

**А. Г. ЛИСОВСКАЯ, О. И. ШАДЫРО,
Г. Н. СЕМЕНКОВА, Н. В. ДИВАКОВА**

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНАЯ ФРАГМЕНТАЦИЯ СФИНГОЛИПИДОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ ХЛОРНОВАТИСТОЙ КИСЛОТЫ

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Сфинголипиды представляют собой класс липидов, основу которых составляет алифатический аминоспирт сфингозин. Они являются важными компонентами клеток эукариот. В течение долгого времени считалось, что сфинголипиды в первую очередь выполняют структурную функцию в формировании биомембран [1, 2]. Однако в последнее время получено все больше доказательств того, что сфинголипиды являются сигнальными молекулами и регулируют клеточные процессы, такие как апоптоз, пролиферация, старение и воспаление [3, 4]. Это стимулирует изучение свойств сфинголипидов.

Ключевую роль в метаболизме сфинголипидов играет сфингозин-1-фосфат лиаза, которая катализирует их реакции расщепления с образованием 2-гексадеценаля. Нами было показано, что 2-гексадеценаль может накапливаться в результате протекания неферментативных реакций фрагментации сфинголипидов. Эти реакции индуцируются ионизирующим и УФ-излучением и протекают по свободнорадикальному механизму, который включает стадии образования азотцентрированных радикалов исходных молекул с последующей их фрагментацией [5]. Поскольку при нормальных физиологических условиях такой способ инициирования процессов фрагментации реализуется с малой вероятностью, представляет интерес поиск агентов, способных инициировать этот процесс в условиях *in vivo*. Одним из таких агентов может быть хлорноватистая кислота (НОСl), образование которой катализируется миелопероксидазой (МПО) в галогенирующем цикле из хлорид-ионов и пероксида водорода [6]. Известно, что НОСl, взаимодействуя с аминоксодержащими биомолекулами, способна образовывать хлорамины, которые неустойчивы и распадаются с образованием N-центрированных радикалов [7–10].

В настоящей работе показано, что при действии на лизосфинголипиды экзогенной НОСl и эндогенной НОСl, продуцируемой в галогенирующем цикле

МПО, происходит реакция деструкции последних, приводящая к образованию 2-гексадеценаля.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Используемые в работе *D*-сфингозин синтетический (SPH), *D-erythro*-сфингозин-1-фосфохолин (S1PCh), раствор гипохлорита натрия, миелопероксидаза из лейкоцитов человека, додецил сульфат натрия (SDS) были от фирмы «Sigma-Aldrich». Чистота соединений составляла не менее 98 %. В работе использовалась бидистиллированная вода. Все эксперименты были выполнены в деаэрированных условиях, для удаления кислорода растворы продували аргоном.

Многослойные липосомы получали диспергированием тонкой липидной пленки в фосфатном буфере (ФБ) [11]. Реакцию взаимодействия гипохлорита натрия с 2 мМ дисперсиями сфингозин-1-фосфохолина (50 мМ ФБ, pH 5) и 5 мМ дисперсиями сфингозина (50 мМ ФБ, pH 5, 1 мМ SDS) проводили при комнатной температуре. Концентрация добавленной HOCl составляла от 1,0 до 7,5 мМ, которую рассчитывали из данных оптической плотности, измеренной при 292 нм в 100 мМ растворе NaOH при pH 12 ($\epsilon_{292}(\text{OCl}^-) = 350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) на спектрофотометре SPECORD® S600 [12].

Липосомы сфинголипидов в фосфатном буфере (50 мМ, pH 4), содержащем 140 мМ NaCl, инкубировали с ферментом миелопероксидазой при температуре 37 °С в течение 60 мин. Реакцию инициировали добавлением H₂O₂, концентрацию которой варьировали от 0,3 до 1,2 мМ. Конечная концентрация для сфинголипидов в полученных системах составила 5 мМ, для миелопероксидазы – 1,5 Ед/мл.

