

ВЛИЯНИЕ ИЗОТОПНОГО Н-Д ЭФФЕКТА НА РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ГЛИЦЕРИНА

Д. И. Бобров

*Белорусский государственный университет, химический факультет;
dmitrybobrovig@gmail.com;*

*науч. рук. – О. И. Шадыро, д-р. хим. наук, проф., Р. Л. Свердлов, канд.
хим. наук, доц.*

Было проведено сравнение радиационно-химических выходов гидроксиацетона (ГА), глицеринового альдегида (ГлиА), дигидроксиацетона (ДГА) и 3-гидроксипропаналя (ЗГП) для γ -радиолиза деаэрированных 1,0 М и 0,10 М водных растворов глицерина и глицерина-2-d1 (ДГ). Установлено, что важную роль в образовании ГА и ЗГП играют цепные процессы с участием углерод-центрированных радикалов. Впервые показано, что введение дейтерия в положение С-2 глицерина подавляет протекание радикальных реакций у данного атома углерода. Так, для 1,0 М растворов ДГ выход ГА снижается в 4,3, а для 0,10 М – в 2,5 раза по сравнению с растворами глицерина. Данная работа показывает перспективность исследования влияния атома дейтерия в остатке глицерина на устойчивость природных липидов к радикальным превращениям, что может иметь терапевтическое значение при лечении ряда заболеваний.

Ключевые слова: γ -радиолиз, глицерин, глицерин-2-d1, изотопный Н-Д эффект.

ВВЕДЕНИЕ

Все больше и больше работ подтверждают, что свободнорадикальные превращения в клетке играют существенную роль в развитии ряда серьезных патологий. Наиболее важными с эпидемиологической точки зрения являются атеросклероз [1], инфаркт миокарда [2], онкологические заболевания [3], болезнь Альцгеймера [4] и другие нейродегенеративные заболевания [5], при которых наблюдается повреждение липидов.

Также было показано, что гидроксилсодержащие глицерофосфолипиды (ГГФЛ), в том числе и кардиолипиды (КЛ), основной липид мембран митохондрий, вступают в $\cdot$ ОН-индуцированные процессы деструкции, нехарактерные для остальных липидов [6].

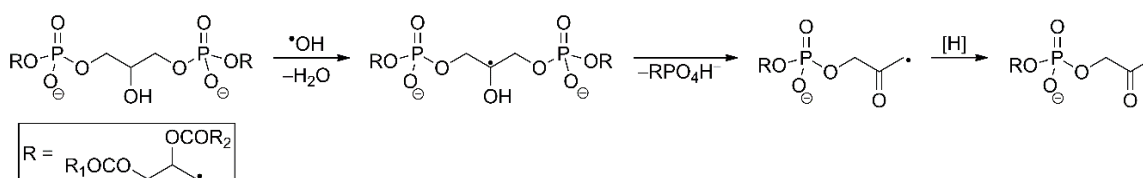


Рис.1. Радикальные превращения КЛ [6]

Особый интерес к радикальным превращениям КЛ (рис. 1) вызывает тот факт, что их основной стабильный продукт, фосфатидная кислота, регулирует участие ряда белков в контроле прогрессии клеточного цикла и роста клеток [6]. Избыточные радикальные превращения ГГФЛ и КЛ, скорее всего, играют определенную роль в развитии ряда заболеваний, в связи с чем подавление этих процессов может иметь терапевтический эффект.

Потенциально введение дейтерированных аналогов биомолекул в организм не повлияет на их биологические функции, но сможет подавить побочные радикальные процессы, приводящие к развитию патологий, за счет наличия более прочных связей C–D. Теоретически, введение дейтерия в остаток глицерина способно замедлить радикальные превращения, как минимум, ГГФЛ и КЛ, а возможно и других липидов. Простейшей модельной системой для изучения влияния дейтерия на радикальные превращения ГГФЛ и КЛ является чистый глицерин и его дейтерированный аналог, глицерин-2-d₁ (ДГ).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все растворы, включая как системы для радиолиза, так и стандарты для хроматографического определения, были приготовлены путем взвешивания точных навесок (чистота не менее 95%) на аналитических весах (точность до 0,1 мг) с последующим разбавлением в мерной посуде (2 класс точности) 50 мМ (KH₂PO₄ + Na₂HPO₄) фосфатным буфером (pH 7,10 ± 0,10).

