали, что в период созревания семян (хлопчатника и других растений) инозит, образующийся из фитина под действием фитазы, не накапливался, а вовлекался в реакции трансфосфатидилирования фосфолипидов. Другой важный факт, полученный в процессе выполнения настоящей работы - это участие Фл-Д в связывании инозита. В созревающих семенах хлопчатника, как показали эксперименты, убыль фитина не сопровождалась увеличением содержания свободного инозита. Из исследованных фосфолипидов семян представляется необычной только динамика фосфатидилинозита. Содержание ФХ и ФЭА в период созревания семян

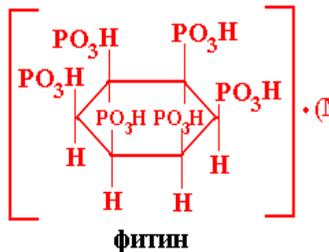
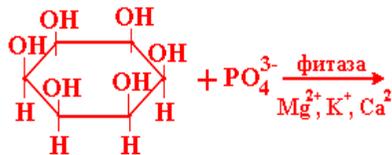
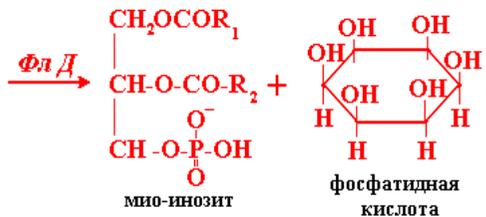
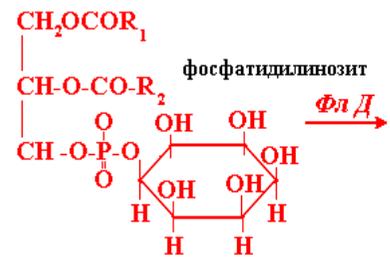
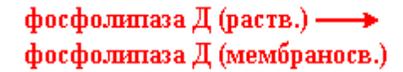
снижалось, параллельно возрастало количество фосфатидной кислоты. Если допустить протекание только гидролиза под действием Фл-Д, можно было бы ожидать, что содержание ФИ также будет снижаться. Проведенные эксперименты, однако, показали, что достоверное увеличение количества ФИ (40 дней) при созревании сопряжено с уменьшением содержания ФХ и ФЭА.

Представленные в работе материалы подтверждают важную роль обменной функции Фл-Д в метаболизме фосфолипидов при вегетативном развитии и созревании семян. В проявлении трансферазной функции Фл-Д важную роль играет фитаза, обеспечивающая трансферазную реакцию субстратом - инозитом.