Хлорамины сфинголипидов определяли методом масс-спектрометрии с ионизацией распыления в электрическом поле (ESI-MS) в режиме положительной ионизации на хроматографе «Shimadzu» LCMS-2020.

Анализ 2-гексадеценаля проводили на хроматографе «Shimadzu» с масс-детектором GCMS-QP2010 Plus, использовалась капиллярная колонка Equity™ -5 (длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина слоя жидкой фазы 0,25 мкм). Регистрацию спектров компонентов проб проводили при ионизации электронным ударом.

Величина относительного стандартного отклонения при количественном определении продуктов реакции не превышала 3 %.

Все приведенные данные получены путем усреднения результатов не менее 3 независимых экспериментов. Усреднение результатов и расчет ошибок эксперимента проводили при помощи программы Origin 8.5 (Microcal) с применением метода наименьших квадратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для установления возможности гипохлорита натрия индуцировать превращения сфингозина и сфингозин-1-фосфохолина нами был исследован состав продуктов, образующихся после добавления раствора гипохлорита натрия к дисперсиям

исследуемых лизосфинголипидов. Было показано, что в результате реакции HOCl (рН 5) с водными дисперсиями сфинголипидов реализуется процесс галогенирования с образованием хлораминов. Масс-спектры продуктов взаимодействия соответствовали хлораминам сфингозина ($[\text{M} + \text{Na}]^+ = m/z$ 356) и сфингозин-1-фосфохолина ($[\text{M} + \text{Na}]^+ = m/z$ 521). При дальнейшем увеличении концентрации HOCl происходило образование продуктов с меньшей молекулярной массой, чем исходные вещества. Методом хромато-масс-спектрометрии было показано, что 2-гексадеценаль является основным продуктом фрагментации сфинголипидов, его спектр приведен на рис. 1.

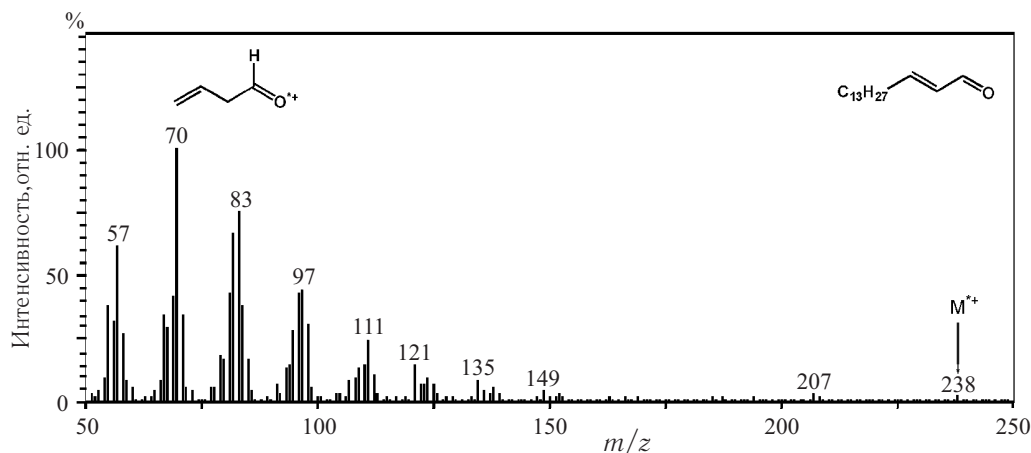


Рис. 1. Масс-спектр 2-гексадеценала, образующегося в деаэрированных водных дисперсиях сфинголипидов после обработки HOCl

Было изучено влияние концентрации HOCl на образование 2-гексадеценала (рис. 2). Видно, что выход 2-гексадеценала в дисперсиях сфингозина (А) и сфингозин-1-фосфохолина (В) экспоненциально возрастает от 25 до 500 мкМ в диапазоне концентраций HOCl от 1,3 до 5,0 мМ и 1–3 мМ соответственно. При дальнейшем повышении концентрации HOCl образование 2-гексадеценала резко замедляется, что, вероятнее всего, связано с вовлечением его в реакции с исходным реагентом, поскольку ненасыщенные альдегиды легко взаимодействуют с гипохлорит-ионами.