Радиолиз. Инициирование радикальных процессов – γ-излучением изотопа ⁶⁰Со (установка МРХ-γ-25М). Мощность дозы – 0,105 ± 0,003 Гр/с. Интервал поглощенных доз: 0,0 (контроль) – 756 Гр (использовались партии, состоящие из 5 ампул с ~400 мкл раствора глицерина или глицерина-2-d₁ с концентрацией 1,0 М или 0,10 М, в которой каждая ампула облучалась разное время: 0, 30, 60, 90 и 120 мин). Удаление кислорода из растворов осуществлялось продуванием высокочистого аргона (99,993%) в течение 50 мин., с последующей запайкой ампул.

Методика дериватизации. К исследуемому раствору (облученный глицерин, растворы стандартов) объемом 200 мкл прибавляли 200 мкл

раствора 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ) в метаноле ($C_{\text{ДНФГ}} = 1,5 \text{ мМ}$, $C(\text{H}^+) = 0,7 \text{ М}$, 4,7% H_2O по объему), интенсивно перемешивали и выдерживали перед анализом пробы в течение 15 минут в темном месте во избежание фоторазложения продуктов дериватизации. Большинство производных карбонильных соединений с ДНФГ имеют максимум поглощения в диапазоне 350 – 390 нм, в связи с чем определение площадей пиков соответствующих гидразонов проводилось на длине волны $365 \pm 7 \text{ нм}$ [7, 8].

Количественный анализ. Для проведения количественного анализа использовался жидкостный хроматограф Shimadzu LCMS-2020 с колонкой VP-ODS (150 мм, в. д. 4,6 мм, диаметр частиц 4,6 мм, диаметр пор 12 нм) при температуре 40 °С и скорости потока 0,8 мл/мин. Градиентный режим элюирования, смесь метанол-вода (линейное увеличение доли метанола от 40% до 60% в течение 10 мин, 60% MeOH с 10-ой по 26-ю мин). Объем задаваемой пробы – 3 мкл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Механизм образования основных продуктов радиолиза водных растворов глицерина приведен на рис. 2 и рис. 4.

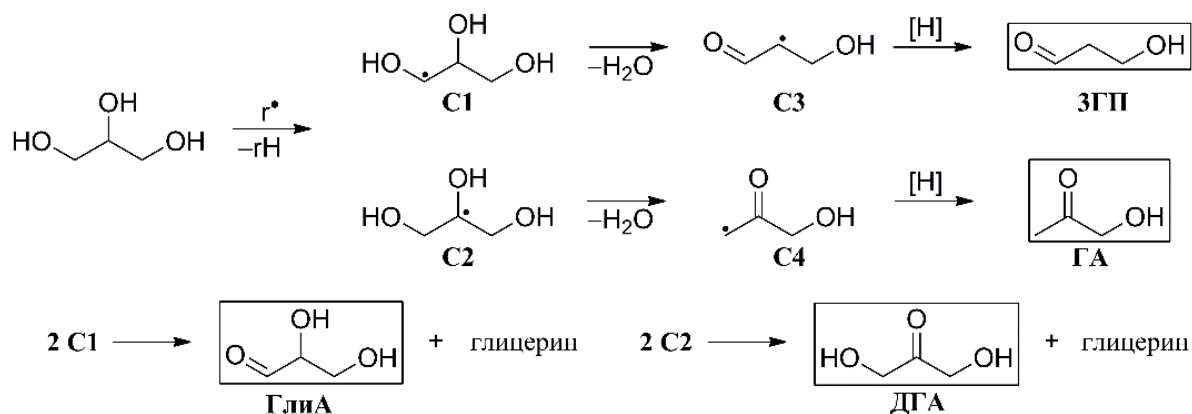


Рис.2. Механизм образования основных продуктов радиолиза растворов глицерина

Помимо процессов, изображенных на рис. 1, протекают реакции рекомбинации радикалов C1 – C4 друг с другом.

Результаты радиационно-химического эксперимента (усредненные данные трех независимых экспериментов) приведены в таблице ниже.