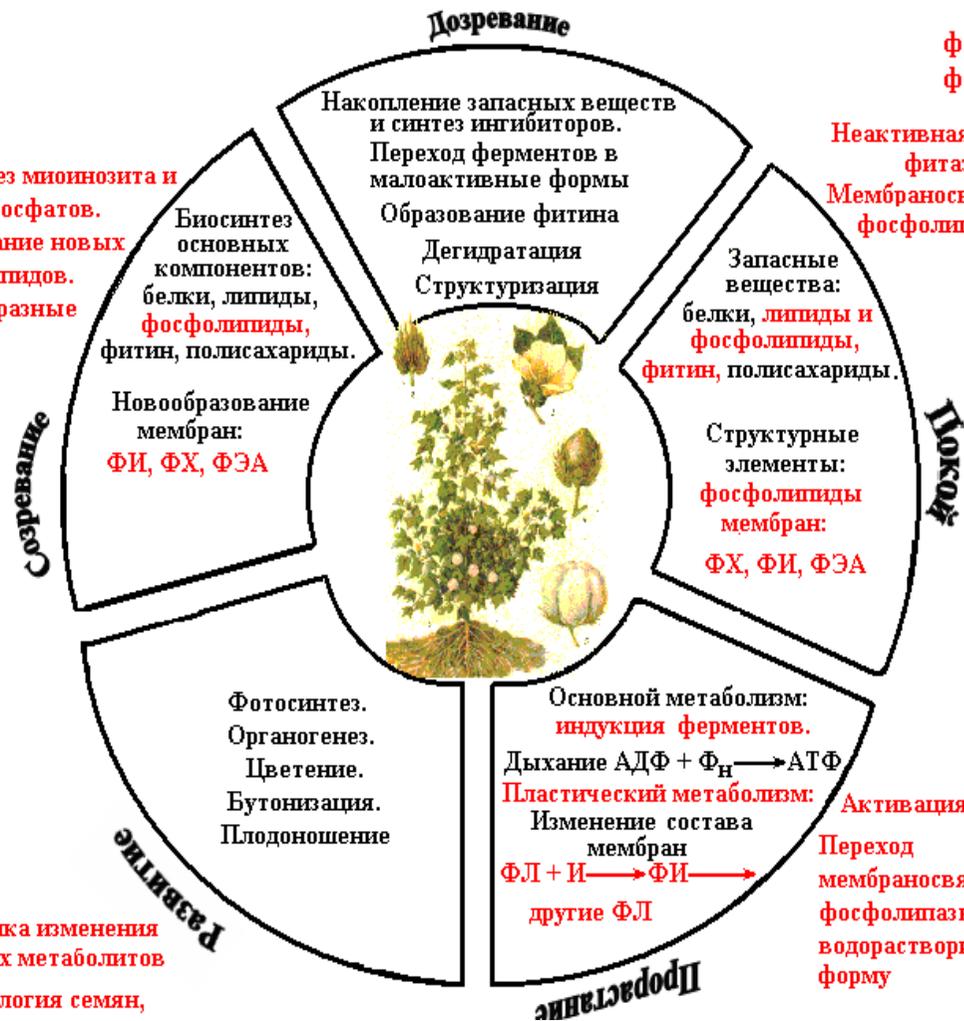
Таким образом, доказано наличие связи между функционированием фитазы и Фл-Д: она осуществляется посредством сопряжения обменной функции Фл-Д и гидролитической - фитазы. Это свидетельствует о том, что ферментативные превращения фосфолипидов в онтогенезе, катализируемые Фл-Д, играют основную роль в процессах обновления фосфолипидов мембран (схема 3)

Практическое применение проведенной работы следует из результатов исследования синтеза ФИ из фосфолипидов и мио-инозита в использованных модельных системах, которые послужили основой, с одной стороны, для разработки аналитического способа определения мио-инозита, а с другой, - методики (с помощью биоспецифического агента – Фл-Д и соответствующих фосфолипидных и спиртовых субстратов) получения мио-инозита из различных источников.

**Фитинсинтезирующая активность фитазы.
Трансферазная активность фосфолипазы Д.
Переход в мембраносвязанную форму.**



Биосинтез миоинозита и инозитфосфатов.
Образование новых фосфолипидов.
Трансферазные реакции

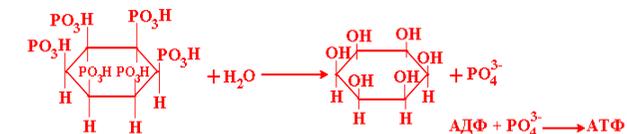


Динамика изменения основных метаболитов
(Физиология семян,

Активация фитазы
Переход мембраносвязанной фосфолипазы Д в водорастворимую форму

Связь метаболизма фосфолипидов и фосфоинозитидов в фосфорном обмене хлопчатника и других

Схема 3.



ВЫВОДЫ

1. Установлены основные закономерности превращений фосфолипидов в онтогенезе хлопчатника, и показана ключевая роль ферментной системы, состоящей из фитазы и фосфолипазы Д, вносящей существенный вклад в пластический метаболизм и изменение мембранных структур, происходящих вследствие перераспределения фосфолипидов в ходе развития растения от семени до семени.

Настоящий механизм, вероятно, носит общий характер для высших растений, т.к. результаты, полученные при изучении хлопчатника, подтверждены и на других растениях (соя, арахис, пшеница, кукуруза, фасоль).

