

ИССЛЕДОВАНИЕ ПАРАМАГНИТНЫХ СВОЙСТВ СУММАРНЫХ ЛИПИДОВ МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ

Ю.А. Усс¹, Б.Н. Крашенинников², В.Т. Минлигарев³

¹ Филиал Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова в г. Севастополе, РФ, г. Севастополь, ул. Героев Севастополя, 7

E-mail: ussyuri@gmail.com

² Институт природно-технических систем, РФ, г. Севастополь, ул. Ленина, 28

E-mail: Bnk58@mail.ru

³ Институт прикладной геофизики им. акад. Е.К. Фёдорова,

РФ, г. Москва, ул. Ростокинская, 9

E-mail: metrologo@mail.ru

В статье представлены результаты исследования обнаруженных ранее парамагнитных центров в суммарных липидных экстрактах морских гидробионтов. На основе анализа спектров ЭПР (электронный парамагнитный резонанс) была описана вероятная модель редокс-фрагмента природного стабильного радикала. Отработан метод экстракции суммарных липидов для разработки оптимальной схемы выделения активного вещества с сохранением его антиокислительной активности для изучения молекулярной структуры и функциональной роли в клеточных структурах. Вероятная модель редокс-фрагмента природного стабильного свободного радикала представляет собой гетероцикл с двумя близко расположенными атомами азота (например, как в пиримидине), которые связаны резонансной проводимостью.

Ключевые слова: одноэлектронный перенос, свободные радикалы, перекисное окисление липидов, липиды морских гидробионтов, ЭПР-спектроскопия, стабильный свободный радикал.

Поступила в редакцию: 11.09.2018.

Введение. Жизнедеятельность клеток живых организмов базируется на окислительно-восстановительных реакциях, которые регулируются различными молекулярными структурами, выполняющими роль либо медиаторов, переносчиков электрона от донора к акцептору, либо ингибиторов цепных свободнорадикальных процессов, приводящих к появлению относительно стабильных свободных радикалов [1].

Свободнорадикальные процессы относятся к реакциям одноэлектронного переноса, которые широко распространены в большинстве фотохимических, электрохимических и биохимических процессах превращения органических молекул [2, 3].

Свободные радикалы – атомы или группы химически связанных атомов, обладающие свободными валентностями, т.е. неспаренными (нескомпенсированными) электронами на внешней (ва-

лентной) орбитали. Наличие неспаренных электронов определяет высокую химическую реакционную способность и электронный спиновый магнетизм свободных радикалов [2, 3].

Образование свободных радикалов в живых организмах происходит в результате реакций одноэлектронного окисления или восстановления молекул соответствующими донорами или акцепторами электрона, например, кислородом или металлами переменной валентности.

Природные свободные радикалы, образующиеся в живых организмах, подразделяются на первичные, вторичные и третичные (радикалы антиоксидантов) [4]. Они играют важную роль в регуляции метаболизма клеток.

Одним из механизмов регуляции внутриклеточного метаболизма является перекисное окисление липидов (ПОЛ) [5]. При активизации этого процесса

происходит образование избыточного количества свободных радикалов (оксидативный стресс), что нарушает функциональное состояние клеточных мембран и реологические свойства протоплазмы [6]. Ведущую роль в запуске перекисного окисления липидов играют первичные свободные радикалы (кислород и его активированные формы). При перекисном окислении липидов окислительным превращениям подвергаются полиненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов, нейтральные жиры и холестерин, которые являются основными компонентами клеточных мембран. Поэтому, при стимуляции перекисного окисления липидов, в мембранах изменяется количественный и качественный состав липидов, а также меняются их микровязкость и электростатический заряд. При более глубоком окислении фосфолипидов нарушается структура липидного бислоя и появляются дефектные зоны, а это нарушает функциональную активность и барьерные функции мембраны клеток [5, 7, 8].

Процессы перекисного окисления липидов находятся под контролем ферментативных и не ферментативных проокислительных и антиокислительных систем [4, 7, 8].