Известно, что МПО катализирует реакции с образованием активных форм хлора, таких как хлорноватистая кислота и гипохлорит-ионы.

Реакцию взаимодействия дисперсий сфинголипидов с хлорноватистой кислотой, которая образуется в реакции, катализируемой МПО, проводили в зависимости от концентрации пероксида водорода. Время инкубирования составляло 60 мин при температуре 37 °С. На рис. 3, а и 3, б показано влияние концентрации пероксида водорода на выход 2-гексадеценала при МПО-индуцированных превращениях сфингозина (SPH) и сфингозин-1-фосфохолина (S1PCh) соответственно.

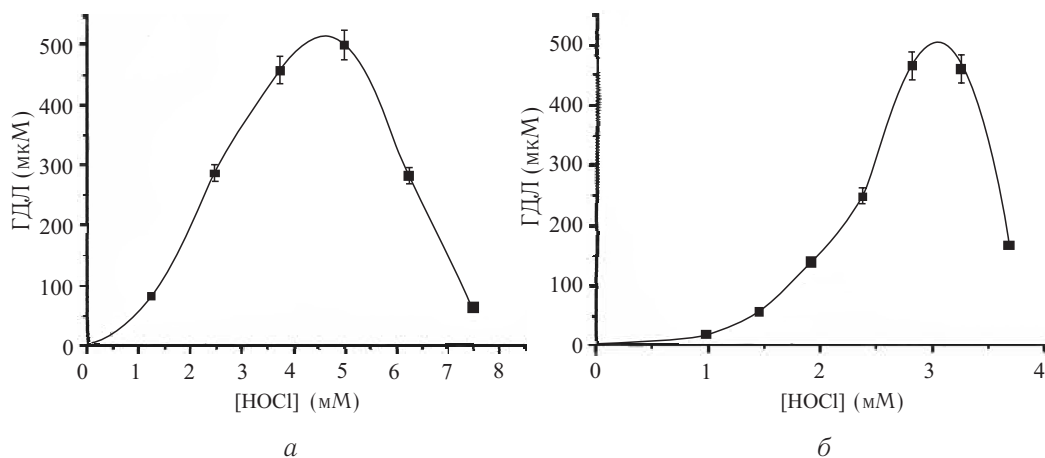


Рис. 2. Накопление 2-гексадеценаля (ГДЛ) в зависимости от концентрации добавленной HOCl в деаэрированных водных дисперсиях:
а – 5 мМ сфингозина (50 мМ ФБ, pH 5, 1 мМ SDS); б – 2 мМ сфингозин-1-фосфохолина (50 мМ ФБ, pH 5)

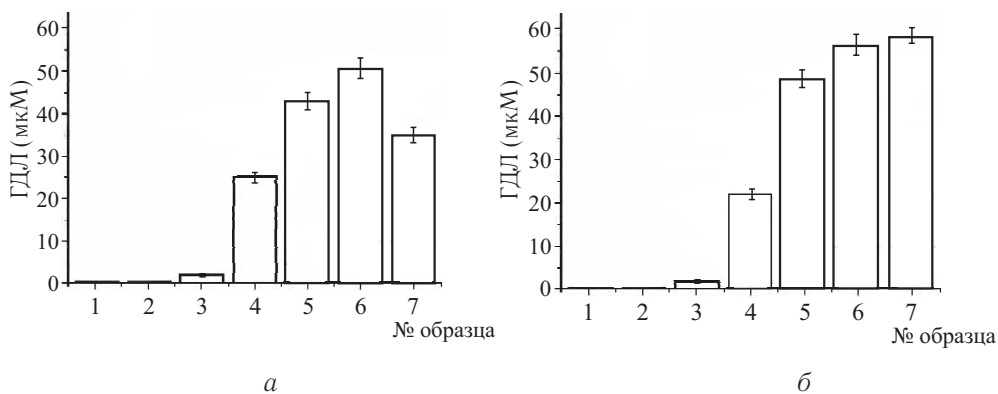


Рис. 3. Образование 2-гексадеценаля (ГДЛ) в деаэрированных водных дисперсиях сфингозина (а) и сфингозин-1-фосфохолина (б) при действии МПО/ H_2O_2 / Cl^- -систем:

1 – дисперсии сфинголипидов; 2 – дисперсии сфинголипидов/ $0,3 \text{ мМ H}_2\text{O}_2$; 3 – дисперсии сфинголипидов/МПО; 4 – дисперсии сфинголипидов/МПО/ $0,3 \text{ мМ H}_2\text{O}_2$; 5 – дисперсии сфинголипидов/МПО/ $0,6 \text{ мМ H}_2\text{O}_2$; 6 – дисперсии сфинголипидов/МПО/ $1,0 \text{ мМ H}_2\text{O}_2$; 7 – дисперсии сфинголипидов/МПО/ $1,2 \text{ мМ H}_2\text{O}_2$.

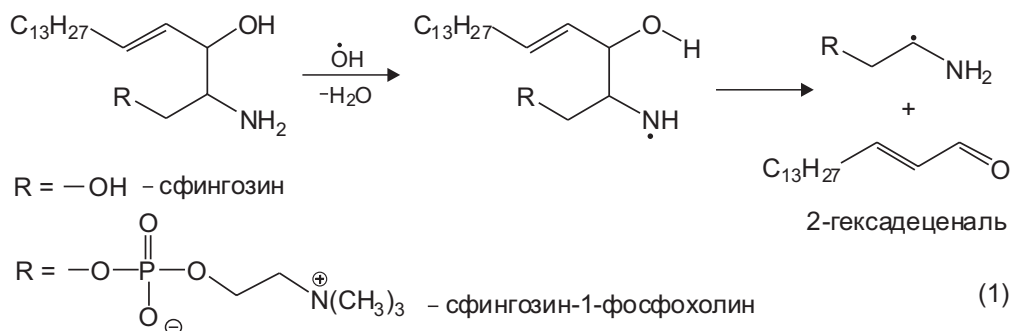
Реакцию проводили в 50 мМ ФБ, 140 мМ NaCl, pH 4, T = 37 °C, t = 60 мин, концентрация для сфинголипидов в полученной системе составила 5 мМ, для МПО – 1,5 Ед/мл

Полученные результаты свидетельствуют, что при действии МПО-содержащих систем на сфингозин и сфингозин-1-фосфохолин происходит образование хлораминов и 2-гексадеценаля. Следовательно, активные формы хлора, возникающие в галогенирующем цикле МПО, также способны индуцировать реакции расщепления С–С-связи в лизосфинголипидах с образованием 2-гексадеценаля.

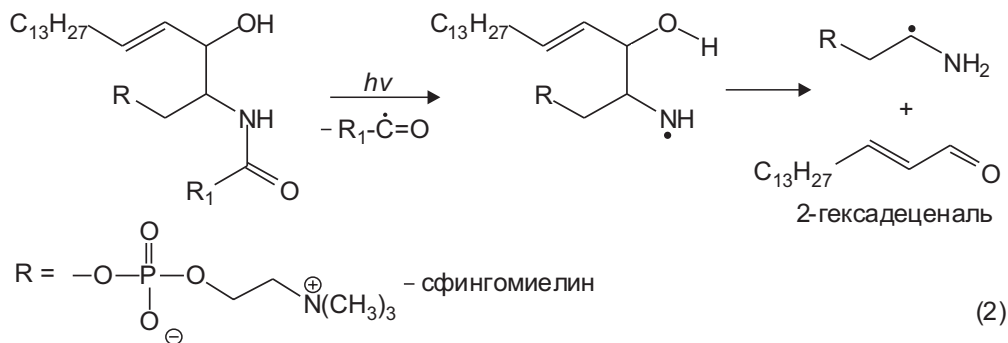
Ранее считалось, что катализируемая ферментами деструкция сфинголипидов уводит вещества, ответственные за сигнальные функции клеток из биологических циклов. Однако полученные в работе [13] данные показали, что 2-гексадеценаль сам является биоактивным веществом и, как сигнальная молекула, индуцирует изменения клетки и программируемую смерть клетки через митоген-активирующие протеинкиназы (МАПК). Следовательно, можно предположить, что изменение в клетке соотношения сфинголипид/2-гексадеценаль может играть одну из ключевых ролей в переключении сигнальных путей и, как следствие, в реализации клеточных функций.