Таблица 1

Данные по радиационно-химическим выходам (молекул/100 эВ) основных продуктов радиолиза 1,0 М и 0,10 М растворов обычного (Н) и дейтерированного (D) глицерина.

Веще- ство	1,0 М глицерин		0,10 М глицерин	
	Н	D	Н	D
ГА	2,129 ± 0,390	0,497 ± 0,112	0,795 ± 0,137	0,313 ± 0,058
ДГА + ГлиА	0,559 ± 0,095	0,537 ± 0,066	0,359 ± 0,054	0,383 ± 0,049
ЗГП	1,728 ± 0,724	3,063 ± 0,716	3,016 ± 0,163	5,071 ± 0,227
ДГА	—	—	0,0374 ± 0,0076	0,0410 ± 0,0052
ГлиА	—	—	0,322 ± 0,054	0,342 ± 0,049

Для объяснения полученных результатов была выдвинута гипотеза (рис. 3), суть которой состоит в том, что радикалы Н· и ·ОН взаимодействуют примерно с одинаковой скоростью как с глицерином, так и с ДГ ввиду своей высокой активности, в то время как углерод-центрированные радикалы (УЦР) медленнее отщепляют водород от связи С–D, чем от связи С–Н.

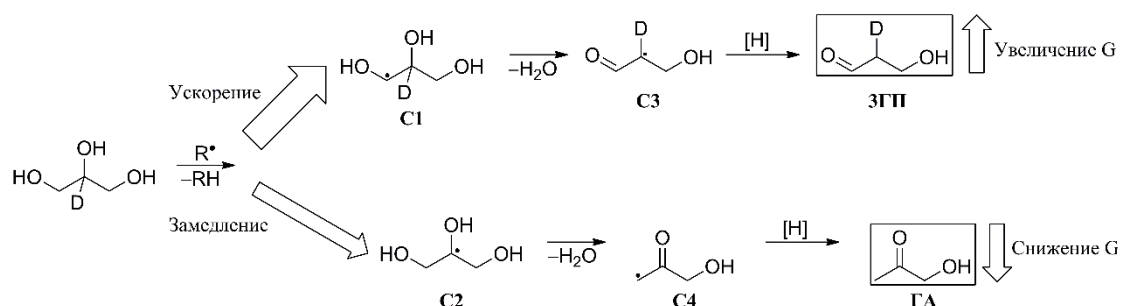


Рис.3. Изменение в скорости превращений при введении дейтерия (R· – УЦР).

Значение $G(\text{ГА}) > 2$ для 1,0 М раствора и $G(\text{ЗГП}) > 2$ для 1,0 М и 0,10 М растворов глицерина свидетельствуют о протекании цепных процессов в ходе радиолиза (рис. 4).

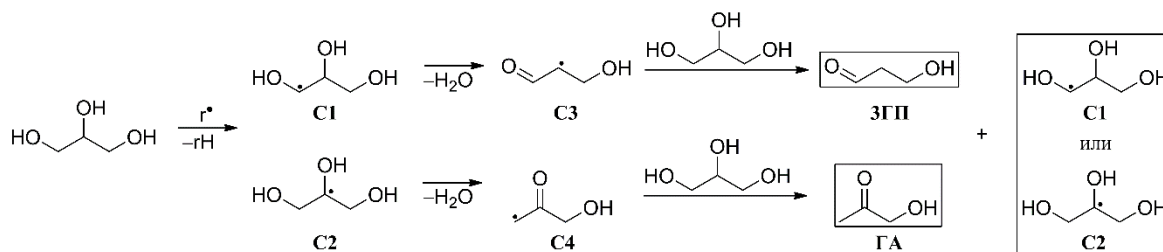


Рис.4. Цепные процессы в ходе радиолиза водных растворов глицерина

При переходе к 0,10 М раствору выход ГА ожидаемо снижается из-за уменьшения концентрации субстрата, однако, соотношение величин $G(\text{ГА})_{\text{глицерин}} : G(\text{ГА})_{\text{ДГ}}$ для 1,0 М раствора составляет 4,3, в то время как для 0,10 М раствора оно равно 2,5. Если бы УЦР не участвовали в цепном процессе, то соотношение $G(\text{ГА})_{\text{глицерин}} : G(\text{ГА})_{\text{ДГ}}$ было бы одинаковым в случае 1,0 М и 0,10 М растворов.

