

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 радиолиза и фотолиза водных дисперсий природного сфингомиелина и лизо-сфингомиелина, 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  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР.

Многослойные липосомы получали диспергированием тонкой липидной пленки в фосфатном буфере ( $c = 0,05$  моль/л, рН 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  $\gamma$ -установке с источником излучения  $^{60}\text{Co}$ , 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  $\text{с}^{-1} \text{мл}^{-1}$  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 радиолиза и фотолиза 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 C<sub>18</sub> (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-гексадеценаля 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 радиолиза от поглощенной дозы. Все приведенные данные получены путем усреднения не менее 3 серий экспериментов. В использованном интервале поглощенных доз концентрации продуктов радиолиза 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 радиолиза деаэрированного 0,1 М водного раствора серинола в зависимости от pH среды (табл. 1). Полученные данные свидетельствуют, что основными продуктами радиолиза серинола являются аммиак и различные карбонилсодержащие вещества, которые образуются при дезаминировании и С-С-деструкции исходного соединения. На выход аммиака и других продуктов радиолиза серинола существенно влияет pH исходных растворов. Согласно данным табл. 1, склонность серинола к деструкции с разрывом С-С-связи существенно возрастает в щелочных средах (pH 11,0), когда аминогруппа депротонирована.

Таблица 1

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

| Продукты                              | pH           |             |              |
|---------------------------------------|--------------|-------------|--------------|
|                                       | 3,0          | 7,4         | 11,0         |
| NH <sub>3</sub>                       | 2,08 ± 0,06  | 2,94 ± 0,05 | 3,03 ± 0,12  |
| НОСН <sub>2</sub> СН <sub>2</sub> СНО | 0,20 ± 0,01  | 0,82 ± 0,06 | 0,54 ± 0,04  |
| НОСН <sub>2</sub> С(О)СН <sub>3</sub> | 0            | 0,03 ± 0,01 | 0,23 ± 0,01  |
| СН <sub>2</sub> О                     | 0,02 ± 0,01  | 0,20 ± 0,03 | 0,40 ± 0,06* |
| СН <sub>3</sub> СНО                   | 0,01 ± 0,00  | 0,04 ± 0,01 | 0,29 ± 0,05  |
| НОСН <sub>2</sub> СНО                 | 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.

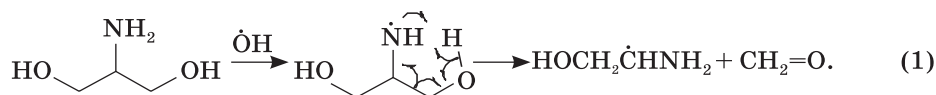
Таблица 2

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

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

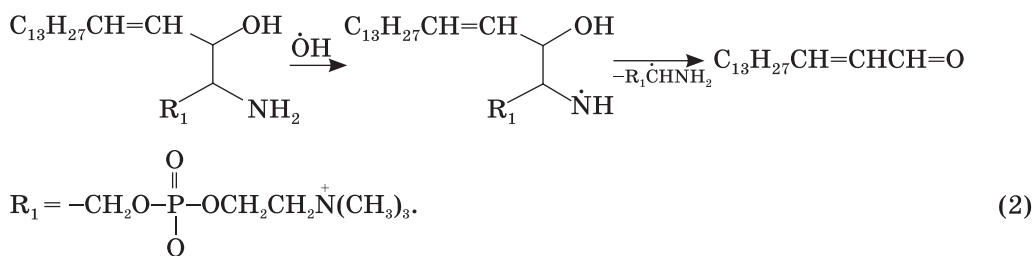
Сравнивая данные по выходам продуктов радиолиза серинола в  $H_2O$  и  $D_2O$  (табл. 2), легко заметить, что замена атомов водорода в функциональной группе исходного вещества на дейтерий, приводит к значительному уменьшению вероятности реализации рассматриваемых процессов. Особенно это характерно для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

При изучении радиолиза 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.

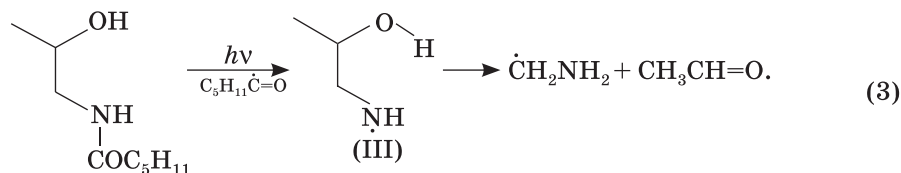
Реализация аналогичного (1) процесса при радиолизе водных дисперсий лизосфингомиелина приводит к образованию 2-гексадеценаля:



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.

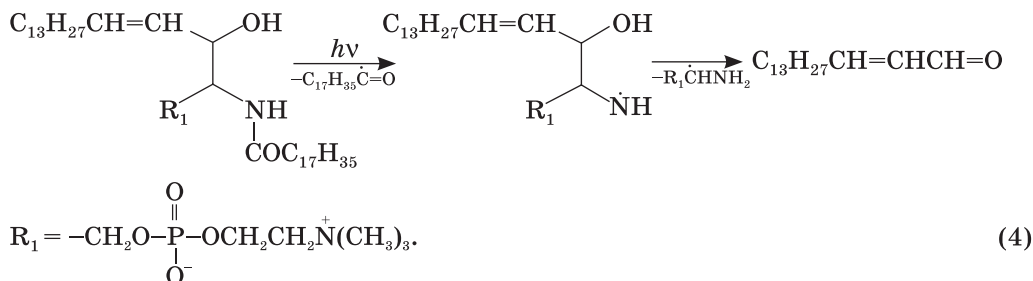
Известно, что фотохимические превращения амидов идут по Норришу типа I, в результате чего образуются N-центрированные радикалы. Мы исследовали возможность реализации данного процесса для синтезированного амидоспирта, моделирующего сфинголипиды.

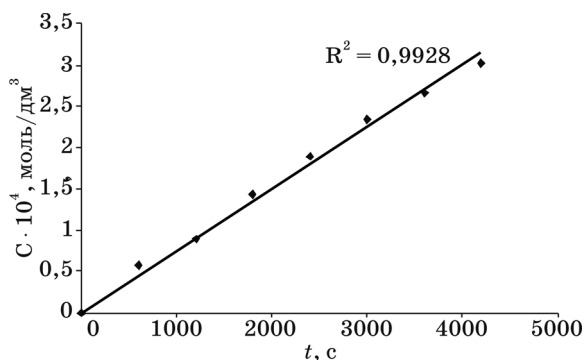
Анализ продуктов фотолиза амидного производного капроновой кислоты и аминопропанола свидетельствует о том, что исходное вещество подвергается распаду по Норришу типа I с образованием ацильных  $\text{C}_5\text{H}_{11}\cdot\text{CO}$ -радикалов, которые при дальнейшем декарбонилировании образуют радикалы 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  $\gamma$ - 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.