

УДК 541.15; 541.14; 547.435; 547.952

А. Г. ЛИСОВСКАЯ, О. И. ШАДЫРО

НОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ СФИНГОЛИПИДОВ

В настоящей работе исследованы закономерности образования продуктов радиоллиза и фотоллиза водных дисперсий природного сфингомиелина и лизосфингомиелина, а также растворов их низкомолекулярных аналогов.

Сфинголипиды представляют собой один из наиболее разнообразных по химическому строению и функциональной активности классов липидных молекул, структурными компонентами которых являются сфингозиновые основания. В отличие от глицерофосфолипидов и гликолипидов свободнорадикальные превращения сфинголипидов практически не изучены [1, 2].

В данной работе показана возможность протекания деструкции сфинголипидов по новому механизму, реализация которого приводит к разрыву С—С-связи в молекулах исходных веществ.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Используемый в работе сфингомиелин был выделен из головного мозга свиньи по способу, описанному в [3, 4]. Сфингозилфосфохолин (лизосфингомиелин) получали деацилированием сфингомиелина [5, 6]. Синтез N-(2-гидроксипропил)гексанамида осуществляли по методу, основанному на ацилировании аминок спирта смешанным ангидридом капроновой и *n*-бутилугольной кислот в системе растворителей ТГФ—ацетонитрил с добавлением 15 мкл триэтиламина [7]. Для подтверждения структуры синтезированных веществ использовали спектроскопию ^1H - и ^{13}C -ЯМР.

Многослойные липосомы получали диспергированием тонкой липидной пленки в фосфатном буфере ($c = 0,05$ моль/л, pH 7,4) [8]. Концентрация липидов в полученных липосомах составила $2 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Для приготовления 0,1 М водных растворов серинола («Aldrich», США) и N-(2-гидроксипропил)гексанамида использовали свежеприготовленную бидистиллированную воду. Кислород из полученных растворов удаляли продувкой аргоном в течение 45 мин.

Приготовленные образцы облучали на γ -установке с источником излучения ^{60}Co , мощность дозы — $(0,45 \pm 0,1)$ Гр/с. Интервал поглощенных доз для растворов серинола и липосом лизосфингомиелина составил 0,54—2,70 кГр. УФ-облучение проводили сплошным спектром дуговой ртутной трубчатой лампы высокого давления (ДРТ-100) на расстоянии 20 см от источника света, мощность дозы составляла $6,8 \cdot 10^{15}$ квант с^{-1} мл^{-1} на длинах волн 230—280 нм. Время облучения для растворов N-(2-гидроксипропил)гексанамида составляло 10—100 мин, для липосом из сфингомиелина — 30—150 мин.

Анализ аммиака в растворах серинола проводили методом жидкостной хроматографии, как описано в [9]. Анализ карбонильных продуктов радиолитического и фотолитического распада осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе «Shimadzu» с УФ-детектором после проведения реакции карбонильных соединений с 2,4-динитрофенилгидразином. Условия хроматографирования: колонка NUCLEOSIL 120-5 C₁₈ (длина 250 мм, внутренний диаметр 4 мм); элюент — метанол—вода (60 : 40); скорость подачи элюента — 0,5 мл/мин; температура — 40 °С; детектор — UV-VIS, $\lambda = 360$ нм; объем вводимой пробы — 4 мкл. Анализ 2-гексадеценала и насыщенных углеводов 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).

Радиационно-химические выходы образования веществ рассчитаны из данных по накоплению продуктов радиолитического распада от поглощенной дозы. Все приведенные данные получены путем усреднения не менее 3 серий экспериментов. В использованном интервале поглощенных доз концентрации продуктов радиолитического распада увеличивались линейно с ростом дозы облучения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Родоначальником сфинголипидов является сфингозин. Этот аминоспирт содержит в своем составе фрагмент 2-аминоглицерина (серинола). Нами исследован состав и определены выходы продуктов радиолитического распада деаэрированного 0,1 М водного раствора серинола в зависимости от pH среды (табл. 1). Полученные данные свидетельствуют, что основными продуктами радиолитического распада серинола являются аммиак и различные карбонилсодержащие вещества, которые образуются при дезаминировании и C–C-деструкции исходного соединения. На выход аммиака и других продуктов радиолитического распада серинола существенно влияет pH исходных растворов. Согласно данным табл. 1, склонность серинола к деструкции с разрывом C–C-связи существенно возрастает в щелочных средах (pH 11,0), когда аминогруппа депротонирована.