Исследование функциональной активности и структуры свободных радикалов простых и сложных биологически важных молекул было одним из первых направлений применения метода ЭПР (электронного парамагнитного резонанса) в биологических исследованиях [9–11]. Это связано с наличием двух основных видов парамагнитных центров в природных структурах – природных свободных радикалов и ионов металлов переменной валентности. Изучение свободных радикалов в биологических системах затруднено из-за их низкой концентрации при генерации в процессе жизнедеятельности клеток. Концентрацию свободных радикалов можно увеличить только искусственно, затормозив их гибель или повысив скорость их образования. Образование свободных радика-

лов в модельных экспериментах обычно наблюдается в изучаемых биологических структурах при очень низкой температуре (при температуре жидкого азота) в ходе облучения УФ или ионизирующей радиацией [11]. Чувствительность метода ЭПР составляет 10^{-11} Моль в образце по стабильному радикалу дифенилпикрилгидразилу (ДФПГ) или 10^{11} – 10^{16} магнитных центров в единице объема в зависимости от типа радиоспектрометра.

Цель работы – исследовать методами ЭПР-спектроскопии обнаруженные ранее парамагнитные свойства липидных экстрактов из гонад черноморского моллюска *Mytilus galloprovincialis* L. и печени черноморского катрана *Squalus achantias* для проверки процедуры экстрагирования [12]. Это поможет в дальнейших исследованиях выделить активное вещество и изучить его молекулярную структуру и функциональную активность.

Материалы и методы. Для экстракции липидов из тканей организмов чаще всего используют метод Фолча и его модификации [13]. Однако этот метод имеет ряд недостатков, которые делают невозможным его применение для исследования процессов ПОЛ и активности антиокислительных систем в тканях организмов. К ним относятся:

- экстракция большого количества не липидных примесей;
- содержание в хлороформе высокоактивных продуктов его распада, которые взаимодействуют с функциональными группами липидов;
- высокая оптическая плотность хлороформа в ультрафиолетовой области [13].

В связи с этим липиды из тканей *Mytilus galloprovincialis* L. (гонады) и *Squalus achantias* (печень) экстрагировали в системе гексан:изопропанол в соотношении 2:1 [14]. Эта система растворителей менее токсична, обладает низким поглощением в ультрафиолетовой области, разделение фаз происходит быстро. Гексановый экстракт не содержит апо-

протеинов, чист, прозрачен и выпаривается относительно легко.

Ткани исследуемых морских гидробионтов перед экстракцией замораживали в морозильной камере при -20°C в течение 2 часов. После размораживания ткани гомогенизировались в фарфоровой ступке до сметанообразного состояния и заливали смесью очищенных гексана и изопропанола (2:1). Соотношение ткань/экстракционная смесь (г/мл) 1:10. Такое соотношение ткань-экстрагент является оптимальным, и полнота экстракции составляет 97-98% [14]. Экстракцию проводили в стеклянных центрифужных пробирках объемом 100 мл. Осветление экстракта и отмывку дважды дистиллированной водой в соотношении 1:2 (липидный экстракт:вода) проводили центрифугированием при 3000 об/мин при температуре 4°C . Отмытый экстракт липидов в гексане упаривали на роторном испарителе в вакууме при температуре 30°C и перерастворяли в гексане.

Исследование парамагнитных свойств липидных экстрактов проводили на радиоспектрометре SE/X-2543 (Польша). Липиды, растворенные в гексане, весом 10 мг помещали в нерабочую часть оптической ячейки из кварцевого стекла и упаривали досуха в токе азота. В ячейку добавляли толуол в объеме 2,5 мл для растворения липидов и от-

дельно в рабочую часть 1 мг диоксида свинца. Пробу быстро замораживали жидким азотом, откачивали вакуумным насосом из ячейки воздух и запаивали ее. Затем замороженные в толуоле липиды размораживали в термостате при температуре 22°C в течение 60 минут. Перед проведением анализа раствор толуола с липидами смешивали с диоксидом свинца в рабочей части оптической ячейки. Измерение проводили при комнатной температуре 24°C в анаэробных условиях.

Результаты и обсуждение. При окислении липидных экстрактов *Mytilus galloprovincialis* L. (гонады) диоксидом свинца в толуоле был зафиксирован хорошо разрешенный спектр ЭПР (рис. 1).

Анализ спектра позволяет сделать заключение, что его сверхтонкая структура принадлежит свободному радикалу, который содержит как минимум два эквивалентных атома азота с константой расщепления 0,51 мТл. Остальная сверхтонкая структура обусловлена несколькими группами неэквивалентных протонов.

При окислении липидных экстрактов печени *Squalus achantias* в аналогичных условиях был зафиксирован практически идентичный спектр ЭПР (рис. 2).

