

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ЛИЗОФОСФАТИДИЛХОЛИНА НА ВЫХОДЫ ЛИПОФИЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ ЕГО СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО РАСПАДА**В.Ю. Хруцкий^{1,*}, А.А. Сосновская¹, И.П. Едимечева¹, Р.Л. Свердлов¹, Е.В. Точилин²**¹*Учреждение Белорусского государственного университета**«Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», Минск*²*Государственное научно-производственное объединение**«Научно-практический центр Национальной академии наук**Беларуси по материаловедению», Минск*** rv.khruckin@gmail.com*

В организме человека лизоглицерофосфолипиды главным образом генерируются из глицерофосфолипидов путем селективного разрыва сложноэфирной связи и высвобождения одного ацильного остатка посредством ферментов, таких как фосфолипаза А₂ (ФЛА₂; КФ 3.1.1.4), фосфолипаза А₁ (КФ 3.1.1.32) и лецитин-холестерин ацилтрансфераза (КФ 2.3.1.43) или при участии активных форм кислорода (АФК). Однако активность ФЛА₂ является основным путем образования лизофосфолипидов в условиях *in vivo* [1, 2].

Сами лизофосфолипиды присутствуют в клетках в низкой концентрации по сравнению с соответствующими фосфолипидами из-за повсеместной экспрессии лизоацилтрансфераз. Напротив, лизофосфолипиды в значительном количестве содержатся в интерстициальных жидкостях и плазме в связанной с белками-носителями форме. Концентрация лизофосфатидилхолина (ЛФХ), наиболее распространенного лизофосфолипиды, в плазме крови человека находится в диапазоне от 200 до 300 мкмоль/л, в том числе 120–150 мкмоль/л приходится на 1-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин. Помимо связанной с альбумином формы (около 80%), небольшая часть ЛФХ плазмы обнаруживается в липопротеинах, эритроцитах и тромбоцитах. Эффективный метаболизм ЛФХ посредством ремоделирования (Lands' cycle) внутри клеток или прямая деградация важны для поддержания уровня ЛФХ. В определенных условиях ЛФХ может оказывать либо провоспалительное, либо противовоспалительное действие, причем высокое содержание ЛФХ усугубляет продукцию оксида азота и приводит к увеличению продукции АФК, что способствует повреждению эндотелиальных клеток при атеросклерозе и сердечно-сосудистых заболеваниях [3, 4].

При этом ЛФХ, как и иные гидроксилсодержащие глицерофосфолипиды, в реакциях свободнорадикальной фрагментации, индуцированной гидроксильным радикалом ([•]ОН), претерпевает разрыв эфирных связей. Ключевой стадией реакции фрагментации выступает распад α-гидроксилсодержащих углерод-центрированных радикалов с неспаренным электроном в β-положении к сложноэфирной (фосфоэфирной) связи, протекающий с разрывом двух вицинальных по отношению к радикальному центру связей. Следует отметить, что интенсивность реакций свободнорадикальной фрагментации возрастает по мере снижения содержания молекулярного кислорода [5].

Ацилоксиацетоны, в том числе пальмитоксиацетон (ПА; 2-оксопропилгексадеканат), являются одним из основных продуктов свободнорадикальной фрагментации ЛФХ, а именно 1-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина, по механизму в соответствии с рисунком 1. Но среди исследуемых липофильных продуктов [•]ОН-индуцированных превращений данного ЛФХ помимо ПА обнаруживается и пальмитиновая кислота (ПК). Однако ПА, иные пути генерации которого неизвестны, как специфичный маркер реакции свободнорадикальной фрагментации ЛФХ идентифицирован в воротке крови человека [6] и представляет интерес в качестве потенциального биомаркера в обла-

сти медицинской биотехнологии для диагностики функционального состояния клеток и тканей в условиях снижения концентрации молекулярного кислорода (гипоксии).