Таблица 1

Радиационно-химические выходы G (молекул/100 эВ) образования продуктов радиолитического распада 0,1 М деаэрированных растворов серинола в зависимости от pH

Продукты	pH		
	3,0	7,4	11,0
NH ₃	2,08 ± 0,06	2,94 ± 0,05	3,03 ± 0,12
HOCH ₂ CH ₂ CHO	0,20 ± 0,01	0,82 ± 0,06	0,54 ± 0,04
HOCH ₂ C(O)CH ₃	0	0,03 ± 0,01	0,23 ± 0,01
CH ₂ O	0,02 ± 0,01	0,20 ± 0,03	0,40 ± 0,06*
CH ₃ CHO	0,01 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,29 ± 0,05
HOCH ₂ CHO	0,015 ± 0,03	0,05 ± 0,04	0,36 ± 0,03

* Так как формальдегид в щелочных средах вступает в реакции конденсации, приведенное в таблице значение выхода формальдегида при pH 11,0 может быть занижено.

Был изучен изотопно-кинетический эффект свободнорадикальных превращений нейтральных и щелочных растворов серинола. Выходы продуктов фрагментации 0,1 М деаэрированных растворов серинола в дейтерированной воде представлены в табл. 2.

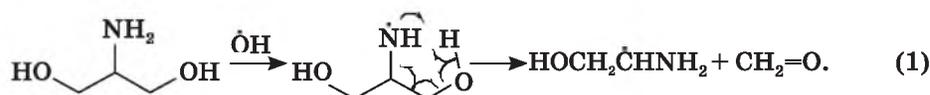
Таблица 2

Радиационно-химические выходы G (молекул/100 эВ)
образования карбонильных продуктов радиолита 0,1 М
деаэрированных растворов серинола в D_2O

Продукты	рН	
	7,0	11,0
$HOCH_2CH_2CHO$	$1,54 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,05$
$HOCH_2C(O)CH_3$	—	$0,01 \pm 0,01$
CH_2O	$0,05 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,04$
CH_3CHO	$0,02 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,02$
$HOCH_2CHO$	$0,01 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,01$

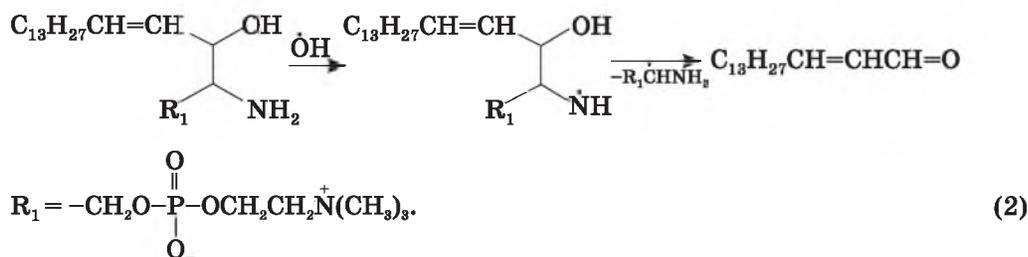
Сравнивая данные по выходам продуктов радиолита серинола в H_2O и D_2O (табл. 2), легко заметить, что замена атомов водорода в функциональной группе исходного вещества на дейтерий, приводит к значительному уменьшению вероятности реализации рассматриваемых процессов. Особенно это характерно для радиационно-химических процессов образования продуктов деструкции N-центрированных радикалов серинола, таких как формальдегид, ацетальдегид и гликолевый альдегид.

При изучении радиолита водных растворов алифатических аминов показано [10, 11], что депротонированная аминогруппа в органических соединениях более реакционноспособна по отношению к OH-радикалам. С учетом сказанного выше, образование молекулярного продукта деструкции серинола — формальдегида может протекать через стадию образования N-центрированных радикалов молекул исходного вещества:



В данном случае формальдегид образуется в качестве молекулярного продукта на ранней стадии процесса C-C-деструкции серинола и является основным продуктом деструкции. Наличие выраженного изотопно-кинетического эффекта для ряда продуктов свидетельствует о том, что в ходе их образования происходит разрыв либо N-D-, либо O-D-связи. Эти данные могут служить подтверждением предложенного выше механизма.

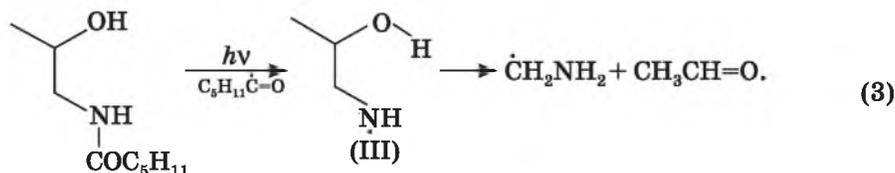
Реализация аналогичного (1) процесса при радиолите водных дисперсий лизосфингомиелина приводит к образованию 2-гексадеценаля:



Анализ 2-гексадеценаля в облученных дисперсиях лизосфингомиелина проводился методом газовой хроматографии с масс-детектором, его радиационно-химический выход составил $(0,22 \pm 0,04)$ молекул/100 эВ.