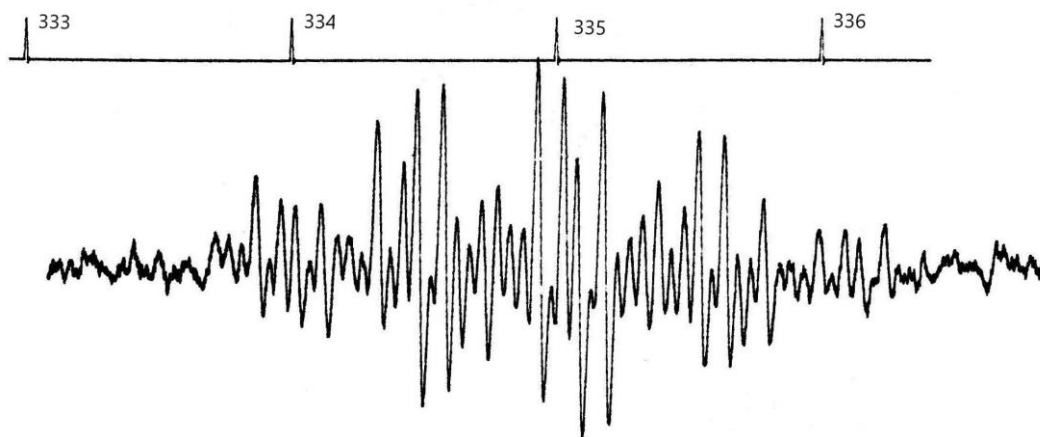


Рис. 1. Спектр ЭПР, полученный окислением липидного экстракта гонад *Mytilus galloprovincialis* L. диоксидом свинца в толуоле при 24°C , напряженность магнитного поля, мТл

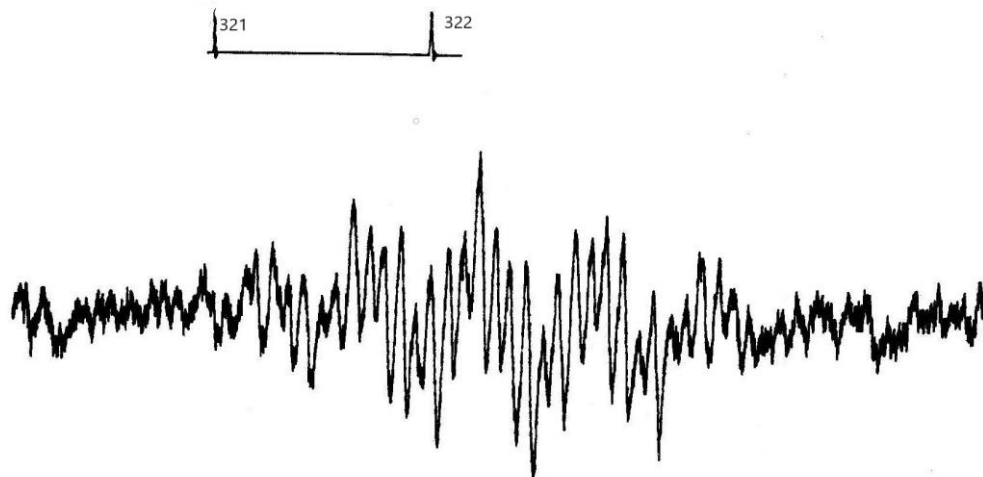


Рис. 2. Спектр ЭПР, полученный окислением липидного экстракта печени *Squalus achantias* диоксидом свинца в толуоле при 24°C, напряженность магнитного поля, мТл

В целом полная интерпретация спектра затруднительна, так как спектры получены на суммарных липидных экстрактах, где присутствуют все известные группы полярных и неполярных липидов в разных соотношениях.

Основной особенностью полученных сверхтонких спектров ЭПР является факт их регистрации уже на протяжении 48 часов, а не трех часов как было зарегистрировано ранее [11]. Увеличение времени регистрации спектра ЭПР, видимо, обусловлено другим методом экстракции суммарных липидов.

Это может быть интерпретировано как присутствие в липидных экстрактах природного антиоксиданта, который при окислении диоксидом свинца давал стабильный свободный радикал. Идентичность полученных сверхтонких спектров ЭПР окисленных суммарных липидных экстрактов *Mytilus galloprovincialis* L. (гонады) и *Squalus achantias* (печень) говорит о наличии в них близких по строению природных антиоксидантов, так как они содержат идентичные редокс-фрагменты. Это не может быть простым совпадением.