2. Получены дополнительные доказательства участия фосфолипазы Д в обновлении фосфолипидов при прорастании и созревании семян хлопчатника. Доказано, что система фитаза – инозит – фосфолипаза Д – фосфатидилинозит – фосфолипаза Д – фосфолипиды является одной из ключевых в регуляции обмена фосфолипидного фосфора у высших растений. В этом случае трансферазная функция фосфолипазы Д вносит определенный вклад в процессы обновления фосфолипидов у исследованных растений.

3. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* показано, что в трансферазной реакции метанол может конкурировать с инозитом, в результате чего образуется несвойственный растениям фосфолипид – фосфатидилметанол; его образование подтверждено масс-спектроскопическим методом с использованием дейтерированного метанола. Внесение 2,5 М метанола при поливе растений подавляет синтез фитазы и затормаживает вегетацию растений; метанол включается в фосфолипиды семян растений (4% фосфатидилметанола в 50-дневных семенах). Это свойство метанола доказывает ключевую роль фосфолипазы Д в перераспределении фосфолипидов.

4. Показано, что механизм фосфолипиды-фосфолипаза-новые фосфолипиды с высвобождением миоинозита функционирует и при созревании. При этом фитаза при снижении содержания воды в семенах также проявляет свою синтетазную функцию, связывая высвобождаемый мио-инозит. При этом накапливается один из важнейших компонентов зрелых семян – фитин.

5. Изучение фосфолипидного состава органов хлопчатника в процессе онтогенеза показало, что все органы хлопчатника характеризуются относительно большим содержанием фосфатидилинозита и фосфатидилхолина и меньшим – фосфатидной кислоты. По мере развития растений фосфолипидный состав органов меняется, однако в этих изменениях имеются общие тенденции: в молодых, интенсивно растущих органах отмечено преобладание фосфатидилинозита над фосфатидилхолином и, наоборот, по мере созревания семян увеличивается содержание фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина за счет убыли фосфатидилинозита. С участием фосфолипазы Д происходит

перераспределение фосфолипидов: к 70-му дню после опыления фосфолипидный состав созревающих семян практически идентичен составу покоящихся семян.

6. В модельных опытах изучены гидролазная и трансферазная функции фосфолипазы Д. На основании экспериментальных данных разработаны новые биотехнологические процессы получения ценных препаратов (фосфатидилинозит, миоинозит):

а) предложена лабораторная схема получения фосфатидилинозита из доступных субстратов. Технология защищена патентом №1596 от 26.03.2001.

б) впервые разработана новая двухстадийная методика получения ценной для фармакологической промышленности субстанции – мио-инозита (патент № 1779 от 28.12.2001 г).

Список научных трудов по теме диссертации

Журнальные статьи:

1. Валиханов М.Н., Абдуллаева М.М., Рахимов М.М. Некоторые свойства фитазы хлопчатника.// Биохимия, 1981, т.46, вып.1 С. 100-103.
2. Валиханов М.Н., Абдуллаева М.М. Фосфолипиды семян хлопчатника. В кн: Влияние внешних факторов на физиолого-биохимические показатели хлопчатника.// Сб. трудов Ташгу, 1985, С.19-30.
3. Рахимов М.М., Абдуллаева М.М., Валиханов М.Н. Бабаев М.У. Роль фитазы и фосфолипазы в изменении фосфолипидов при прорастании семян хлопчатника.// Физиология растений, 1986, т.33, вып.6, С.1121-1129.
4. Рахимов М.М. Валиханов М.Н. Абдуллаева М.М., Бабаев М.У. Зиятдинова Р.Х. Неизвестный путь превращения инозита в прорастающих семенах хлопчатника.// Узб. биол.журнал, 1987, №1, С.7-10.
5. Абдуллаева М.М., Валиханов М.Н., Рахимов М.М. Изменение фосфолипидного состава семян хлопчатника при прорастании.// Узб. биол.журнал, 1988, №3, С.4-6.
6. Рахимов М.М., Ахмеджанов Р.А., Бабаев М.У., Абдуллаева М.М., Валиханов М.Н. Гидролитическая и трансалкилирующая функции фосфолипазы Д из семян хлопчатника.// Физиология растений, 1989, т. 36, вып.3, С.502-511.
7. Валиханов М.Н., Сагдуллаев И.Н., Абдуллаева М.М. Методы фракционирования и идентификации фосфорных соединений у растений.// Учебно- методическое пособие. Ташкент, 1992, 35 с.
8. Абдуллаева М.М., Валиханов М.Н., Гиясова Н.А. Исследование фосфолипидов семян хлопчатника при созревании.//В кн:"Вопросы экологии растений", сб.трудов.ТашГУ, 1992, С. 88-91.
9. Якубов И.Т., Рахимов М.М., Абдуллаева М.М. Липолитик ферментларнинг активлигини ани=лаш усуллари. Ё=ув услубий =ылланма. Тошкент,1993, 31 бет.
10. Абдуллаева М.М., Гиязова Н.А., Агзамов Х. Бохимиядан амалий маш\улотлар Ё=ув-услубий =ылланма. Тошкент, 1994, 47 бет.
11. Якубов И.Т., Хасанов Х.Т., Абдуллаева М.М. Ферментлар мухандислиги Ё=ув-услубий =ылланма. Тошкент, 1996, 85 бет.
12. Абдуллаева М.М., Рахимов М.М., Валиханов М.Н. Действие полифосфатов на активность липазы при прорастании семян хлопчатника.//Узб.биол. журнал, 1998, N 1, С. 33-36.
13. Игамназаров Р.П., Абдуллаева М.М., Бекназаров Б.О. Влияние некоторых ионов на активность фитазы хлопчатника.//Химия природн.соед, 1998, N 3, С.341-343.
14. Абдуллаева М.М., Зиятдинова Р.Х., Рахимов М.М. Турли детергентлар иштирокида фосфатидилхолиннинг гидролизланиши.//ТошДУ хабарлари, 1998, N 4, Б.3-6.
15. Абдуллаева М.М., Умарова М.М., Йулдошев Б.Т. /ыза ысимталари фосфолипидларини ырганиш.//Ёзб.биол.журнал, 1999, N 2, Б.36-39.

16. Абдуллаева М.М., Умарова М.М., Мулладжонова М.М. Фосфолипазы хлопчатника в развитии растений.//ТошДУ хабарлари, 1999, N 2, С.3-8.
17. Абдуллаева М.М., Умарова М.М., Валиханов М.Н., Рахимов М.М. Гидролитическая и трансферазная активности фосфолипазы D при созревании семян хлопчатника.//Узб.биол.журнал, 1999, N 6, С. 44-48.
18. Абдуллаева М.М., Умарова М.М. Чигитнинг пишиш даврида фосфолипидлар микдорининг ызгариш динамикаси.//Олий укув юртлари ахбороти, 2000, N 1-2, Б. 60-64.
19. Рахимов М.М., Сагатова Ф.А., Реут Е.Н., Абдуллаева М.М. Синтез фосфатидилинозита из доступных субстратов.//Кимё ва фармация, 2000, N 3-4, С.88-90.
20. Абдуллаева М.М., Муллажанова М., Реут Е.Н., Рахимов М.М. Получение фосфатидилинозита путем ферментативной реакции.//Химия природн.соед, 2000, спец.выпуск, С.77- 80.
21. Абдуллаева М.М., Реут Е.Н., Сагатова Ф.А., Муллажанова М.М., Рахимов М.М. Ферментативный способ выделения мио-инозита.//Химия природн.соед, 2000, спец.выпуск, С.75-77.
22. Реут Е.Н., Сагатова Ф.А., Абдуллаева М.М., Рахимов М.М. Выделение мио-инозита из смеси изомеров. //Химия природн. соед, Ташкент, 2000, № 2, С. 160-163.
23. Абдуллаева М.М. Влияние оксигумата на обмен фосфолипидов сои и арахиса при прорастании семян // Аграрная наука, Москва, 2002, № 6, С. 28-30.
24. Abdullaeva M.M., Mulladjanova M.M., Umarova M.M. The role of phospholipase D in phospholipid transaetion during Cotton Seeds maturation. //Turk. J. Biol., 2002, v.26, № 4. P.241-246.
25. Абдуллаева М.М., Валиханов М.Н., Рахимов М.М. Изменение содержания фосфолипидов семян хлопчатника при их созревании.//Аграрная наука, Москва, № 2, 2003, С.18-21.
26. Игамназаров Р.П. Абдуллаева М.М., Умарова Г.Б. Биокимёвий тадқиқот усуллари. Методик ёлланма. Тошкент, 2003, Б.88.
27. Абдуллаева М.М. Бу\дой донининг униш даврида фосфолипидлар алмашинувини ырганиш. ЫЗМУ хабарлари, 2004, №1, Б.3-6.
28. Абдуллаева М.М. Влияние метанола на ферментативный синтез фосфатидилинозита.//Химия природн. соед, Ташкент, 2004, №2, С.139-141
29. Абдуллаева М.М. Изучение обмена фосфолипидов в период прорастания семян сои и арахиса.// Узб. биол. журналы, 2004, №4, С. 3-8.

