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 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, используя способ, описанный в [3, 4]. Сфингозилфосфохолин (лизосфингомиелин) получали деацилированием сфингомиелина [5, 6]. Синтез N-(2-гидроксипропил)гексанамида осуществляли по методу, основанному на ацилировании аминоспирта смешанным ангидридом капроновой и *н*-бутилугольной кислот в системе растворителей ТГФ—ацетонитрил с добавлением 15 мкл триэтиламина [7]. Для подтверждения структуры синтезированных веществ использовали спектроскопию ^{1}Н- и ^{13}С-ЯМР.

Многослойные липосомы получали диспергированием тонкой липидной пленки в фосфатном буфере (*с*=0,05 моль/л, pH 7,4) [8]. Концентрация липидов в полученных липосомах составила $2\cdot10^{-2}$ 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±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 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_{18} (длина 250 мм, внутренний диаметр 4 мм); элюент – метанол—вода (60:40); скорость подачи элюента – 0,5 мл/мин; температура – 40 ºС; детектор – UV-VIS, λ = 360 нм; объем вводимой пробы – 4 мкл. Анализ 2-гексадеценаля и насыщенных углеводородов 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 таблицы 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/100эВ) образования продуктов радиолиза 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
$HOCH_2CH_2CHO$	0,20 ± 0,01	0,82 ± 0,06	0,54 ± 0,04
$HOCH_2C(O)CH_3$	0	0,03 ± 0,01	0,23 ± 0,01
CH_2O	0,02 ± 0,01	0,20 ± 0,03	0,40 ± 0,06*
CH_3CHO	0,01 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,29 ± 0,05
$HOCH_2CHO$	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 таблице 2.

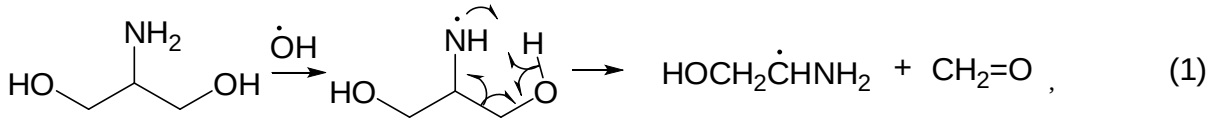
Сравнивая данные по выходам продуктов радиолиза серинола в H_2O и D_2O (см. табл. 2), легко заметить, что замена атомов водорода в функциональной группе исходного вещества на дейтерий, приводит к значительному уменьшению вероятности реализации рассматриваемых процессов. Особенно это характерно для радиационно-химических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

Таблица 2

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

Продукты	pH	
	7,0	11,0
$HOCH_2CH_2CHO$	1,54 ± 0,04	0,24 ± 0,05
$HOCH_2C(O)CH_3$	-	0,01 ± 0,01
CH_2O	0,05 ± 0,03	0,14 ± 0,04
CH_3CHO	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,02
$HOCH_2CHO$	0,01 ± 0,02	0,03 ± 0,01

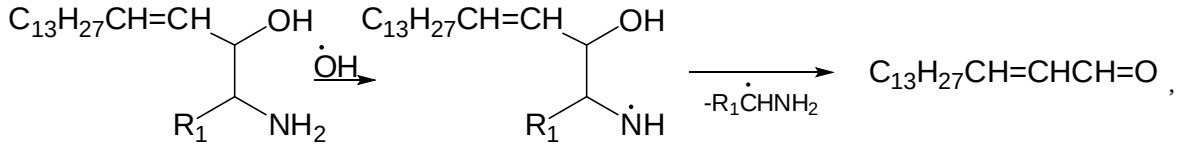
При изучении радиолиза водных растворов алифатических аминов показано [10, 11], что депротонированная аминогруппа в органических соединениях более реакционноспособна по отношению к ОН-радикалам. С учетом сказанного выше, образование молекулярного продукта деструкции серинола - формальдегида может протекать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

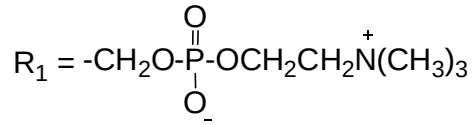


(1)

В данном случае формальдегид образуется в качестве молекулярного продукта на ранней стадии процесса С—С-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:





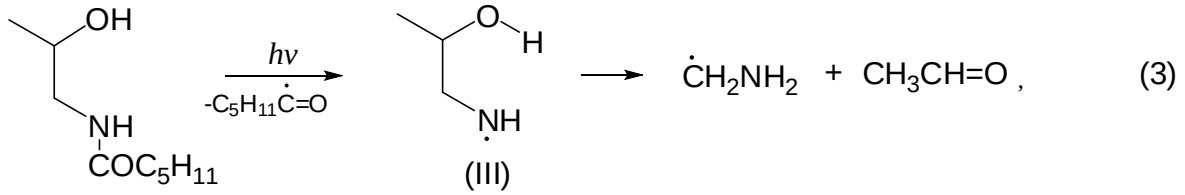
(2)

Анализ 2-гексадеценаля в облученных дисперсиях лизосфингомиелина проводился методом газовой хроматографии с масс-детектором, его радиационно-химический выход составил (0,22±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 радикалов $C_5H_{11}\dot{C}O$-радикалы, которые при дальнейшем декарбонилировании образуют радикалы пентана $\dot{C}_5H_{11}$. В результате фрагментации N-центрированных радикалов образуется ацетальдегид,

его квантовый выход составил $1{,}1\cdot10^{-3}$ молекул/квант. Это указывает на реализацию предложенного выше механизма:



Накопление ацетальдегида при фотолизе амидного производного капроновой кислоты и аминопропанола показано на рисунке 1.