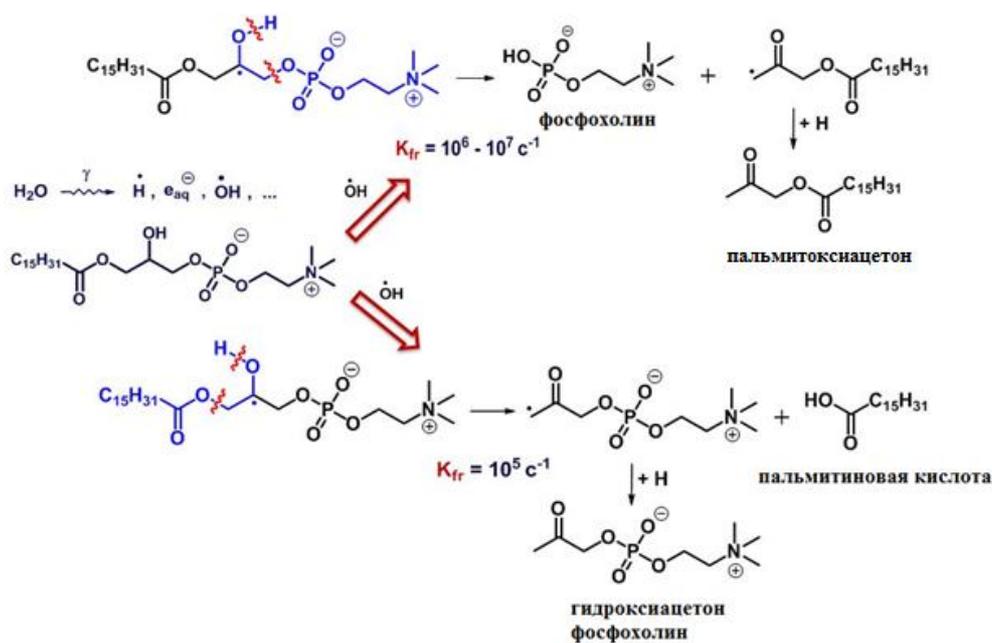


Рисунок 1. – Схема реакций свободнорадикальной фрагментации 1-пальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина при γ -радиолизе его водных дисперсий

Для применения конкретной молекулы в качестве маркера необходимо всестороннее исследование как биологической активности, так и механизмов образования с учетом различных факторов, в том числе влияния исходной концентрации субстрата на генерацию данного маркера.

Цель работы. Целью данного исследования было определение влияния концентрации 1-пальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина на выходы пальмитоксиацетона и пальмитиновой кислоты, липофильных продуктов его свободнорадикального распада, при γ -радиолизе деаэрированных водных дисперсий липида.

Материалы и методы. При реализации цели использовали разработанную химическую модель свободнорадикальной деструкции ЛФХ в отсутствие кислорода. Водные дисперсии ЛФХ (1-пальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина) получали путем растворения точных навесок ЛФХ в смеси хлороформ-метанол (2:1, v/v), полного удаления органических растворителей на ротационном испарителе (RV06-ML, «ИКА») для получения липидных пленок. Липидные плёнки диспергировали в растворе фосфатно-солевого буфера (pH 7.4), приготовленного на деионизованной воде, перемешивали методом ручного встряхивания в течение 60 мин, выдерживали в ультразвуковой ванне (Elmasonic S30H, «Elma») в течение 1 мин при 30 °C и насыщали аргоном в течение 20 мин. Далее разливали по 300 мкл дисперсии в предварительно продутые аргоном ампулы и запаивали в атмосфере аргона. Максимальная концентрация ЛФХ в водных дисперсиях составила 0.01 моль/л, из которых путем последовательного разведения получали концентрации ЛФХ в 0.001 и 0.005 моль/л.

Ампулы с образцами водных дисперсий липида облучали на γ -установке «Исследователь» с источником излучения ^{60}Co . Для определения мощности поглощенной дозы (P) использовали ферросульфатный дозиметр Фрикке, и в соответствии с методикой [7, 8] по концентрации ионов Fe^{3+} , установленной методом спектрофотометрии (UV-VIS PB 2201, «Солар») при $\lambda = 304 \text{ нм}$, определили $P = (0,055 \pm 0,006) \text{ Гр/с}$. Интервал поглощенных доз составил от 99.0 до 1122.0 Гр с максимальным временем облучения образцов 340 мин. Облучение образцов проводилось при температуре $(20 \pm 5) \text{ }^\circ\text{C}$.