Патенты:

30. Валиханов М.Н. Абдуллаева М.М., Рахимов М.М. Способ получения липазы. Авторское свидетельства СССР№133571 нэ.кл. с.12, №9 20, 1983
31. Абдуллаева М.М., Реут Е.Н., Сагатова Ф.А., Рахимов М.М. Способ получения фосфатидилинозита. Патент № DF 99003481 от 14.05.99 /зарег./ 04693 № 2, 2001 г.

32. Реут Е.Н., Абдуллаева М.М., Сагатова Ф.А., Рахимов М.М. Способ определения мио-инозита. Патент № JHDP 9900276.1 от 19.04.2000 (зарег.) 05042 №6, 2001 г.

Тезисы:

33. Валиханов М.Н., Абдуллаева М.М. Изучение действия конденсированных фосфатов на активность некоторых гидролитических ферментов при прорастании семян хлопчатника.// Тезисы докладов III конференции биохимиков Средней Азии и Казахстана, Душанбе, 1981, т.1, С.60.
34. Абдуллаева М.М. Изучение активности протеазы в прорастающих семенах хлопчатника при различных значениях pH.// Материалы IУ Всесоюзной междуниверситетской конференции по биологии клетки. Тбилиси, 1985, С. 3-4.
35. Валиханов М.Н., Абдуллаева М.М., Рахимов М.М. Изучение фосфолипидного состава семян хлопчатника при прорастании.// Тезисы докладов У Всесоюзного биологического съезда, Москва, 1985, т. 2, С.366.
36. Абдуллаева М.М., Рахимов М.М., Валиханов М.Н. Метаболизм инозита в прорастающих семенах хлопчатника.// Тезисы докладов IУ конференции биохимиков республик Средней Азии и Казахстана, Ашхабад, 1986, С. 216.
37. Абдуллаева М.М., Валиханов М.М. Изменение фосфолипидного состава семян хлопчатника при созревании.//Тезисы докл. I съезда физиологов растений Узбекистана, Ташкент, 1991, С. 38.
38. Абдуллаева М.М. Действие некоторых ферментов на превращение фосфолипидов семян хлопчатника при прорастании.//Тезисы докл.V конференции биохимиков респ. Средней Азии и Казахстана,Ташкент, 1991. С. 38
39. Абдуллаева М.М., Умарова М.М., Валиханов М.Н. Чигитнинг униш ва пишиш даврида фосфолипидлар алмашинувининг мухим жараёнларини аниқлаш.// "Биологик мембраналарнинг структураси ва функциялари" илмий конференция тезислари, Тошкент, 1995, Б.38 .
40. Абдуллаева М.М., Гиясова Н.А., Умарова М.М. Гузанинг онтогенезида баъзи захира моддаларнинг узгаришига киёсий тавсиф.// "Биология ва экологиянинг хозирги замон муаммолари" илмий конференция маърузалари тезислари. Тошкент, 1995, Б.102.
41. Абдуллаева М.М., Умарова М.М., Валиханов М.Н. Гуза онтогенезининг бошлангич даврида фосфолипидлар алмашинувини аниқлаш.// "Организмдаги модда алмашинуви жараёнларига физик ва кимёвий омилларнинг таъсири" Халқаро илмий анжуман материаллари, Андижон, 1997, т. 2, Б. 65.
42. Абдуллаева М.М., Умарова М.М. Турли усимликларнинг уругларидаги фосфорли бирикмаларни урганиш.// Ёш олимлар ва талабалар II Республика илмий конференцияси. 1996, Б. 7.