Важная роль 2-гексадеценала в функционировании клетки делает необходимым установление механизмов его образования.

В работе [5] нами было показано, что сфинголипиды подвергаются свободнорадикальной фрагментации при действии γ - и УФ-излучений с образованием 2-гексадеценала. Механизм радиационно-индуцированной фрагментации лизосфинголипидов включает образование и распад N-центрированных радикалов исходных соединений, в соответствии со схемой (1):



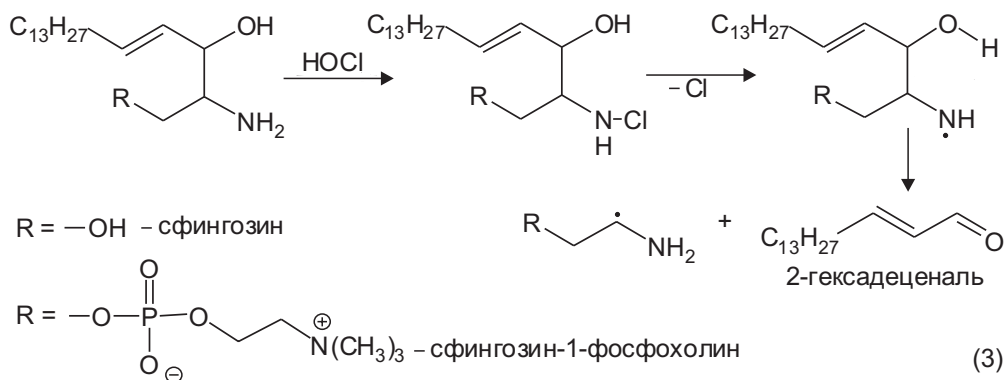
Показано, что процесс фрагментации N-центрированных радикалов происходит при фотолизе сфингомиелина. В этом случае аминильные радикалы образуются в результате распада исходного вещества по Норришу типа I, последующая их фрагментация приводит к образованию 2-гексадеценала в соответствии со схемой (2):



Как следует из приведенных схем, в обоих процессах важная роль в трансформации сфинголипидов принадлежит стадиям образования и распада N-центрированных радикалов исходных молекул.

В многочисленных работах [7–10] установлено, что HOCl при взаимодействии с азотсодержащими биомолекулами образует неустойчивые хлорамины, которые распадаются с образованием N-центрированных радикалов. HOCl также индуцирует перекисное окисление и фрагментацию липидов [9, 10].

Основываясь на результатах наших исследований и данных, полученных в работе [10] с использованием ЭПР-анализа и свидетельствующих об образовании N-центрированных радикалов при взаимодействии гипохлорита натрия с аминоксанолипидами, мы предлагаем схему (3) взаимодействия сфингозина и сфингозин-1-фосфохолина с HOCl:



Из представленной схемы видно, что HOCl осуществляет хлорирование сфинголипидов по NH₂-группе с образованием неустойчивых хлораминовых производных, которые были нами идентифицированы. Затем отщепление атома хлора приводит к образованию азотцентрированных радикалов исходных сфинголипидов. Такого рода радикалы легко распадаются по C–C-связи на 2-гексадеценаль и радикал β-аминоэтилфосфохолина.