Продукты свободнорадикальной деструкции ЛФХ анализировали методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (GCMS-QP2010 Plus, «Shimadzu») с применением химически синтезированного маргароксиацетона (МА; 2-оксопропилгептадеканоат) в качестве внутреннего стандарта, по которому определяли эффективность экстракции ПА и ПК при проведении пробоподготовки облученных образцов. Перед пробоподготовкой в стеклянные ампулы после вскрытия добавляли к облученным образцам в количестве 50 мкл 0.1 ммоль/л раствора

МА в изопропиловом спирте, тщательно перемешивали и для экстракции ПА и ПК добавляли 700 мкл смеси хлороформ-метанол (2:1, v/v), далее встряхивали на вортексе (Wise Mix VM-10m, «Dai Han Scientific») в течение 5 мин и оставляли на 20 мин для разделения фаз. Из полученного двухфазного раствора отбирали нижнюю «липидную» фазу и переносили в виалы, получали липидную пленку при продувке аргоном. Экстракцию аналитов повторяли дважды и полученную липидную пленку растворяли в 0.5 мл изопропилового спирта. Хроматографирование подготовленных образцов проводили при следующих параметрах: режим – мониторинг заданных ионов, хроматографическая колонка Stabilwax-DA (30 м; 0.25 мм; 0.25 мкм; полиэтиленгликоль, «Restek»).

Для идентификации хроматографических пиков, соответствующих времени выхода из хроматографической колонки ПА (27.5 ± 0.1 мин), МА (28.8 ± 0.1 мин) и ПК (28.0 ± 0.1 мин), использовали масс-спектры по характеристическим ионам с m/z 60, 73, 98, 116, 239, 253, 256, полученные при анализе стандартных растворов ПА, МА и ПК. На основании полученных данных строили график зависимости концентрации продуктов радиационно-иницированных превращений ЛФХ от поглощенной дозы, коэффициенты регрессии рассчитывали методом наименьших квадратов. Расчет радиационно-химического выхода проводили в соответствии с [7]. Концентрацию ПА и ПК с учетом степени экстракции определяли из соотношения известной концентрации и площади хроматографического пика МА и площади хроматографических пиков анализируемых соединений. Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием программного обеспечения Stat Soft Statistica 12. Все приведенные данные получены путем усреднения не менее трех независимых экспериментов.

Результаты. Зависимости концентрации продуктов фрагментации ЛФХ от поглощенной дозы представлены на рисунке 2.

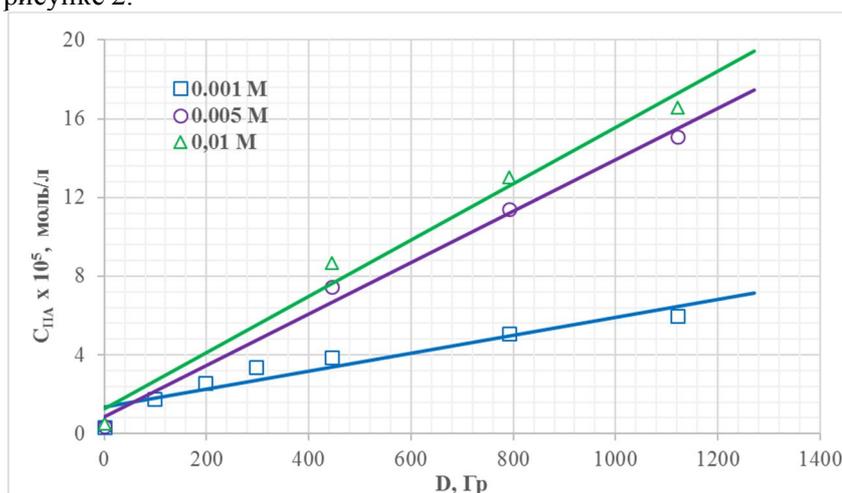


Рисунок 2. – Накопление ПА в γ -облученных водных дисперсиях ЛФХ в зависимости от поглощенной дозы облучения

Следует отметить, что в исходных образцах ЛФХ присутствовали примеси ПК и в облученных образцах ЛФХ накопление аналита было незначительным при исследованных дозах облучения и концентрации исходного ЛФХ. Однако в отношении ПА однозначно прослеживается накопление данного аналита по мере возрастания поглощенной дозы (рисунок 3) и концентрации исходного ЛФХ в водной дисперсии (рисунок 4).