43. Абдуллаева М.М., Умарова М.М., Валиханов М.Н., Рахимов М.М., и др. Биотехнологический процесс получения миоинозита из смеси изомеров. //Международная конференция "Состояние и перспективы развития биотехнологии растений", Алматы, 1997, С. 58.
44. Реут Е.Н., Сагатова Ф.А., Абдуллаева М.М., Мулладжанова М.М. Биотехнологический метод синтеза мио-инозита. //Тез. докл науч конф. «Проблемы современной микробиологии и биотехнологии». Институт микробиологии АН РУз, Ташкент, 1999. С. 178.
45. Abdullaeva M.M., Mulladjanova M.M., Umarova M.M. Studies of polyphosphates as activators of some hydrolytic enzymes of cotton.//Intern. Symp."Modern problems of micribial biochemistry and biotechnology, June 25-30, 2000, Pushchino - 2000. P. 55.
46. Abdullaeva M.M., Umarova M.M., Mulladjanova M.M. The enzymatic method of the phosphatidylinositol obtaining.//Second Balkan congress. Turkey, Istanbul, May 13-15, 2000, Abstracts. P.134.
47. Абдуллаева М.М. Влияние оксигумата на фосфолипазную активность при прорастании семян арахиса.// Биологик, экологик ва агротупрокшунослик таълими муаммолари ва истикболи. Тез. Туп. Тошкент 2001, Б.164.
48. Умарова М.М., Абдуллаева Ф.Т., Абдуллаева М.М. Чигитни ривожланиш даврида фитиннинг ферментатив узгариши.// Биологик, экологик ва агротупрокшунослик таълими муаммолари ва истикболи. Тез. Туп. Тошкент 2001, Б.159 .
49. Абдуллаева М.М., Валиханов М.Н., Рахимов М.М. Превращение инозита при развитии семян хлопчатника. //Биология наука XXI века, Тез докл науч конф., Пушино, 2002, т.3, С.182.
50. Абдуллаева М.М. Способ получения фосфатидилинозита путем ферментативного превращения инозита. //Биотехнологиянинг амалий истикболлари. Тез.тып. Ўзбекистон, Тошкент, 2002, Б.78 .
51. Abdullaeva M.M. Study of Some Enzymes of Phosphorus Metabolism.// 9 th International symposium on natural product chevistry. January 10-13, 2004, Karachi, Pakistan, 108.
52. Абдуллаева М.М. Влияние оксигумата на фосфолипазную активность при прорастании сои.// 8-я Пущинская школа- конференция молодых ученых 17-22 май 2004. Пушино, С. 61
53. Абдурахманова М.А., Абдуллаева М.М., Абдуллаев С.А. Влияние оксигумата на фосфолипидный обмен семян хлопчатника.// 8-я Пущинская школа- конференция молодых ученых 17-22 май 2004. Пушино, С.74
54. Абдуллаева М.М. Влияние метанола на ферментативные превращения фосфолипидов в проростках хлопчатника.// 9-я Пущинская школа-конференция молодых ученых 17-22 апреля 2005. Пушино, С. 82
55. Абдурахманова М.А., Абдуллаева М.М., Абдуллаев С.А. Влияние оксигумата на превращение фосфолипидов семян пшеницы при прорастании.// 9-я Пущинская школа- конференция молодых ученых 17-22 апреля 2005. Пушино, С.56

56. Абдуллаева М.М. Роль эндогенной фосфолипазы Д в превращениях фосфолипидов при прорастании семян пшеницы.// «Ёш олимларнинг фан-техника тараккиётида тутган урни». Илмий-амалий конференция. 7-январь, 2005. Тошкент. С. 28-31.