Полученные в этой работе данные показывают потенциальную возможность протекания в организме свободнорадикальной фрагментации лизосфинголипидов с образованием в качестве промежуточного продукта N-центрированного радикала исходного вещества и конечного продукта 2-гексадеценала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что при действии HOCl на сфингозин и сфингозин-1-фосфохолин происходит их деструкция с образованием биологически активного продукта 2-гексадеценала. Аналогичный продукт образуется при радиационно- и фотоиндуцированных превращениях сфинголипидов. Сопоставляя приведенные в статье данные и полученные ранее результаты по радиолизу и фотоллизу сфинголипидов, можно сделать заключение, что HOCl-индуцируемый процесс деструкции

протекает по свободнорадикальному механизму с образованием и дальнейшей фрагментацией N-центрированных радикалов исходных молекул липидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Goni F. M., Alonso A.* // BBA. 2006. Vol. 1758. P. 1902–1921.
2. *Pruett S. T., Bushnev A., Hagedorn K.* [et al.] // J. Lipid Res. 2008. Vol. 49. P. 1627–1639.
3. *Bartke N., Hannun Y. A.* // J. Lipid Res. 2009. Vol. 50. P. S91–S96.
4. *Won J., Singh I.* // Free Radical. Biol. Med. 2006. Vol. 40. P. 1875–1888.
5. *Lisovskaya A. G., Shadyro O. I., Edimecheva I. P.* // Lipids. 2011. Vol. 46. P. 271–276.
6. *Davies M. J.* // Clin. Biochem. Nutr. 2011. Vol. 48. P. 8–19.
7. *Hawkins C. L., Davies M. J.* // Biochem. J. 1998. Vol. 332. P. 617–625.
8. *Hawkins C. L., Davies M. J.* // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2. 1998. P. 1937–1945.
9. *Pattison D. I., Hawkins C. L., Davies M. J.* // Chem. Res. Toxicol. 2003. Vol. 16. P. 439–449.
10. *Kawai Y., Kiyokawa H., Kimura Y.* [et al.] // Biochemistry 2006. Vol. 45. P. 14201–14211.
11. *Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C.* // J. Mol. Biol. 1965. Vol. 13. P. 238–252.
12. *Morris J. C.* // J. Phys. Chem. 1966. Vol. 70. P. 3798–3805.
13. *Kumar A., Byun H.-S., Bittman R., Saba J.* // Cell. Signal. 2011. Vol. 23. P. 1144–1152.

Поступила в редакцию 06.04.2012.

УДК 547.952; 577.15

Лисовская А. Г., Шадыро О. И., Семенкова Г. Н., Дивакова Н. В. **Свободнорадикальная фрагментация сфинголипидов при действии хлорноватистой кислоты** // Свиридовские чтения: сб. ст. Вып. 8. Минск, 2012. С. 202.

Показано, что сфингозин и сфингозин-1-фосфохолин хлорируются при взаимодействии с хлорноватистой кислотой (НОСl) и системой, содержащей миелопероксидазу (МПО) /H₂O₂ /Cl⁻. Образующиеся хлорамины быстро распадаются с накоплением биоактивного продукта — 2-гексадеценаля. С учетом известного факта образования аналогичного продукта при радиационно- и фотоиндуцированных превращениях сфинголипидов сделан вывод, что НОСl-индуцированная реакция приводит к образованию 2-гексадеценаля по свободнорадикальному механизму, который включает разрыв С—С-связи. Ключевой стадией процесса является образование и фрагментация азотцентрированных радикалов исходных соединений.

Библиогр. 13 назв., ил. 5.

Lisovskaya A. G., Shadyro O. I., Semenkov G. N., Divakova N. V. **Free radical fragmentation of sphingolipids under the action of hypochlorous acid** // Sviridov readings. Iss. 8. Minsk, 2012. P. 202.

It has been shown that sphingosine and sphingosylphosphorylcholine to be chlorinated upon reaction with hypochlorous acid (HOCl) and the myeloperoxidase (MPO) /H₂O₂ /Cl-

system. The formed chloramines rapidly decompose to a bioactive product 2-hexadecenal. The similar product is formed by the radiation- and photo-induced transformations of sphingolipids. It suggests that HOCl-induced reaction leads to 2-hexadecenal formation through the free radical mechanism which includes C—C bond cleavage. The key stage of the process is the formation and decomposition of nitrogen-centered radicals generated from the starting compounds.