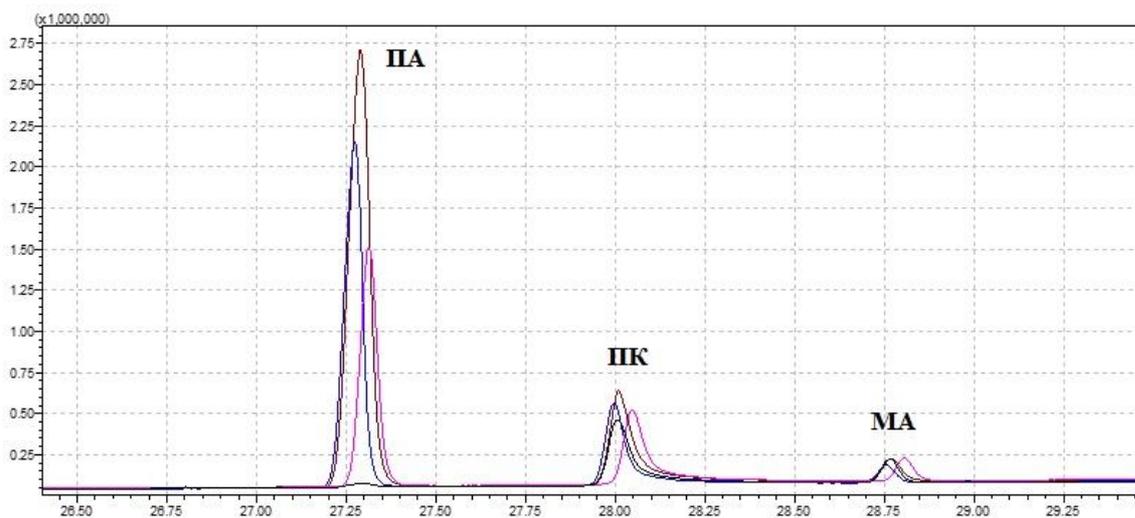


Рисунок 3. – Совмещенные хроматограммы облученных деаэрированных образцов 0.01 моль/л водной дисперсии ЛФХ при поглощенных дозах в 0 Гр (чёрный), 445.5 Гр (розовый), 792.0 Гр (синий) и 1122.0 Гр (коричневый); программа GCMS Solution, version 2.50 SU3

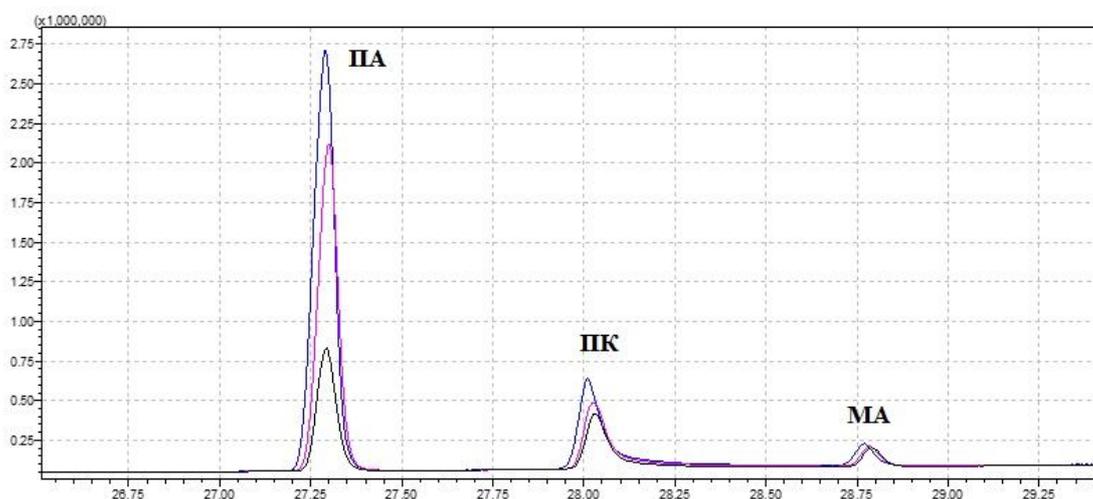


Рисунок 4. – Совмещенные хроматограммы облученных деаэрированных образцов 0.001 моль/л (чёрный), 0.005 моль/л (розовый) и 0.01 моль/л (синий) водных дисперсий ЛФХ при поглощенной дозе 1122.0 Гр; программа GCMS Solution, version 2.50 SU3