Соискатель:

Биология фанлари доктори илмий даражасига талабгор
М.М. Абдуллаеванинг 03.00.04 – Биохимия ихтисослиги бййича «/ыза ва бош=а юксак ысимлик уру\ларини униш ва пишиш даврида фосфолипидлар ызгаришининг баъзи =онуниятлари» мавзусидаги диссертациясининг =ис=ача мазмуни.

Калитли сызлар: Фосфолипидлар, фосфолипаза Д, фитаза

Тад=и=от объектлари: /ыза (*Gossypium hirsutum L.*) 108-Ф нави, соя (*Glycine hispida L.*) Дуслик нави, ерён\о= (*Arahyus hypogaea L.*) Перзуван 46-2 нави, бу\дой (*Triticum aestivum L.*) Юна нави, маккажыхори (*Zea mays L.*) БЦ – 6661 нави, ловия (*Phaseolus vulgaris L.*) Вигна штамбовая 661 нави уру\лари, ысимталари шамда вегетатив ва генератив органлари.

Ишнинг ма=сади: /ыза ва баъзи бир юксак ысимликлар уру\ининг униш ва пишиш жараёнида фосфолипидлар ызгаришидаги бир =атор =онуниятларни ырганиш.

Тад=и=от методлари: Фосфолипидларнинг умумий ми=дори Давсон ва Хемингтон усулида, фосфорнинг ми=дори Васьковский, Тауски ва Шор, о=сил ми=дори Лоури усулида, фосфолипидлар таркиби Кейтс усули бййича ТСХ ёрдамида ани=ланди.

Олинган натижалар ва уларнинг янгилиги: Диссертация ишида биринчи бор \ызанинг ривожланиш циклидаги уру\дан уру\гача былган даврда ва бош=а ысимликларда (бу\дой, маккажыхори, ерён\о=, соя, ловия) эса уру\нинг униш даврида асосий фосфолипидларнинг =иёсий текшируви ытказилди ва фосфолипидлар ызгариш динамикаси умумий =онуният асосида амалга ошиши кырбатилди. Биринчи маротаба, фосфолипаза Д ферментини гидролаза ва трансфераза функциялари туфайли чигитнинг униш ва пишиш давридаги пластик метаболизмда жадал иштирок этиши кырбатиб берилди. Бу ферментнинг трансфераза функцияси натижасида ысимликда учрамайдиган фосфолипид – фосфатидилметанолнинг синтезланиши *in vitro* ва *in vivo* шароитларда ырганилди. Фосфолипаза Д нинг трансфераза функциясини намоён былишида, инозитни етказиб берувчи фитаза шам муштим рол ыйнайди. Трансфераза реакцияларини ытказиш учун фитаза ва фосфолипаза Д ферментлари иштирокида модел бифермент системаларни яратиш ишлаб чи=илди.

Амалий ащамияти: Олинган натижалар асосида медицина ва фармацевтика учун керакли былган препаратлар фосфатидилинозит ва миоинозитни олиш усуллари йылга =ыйилиши мумкин.

Тадби= этиш даражаси ва и=тисодий самарадорлиги: Препаратларни олиш усуллари ишлаб чи=ариш амалиётида =ылланилиши мумкин. Ишнинг маълум былимлари университетда ытиладиган махсус курсларнинг дастурига киритилган.

+ылланиш сощаси: Ысимликлар биохимияси сохасидаги илмий-тад=и=отларда, ОБЮ ы=ув жараёнида.

Р Е З Ю М Е

диссертации Абдуллаевой М.М на тему: «**Некоторые закономерности превращения фосфолипидов в семенах хлопчатника и других высших растений в процессе их прорастания и созревания**» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.04 – Биохимия.

Ключевые слова: Фосфолипиды, фосфолипаза Д, фитаза.

Объекты исследования: Семена и проростки хлопчатника (*Gossypium hirsutum L.*) сорта 108-Ф, сои (*Glycine hispida L.*) сорта Дустлик, арахиса (*Arahyus hypogaea L.*) сорта Перзуван 46/2, пшеницы (*Triticum aestivum L.*) сорта Юна, кукурузы (*Zea mays L.*) сорта БЦ - 6661, фасоли (*Phaseolus vulgaris L.*) сорта Вигна штамбовая 661, а также вегетативные и генеративные органы семян хлопчатника.