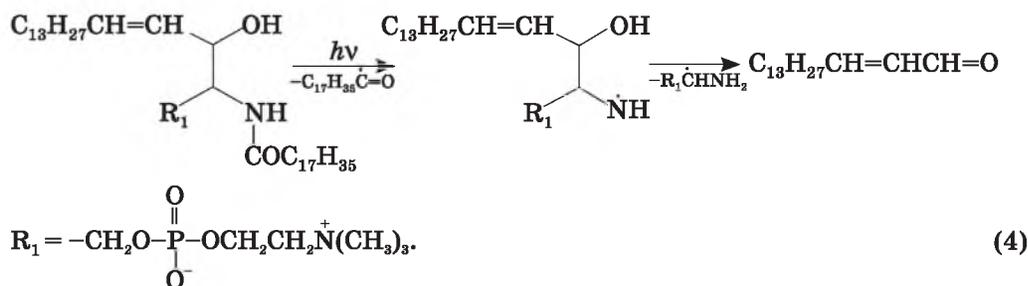
Известно, что фотохимические превращения амидов идут по Норришу типа I, в результате чего образуются N-центрированные радикалы. Мы исследовали возможность реализации данного процесса для синтезированного амидоспирта, моделирующего сфинголипиды.

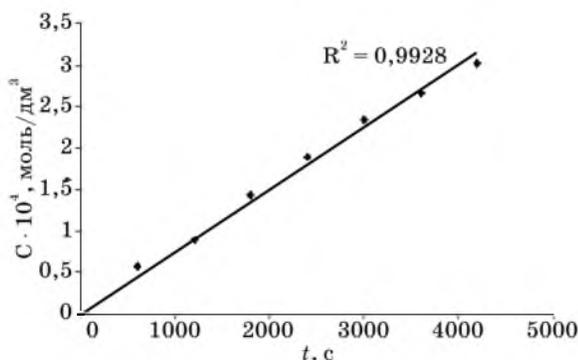
Анализ продуктов фотолиза амидного производного капроновой кислоты и аминопропанола свидетельствует о том, что исходное вещество подвергается распаду по Норришу типа I с образованием ацильных $\text{C}_5\text{H}_{11}^\cdot\text{CO}$ -радикалов, которые при дальнейшем декарбонилировании образуют радикалы пентана $^\cdot\text{C}_5\text{H}_{11}$. В результате фрагментации N-центрированных радикалов образуется ацетальдегид, его квантовый выход составил $1,1 \cdot 10^{-3}$ молекул/квант. Это указывает на реализацию предложенного выше механизма:



Накопление ацетальдегида при фотолизе амидного производного капроновой кислоты и аминопропанола показано на рисунке.

Особый интерес ввиду биологической значимости сфингомиелина представляет установление возможности его фотораспада. Полученные данные по фотолизу сфингомиелина подтверждают его фотохимическую трансформацию с образованием 2-гексадеценаля:





Накопление ацетальдегида в 0,1 М растворе
N-(2-гидроксипропил)гексанамида
в зависимости от времени облучения

Среди продуктов фотолиза 0,02 М водных дисперсий сфингомиелина нами был обнаружен 2-гексадеценаль, его квантовый выход оказался равным $1,5 \cdot 10^{-3}$ молекул/квант. Наряду с 2-гексадеценалем качественно были идентифицированы длинноцепочечные углеводороды, что подтверждает фотохимическую трансформацию сфингомиелина по схеме (4).

ВЫВОДЫ

Приведенные в настоящей статье данные указывают на реализацию γ - и УФ-индуцированной фрагментации сфинголипидов с разрывом С—С-связи, которая ранее не была описана. Такие процессы деструкции могут иметь еще более драматические последствия для биологических систем, чем свободнорадикальные процессы окисления и фрагментация без разрыва С—С-связи, так как ведут к непосредственному разрушению углеродного скелета биологически важных соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yurkova I. L., Shadyro O. I., Kisel M. A. et al. // Chem. Phys. Lipids. 2004. Vol. 132. P. 235—238.
2. Shadyro O. I., Yurkova I. L., Kisel M. A. et al. // Free Radical. Biol. Med. 2004. Vol. 36. P. 1612—1615.
3. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. H. // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226. P. 497—500.
4. Radin N. S. // J. Lipid Res. 1976. Vol. 17. P. 290—294.
5. Bittman R., Verbicky C. // J. Lipid. Res. 2000. Vol. 41. P. 2089—2094.
6. Kaller H. // Biochem. Zeitschrift. 1961. Bd. 334. P. 451—455.
7. Безуглов В. В., Грецкая Н. М., Блаженова А. В. и др. // Биоорган. химия. 2006. Т. 32, № 3. С. 258—262.
8. Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C. // J. Mol. Biol. 1965. Vol. 13. P. 238—242.
9. Шадыро О. И., Сосновская А. А., Врублевская О. Н. // Химия высоких энергий. 1999. Т. 33, № 2. С. 94—99.
10. Simic M., Neta P., Hayon E. // J. Rad. Phys. Chem. 1971. Vol. 3. P. 309—313.
11. Getoff N., Schworer F. // J. Rad. Phys. Chem. 1973. Vol. 5. P. 101—105.