Снижение величины $G(\text{ГА})$ при радиолизе растворов ДГ с концентрацией 1,0 М (4,3 раза) и 0,10 М (2,5 раза) по сравнению с растворами глицерина аналогичной концентрации, а также подавление цепных процессов в случае 1,0 М раствора говорит о том, что дейтерированные атомы углерода менее склонны к участию в радикальных реакциях. Можно сделать вывод, что константы скоростей реакций УЦР по положению С-2 ощутимо меньше для ДГ, чем для глицерина.

Утилизация радикалов С1 – С4 путем отщепления атома дейтерия от положения С-2 замедлена в случае растворов ДГ, что ведет к более высокой их стационарной концентрации и, как следствие, ускорению остальных путей утилизации этих радикалов (в том числе и взаимодействие по положению С-1). В связи с этим выход ЗГП в случае радиолиза растворов ДГ по сравнению с глицерином увеличивается.

Увеличение выхода ЗГП в 0,10 М растворе по сравнению с 1,0 М можно объяснить тем, что в разбавленном растворе процессы диспропорционирования и рекомбинации радикалов С1 друг с другом (бимолекулярные реакции) протекают значительно медленнее, чем в концентрированном, в результате чего больше радикалов С1 успевает превратиться в С3, что приводит к увеличению $G(\text{ЗГП})$ ($\text{С1} \rightarrow \text{С3} \rightarrow \text{ЗГП}$).

Наличие атома дейтерия в положении С-2 ДГ не влияет на величину $G(\text{ГлиА})$ и $G(\text{ДГА})$, что говорит о высокой склонности радикалов С1 и С2 к отщеплению воды с образованием С3 и С4.

На основании экспериментальных данных можно предположить, что липиды и лизолипиды, содержащие атом (-ы) дейтерия в остатках глицерина, будут более устойчивы к воздействию радикальных процессов, протекающих *in vivo*, что может иметь серьезное биологическое значение. Например, ожидается, что превращения ГГФЛ и КЛ (рис. 1), содержащих атом дейтерия в положении С-2 остатка глицерина, будут значительно замедлены.

Библиографические ссылки

1. Bonomini F. [et al.]. Atherosclerosis and oxidative stress // Histology and histopathology. 2008. Vol. 23, № 3. P. 381–390. DOI: 10.14670/HH-23.381.
2. Ramond A. [et al.]. Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia // Fundamental & Clinical Pharmacology. 2013. Vol. 27, № 3. P. 252–261. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2011.01015.x.

3. *Halliwell B.* Oxidative stress and cancer: have we moved forward? // *Biochem J.* 2007. Vol. 401, № 1. P. 1–11. DOI: 10.1042/BJ20061131.
4. *Pohanka, M.* Alzheimer's Disease and Oxidative Stress: A Review // *Current Medicinal Chemistry.* 2014. Vol. 21, № 3. P. 356–364(9). DOI: 10.2174/09298673113206660258.
5. *Farooqui A. A., Horrocks L. A., Farooqui. T.* Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders // *Chemistry and Physics of Lipids.* 2000. Vol. 106, № 1. P. 1–29. DOI: 10.1016/S0009-3084(00)00128-6.
6. *Shadyro O., Samovich S., Edimecheva I.* Free-radical and biochemical reactions involving polar part of glycerophospholipids // *Free Radical Biology and Medicine.* 2019. Vol. 144. P. 6–15. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.02.033.
7. *Shigehisa Uchiyama, Yohei Inaba, Naoki Kunugita.* Derivatization of carbonyl compounds with 2,4-dinitrophenylhydrazine and their subsequent determination by high-performance liquid chromatography // *Journal of Chromatography B.* 2011. Vol. 879, № 17–18. P. 1282–1289. DOI: 10.1016/j.jchromb.2010.09.028.
8. *Zwiener C., Glauner T., Frimmel F.* Method optimization for the determination of carbonyl compounds in disinfected water by DNPH derivatization and LC–ESI–MS–MS // *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2002. Vol. 372. P. 615–621. DOI: 10.1007/s00216-002-1233-y.