Заключение. Вероятная модель редокс-фрагмента природного стабильного свободного радикала представляет собой гетероцикл с двумя близко расположенными атомами азота (например,

как в пиримидине), которые связаны резонансной проводимостью. Описанный метод экстракции суммарных липидов может послужить основой для разработки оптимальной схемы выделения активного вещества с сохранением его антиокислительной активности для изучения молекулярной структуры и функциональной роли в клеточных структурах.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и г. Севастополя в рамках научного проекта № 18-41-920006 «Исследование слабых геофизических полей методами радиооптической спектроскопии и магнитометрии с использованием бионического полупроводникового сенсора».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Свободные радикалы в биологии* / под ред. У. Прайора. М.: Мир, 1979. Т. 1, 2. 318 с., 328 с.
2. *Охлобыстин О.Ю.* Перенос электрона в органических реакциях. Ростов на/Д.: Изд-во Рост. ун-та, 1974. 118 с.
3. *Чухахин О.Н.* Одноэлектронный перенос в органической химии // Соросовский образовательный журнал. 2001. Т. 7, № 10. С. 33–37.
4. *Владимиров Ю.А.* Свободные радикалы в биологических системах // Со-

росовский образовательный журнал. 2000. Т. 6, № 12. С. 13–19.

5. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252 с.

6. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. Свободные радикалы в живых системах // Итоги науки и техники. Серия биофизика. М.: ВИНТИ, 1992. Т. 52. 250 с.

7. Владимиров Ю.А. Нарушение барьерных свойств внутренней и наружной мембран митохондрий, некроз и апоптоз // Биологические мембраны. 2002. Т. 19, № 5. С. 355–377.

8. Vladimirov Y.A., Proskurnina E.V. Free radicals and cell chemiluminescence // Biochemistry (Moscow). 2009. Vol. 74. No. 13. P. 1545–1566.

9. Блюменфельд Л.А., Воеводский В.В., Семенов А.Г. Применение электронного парамагнитного резонанса в химии. Новосибирск: Изд-во Сиб. отд-ния АН СССР, 1962. 240 с.

10. Блюменфельд Л.А., Тихонов А.Н. Электронный парамагнитный резонанс // Соросовский образовательный журнал. 1997. № 9. С. 91–99.

11. *Современные методы биофизических исследований: практикум по биофизике: учеб. пособие для биол. спец. вузов* / А.А. Бульчев, В.Н. Верхотуров, Б.А. Гуляев [и др.] / под ред. А.Б. Рубина. М.: Высш. шк. 1988. 359 с.

12. *Стабильный радикал из липидных экстрактов морских организмов* / М.В. Нехорошев, Ю.А. Усс, Е.С. Климов [и др.] // Докл. АН УССР. Сер. Б. Геол., хим. и биол. науки, 1989. № 10. С. 78–79.

13. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues // J. biol. Chem., 1957. Vol. 226. P. 497–509.

14. *Экстракция липидов для комплексной количественной оценки свободнорадикального окисления* / В.П. Верболович, Ю.К. Подгорный, Л.Л. Теплова [и др.] // Лабораторное дело. 1989. № 12. С. 57–59.

STUDY OF THE PARAMAGNETIC PROPERTIES OF MARINE ORGANISMS TOTAL LIPIDS

Yu.A. Uss¹, B.N. Krasheninnikov², V.T. Minligareev³

¹Branch of Moscow State University named after M.V. Lomonosov in the city of Sevastopol, Russian Federation, Sevastopol, Heroes of Sevastopol St., 7

²Institute of Natural and technical Systems, Russian Federation, Sevastopol, Lenin St., 28

³Institute of Applied Geophysics named after Academician E.K. Fedorov, Russian Federation, Moscow, Rostokinskaya St., 9

The article presents the results of the investigation of previously discovered paramagnetic centers in total lipid extracts of marine hydrobionts. Based on the analysis of EPR spectra (electron paramagnetic resonance), a probable model of the redox fragment of a natural stable radical was described. An extracting total lipids method has been worked out to develop an optimal scheme for the isolation of the active substance with preserving its antioxidant activity for studying the molecular structure and functional role in cellular structures. The probable model of the natural stable free radical redox-fragment is a heterocycle with two closely spaced nitrogen atoms (for example, as in pyrimidine), which are connected by resonance conductivity.

Keywords: one-electron transport, free radicals, lipid peroxidation, lipids of marine hydrobionts, EPR spectroscopy, stable free radical.