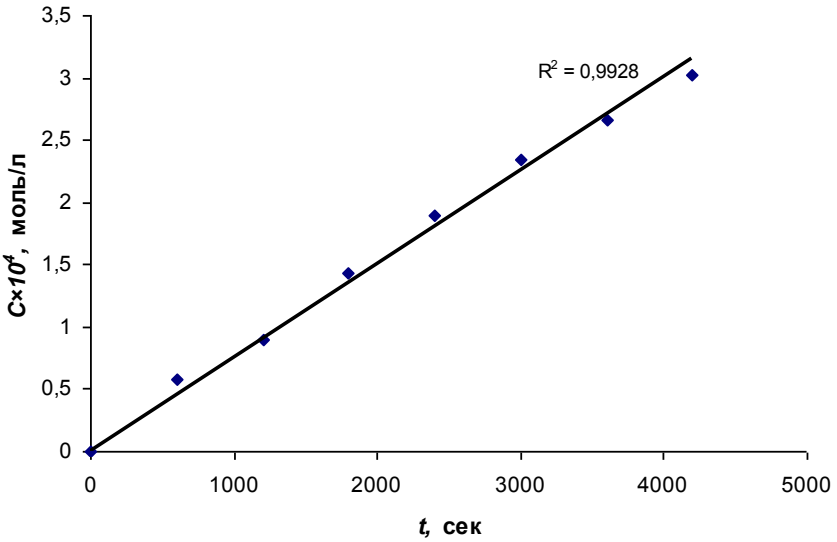
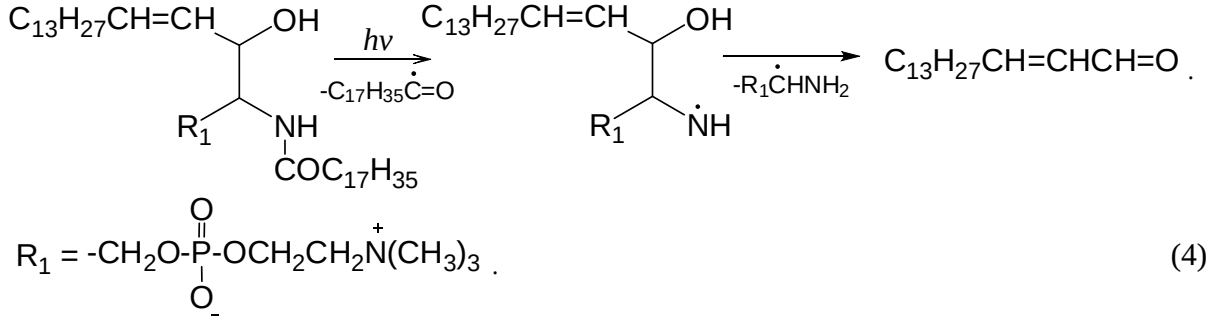


Рис. 1. Накопление ацетальдегида в 0,1 М растворе N-(2-гидроксипропил)гексанамида в зависимости от времени облучения

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



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

Таким образом, приведенные в настоящей статье данные указывают на реализацию γ- и УФ-индуцированной фрагментации сфинголипидов с разрывом С—С-связи, которая ранее не была описана.

Данные 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.

Л И Т Е Р А Т У Р А

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

УДК 541.15; 541.14; 547.435; 547.952

Лисовская А. Г., Шадыро О. И., **Новые механизмы радиационно-индуцированных превращений сфинголипидов** // Свиридовские чтения: Сб. ст. Вып. . Минск, 2010. С.

Данные, полученные по радиолизу 2-аминоглицерина и сфингозинфосфохолина, позволили сделать заключение, что образование молекулярных фрагментов происходит в результате фрагментации гидроксилсодержащих C- и N-центрированных радикалов через разрыв двух β-связей.

Анализ конечных продуктов УФ-индуцированных превращений N-(2-гидроксипропил)гексанамида и сфингомиелина позволяет предложить новый механизм фотораспада сфинголипидов, который может быть описан комбинацией фрагментации по Норришу типа I и последующего распада N-центрированных радикалов липида с разрывом двух β-связей.

Библиогр. 11 назв., ил. 1, табл. 2.

Lisovskaya A. G., Shadyro O. I., **New mechanisms of radiation-induced sphingolipid transformations** // Sviridov readings. Iss . Minsk, 2010. P.

The data obtained from 2-aminoglycerin and sphingosine phosphorylcholine γ-radiolysis, allowed to make a conclusion that formation of molecular fragments occurs due to the fragmentation of C- and N-centered radicals carrying the hydroxyl group via the breakup of two β-bonds.

Analysis of the final products UV-induced transformations of N-(2-hydroxypropyl)hexanamide and sphingomyelin allows to offer a new mechanism of photodisintegration of sphingolipids, that can be described by the combination of Norrish type I fragmentation and following two β-bonds rupture in formed N-centered radicals of lipids.