Рассчитанные из кривых накопления значения радиационно-химических выходов ПА составили: в 1 мМ дисперсии – 0.95 ± 0.45 молекул/100 эВ, в 5 мМ – 1.23 ± 0.36 молекул/100 эВ, в 10 мМ – 1.35 ± 0.53 молекул/100 эВ. Исходя из полученных данных, можно заключить, что с увеличением концентрации ЛФХ в диапазоне 1–10 ммоль/л в деаэрированных водных дисперсиях существенно возрастает радиационно-химический выход ПА в отличие от выхода ПК, на который концентрация ЛФХ влияет незначительно.

Заключение. Полученные результаты указывают на наличие положительной корреляционной связи между концентрацией ЛФХ и выходом ПА и ПК, образующихся при γ -радиолизе деаэрированных водных дисперсий ЛФХ с концентрацией 0.001, 0.005 и 0.01 моль/л. При этом преобладающим липофильным продуктом фрагментации ЛФХ является ПА, что подтверждает протекание реакции свободнорадикальной фрагментации с преимущественным разрывом фосфоэфирной связи в молекуле ЛФХ в деаэрированной системе. И, соответственно, ПА является одним из основных продуктов свободнорадикальной деструкции лизофосфолипидов, наиболее перспективных для рассмотрения в качестве маркера интенсивности данных процессов при гипоксии. Такие маркеры являются потенциальной основой для трансляционных исследований функционального со-

стояния клеток и тканей организма человека с целью выявления механизмов и прогнозирования развития патологических состояний.

Результаты исследования получены в ходе выполнения НИР 3.1.6.1 «Изучение закономерностей свободнорадикальной фрагментации лизофосфолипидов» (№ гос. регистрации 20210613) по заданию «Разработка стратегий поиска новых потенциальных биомаркеров для анализа функционального состояния клеток крови и тканей» в рамках ГПНИ «Биотехнологии-2» 2021–2025 годы.

Список использованных источников

1. Lysophospholipids: Potential Markers of Diseases and Infertility? / B. Fuchs [et al.] // Mini reviews in medicinal chemistry. – 2012. – Vol. 12, n. 1. – P. 74–86.
2. Nomenclature, Enzyme. «Recommendations of the nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology on the nomenclature and classification of enzymes» (1992) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/> – Дата доступа: 23.10.2023.
3. Emerging roles of lysophospholipids in health and disease / S.T. Tan [et al.] // Progress in Lipid Research. – 2020. – Vol. 80. – P. 101068.
4. An Updated Review of Lysophosphatidylcholine Metabolism in Human Diseases / S.-H. Law [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2019. – Vol. 20, n. 5. – P. 1149.
5. Shadyro O.I., Yurkova I.L., Kisel M.A. Radiation-induced peroxidation and fragmentation of lipids in a model membrane // International journal of radiation biology. – 2002. – Vol. 78, n. 3. – P. 211-217.
6. Khrutskiy V. Undiscovered potential of 2-oxopropyl palmitate as a product of free radical fragmentation in the functioning of biosystems / O. Shadyro, I. Edimecheva and V. Khrutskiy // VII International Conference «Chemistry, Structure and Function of Biomolecules», Minsk, Republic of Belarus, on November 23-25, 2021. / Institute of Bioorganic Chemistry NASB, Minsk; organizing/scientific committee: Sergey A. Usanov [et al.] / – Minsk, 2021. – P. 59.
7. Пикаев, А.К. Дозиметрия в радиационной химии [Текст] / А.К. Пикаев; под ред. И.Д. Казариновой. // АН СССР. Ин-т физ. химии. – Москва: Наука, 1975. – 312 с.
8. Fricke, H. Chemical dosimetry / H. Fricke, E.J. Hart // Radiation Dosimetry / H. Fricke, E.J. Hart; edited by F.H. Attix, W.C. Roesch. – 2nd edition. – New York: Academic press, 1966. – P. 167–177.