Цель работы: Изучение некоторых закономерностей превращения фосфолипидов в семенах хлопчатника и других высших растений в процессе их прорастания и созревания.

Методы исследования: Выделение суммы фосфолипидов проводили методом Давсона и Хемингтона, количество фосфора определяли методом Тауски и Шора и методом Васьковского, количество белка по методу Лоури, фосфолипидный состав определяли методом ТСХ по Кейтсу.

Полученные результаты и их новизна: В диссертационной работе впервые проведено сравнительное исследование основных фосфолипидов хлопчатника в цикле его развития от семени до семени, а также в семенах некоторых высших растений (пшеницы, арахиса, сои, фасоли и кукурузы) при прорастании и показаны общие закономерности динамики превращения фосфолипидов. Впервые показано, что благодаря гидролазной и трансферазной функциям фосфолипаза Д активно участвует в пластическом метаболизме при прорастании и созревании семян хлопчатника. В условиях *in vitro* и *in vivo* за счет трансферазной функции этого фермента выявлено образование фосфатидилметанола, который не встречается в растениях. В проявлении трансферазной функции фосфолипазы Д важную роль играет фитаза, как поставщик инозита. Созданы модельные биферментные системы с участием фитазы и фосфолипазы Д, в которых можно осуществить трансферазную реакцию в практических целях.

Практическая значимость: Полученные результаты могут быть использованы для получения ценных препаратов, таких как фосфатидилинозит и миоинозит, перспективных для применения в области медицины и фармацевтики.

Степень внедрения и экономическая эффективность: Разработанный способ получения препаратов может применяться в производственной практике. Отдельные результаты применяются в обучающих программах спецкурсов университета.

Области применения: Научные исследования в области биохимии растений, учебный процесс в ВУЗах.

RESUME

Thesis of Abdullaeva Mubarak Mahmudovna

On the academic degree competition of the doctor of biology sciences,
speciality 03.00.04-biochemistry

“Some ways of phospholipids transformation in cotton seeds and in the seeds
of higher plants during their growing and ripening”

Key words: Phospholipids, phospholipase D, fitase.

Subjects of inquiry: Seeds and seedlings of cotton (*Gossypium hirsutum L.*), sort 108-F (*AD₁*); soybean (*Glycine hispida L.*), sort Dustlik, arachis (*Arahyus hypogaea L.*), sort Persuvan 46/2, cereal (*Triticum aestivum L.*), sort Una, mays (*Zea mays L.*), sort BC-6661, pea (*Phaseolus vulgaris L.*), sort Vigna, stamped 661, vegetative and generative components of cotton seeds.

Aim of the inquiry: To study some ways of phospholipids transformation in cotton seeds and in the seeds of higher plants during their growing and ripening stages.

Method of inquiry: The extraction of the phospholipids was carried by Davson's and Hemitong's methods, the quantity of phospholipides was defined by method of Tauski and Shora as well as by Vaskovskiy's method, the quantity of proteins was identified by Louri's method, the content of phospholipids was defined by Keyts's method in ThLCh.

The results achieved and their novelty: For the first time the research of essential cotton seed's phospholipids along with seeds of some higher plants (cereal, arachis, soybean, pea and mayz) was carried out during their development from seed to seed and common ways of phospholipids transformation were shown.

It was shown that phospholipase D due to its hydrolase and transferase functions actively takes part in plastic metabolism during cotton seeds' growing and ripening stages. In vivo and in vitro investigations defined phosphatidil methanole, which is produced because of transferase function of this enzyme and hasn't been found in plants yet. Fitase plays a great part in manifesting transferase activity of phospholipase D as fitase delivers inosit. Some models of bienzimatic systems with fitase and phospholipase were created. These systems could be used in practical aims.

Practical value: The results of these investigations could be used in producing of some valuable preparates such as phosphotidilinosit and mioinosit. They are very perspective in medicine and pharmacology.

Degree of embed and economical effectivity: The method of preparate production could be used in practice. Some results are used in special training programs at Universities.

Sphere of usage: Scientific researches, educational process in Higher Educational Institutes.