

УДК 541.15

## **РАДИАЦИОННО-ХИМИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ 2,6-ДИ-ТРЕТБУТИЛ-4-МЕТИЛФЕНОЛА В ВОДНЫХ СУСПЕНЗИЯХ ЛИПОСОМ**

**Е.А. Антонова, Д.В. Парамонов**

*(лаборатория радиационной химии)*

**В работе приведены экспериментальные результаты по радиационно-химическому разложению ионола и выходу продуктов его деструкции в липидной мембране лецитиновых липосом в зависимости от качественного и количественного состава радикалов, образующихся в водной фазе.**

Известно, что воздействие ионизирующего излучения на живые системы связано, главным образом, с косвенным действием излучения и осуществляется промежуточными продуктами радиолиза воды [1], содержание которой в биологических системах составляет 70–80%. Большой экспериментальный материал дает основание предполагать, что мембраны клетки являются важной мишенью действия излучения, а их поражение существенным образом сказывается на выживаемости клетки [2]. Однако конкретная роль тех или иных химически активных продуктов радиолиза воды (ионов, возбужденных молекул, активных радикалов) в механизме разрушения клеточных мембран остается неясной. Поскольку структура, хими-

ческий состав, толщина, проницаемость клеточных мембран для клеток разной природы и дифференцировки различны, для изучения реальных клеточных систем необходимо предварительно провести исследования на моделирующих их объектах.

С целью моделирования воздействия ионизирующего излучения на биологические мембраны и защиты последних от активных продуктов радиолиза воды были проведены исследования модельных систем, представляющих собой водные суспензии лецитиновых липосом. Интерес к липосомам с включенным в липидный бислой неселективным акцептором радикалов определяется еще и тем, что липосомы являются перспективными формами дос-

тавки в ткани и органы лекарственных препаратов, которые в свою очередь требуют предварительной стерилизующей обработки (а один из эффективных способов стерилизации – радиационный). В литературе обсуждается вопрос в основном о радиационной химии липидов, составляющих мембрану липосомы [3, 4], а по радиационному разрушению включенных в липидный бислой акцепторов, которые могут имитировать действие естественных антиоксидантов, публикаций значительно меньше [5]. Липосомальные частицы, приготовленные из фосфолипида – структурного элемента клеточной мембраны, содержали в липидном бислое нерастворимый в воде антиоксидант фенольного типа – 2,4-ди-*трет*-бутил-6-метилфенол (ионол), широко применяемый в промышленности, медицине и исследованиях.

### Методика эксперимента

Для приготовления водных суспензий липосом к известной навеске сухого яичного лецитина (L- $\alpha$ -фосфатидилхолина), содержащего ионол, добавляли дистиллированную воду и полученную гетерогенную систему озвучивали с помощью ультразвукового дезинтегратора «УЗДН-2Т» с частотой  $22 \pm 1.65$  кГц в кавитационном режиме в стеклянной ячейке на воздухе. Поглощенная мощность менялась от 1.8 до 2.4 Вт/см<sup>3</sup>. Перед озвучиванием и через каждую минуту озвучивания раствор охлаждали до 5–8°C. Суммарное время озвучивания составляло 12 мин.

Таким образом были приготовлены суспензии липосом (4.8 г лецитина в 1 л суспензии) с размером частиц  $R = 5020$  нм и содержанием  $2.4 \cdot 10^{-4}$  моль ионола в 1 г лецитина. Размер частиц контролировали по спектру мутности [6].

Суспензии липосом облучали на кобальтовой установке «РЦ-100М» с мощностью дозы, равной 110 Гр/мин (диапазон поглощенных доз варьировался в пределах до 6–7 кГр), в барботажном (кислородом воздуха или закистью азота) или в дезаэрированном режимах. Дезаэрирование проводили методом барботирования через объем суспензии (15–20 мл) азота в течение 20 мин.

Анализ антиоксиданта и продуктов его превращения проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ): хроматограф «Миллихром», колонка  $l = 64$ ,  $d = 2$  мм, заполненная силосорбом  $C_{18}$ , элюент – смесь спирта и воды (87 и 13 об.%). Наличие спектрофотометрического детектора и специального устройства позволяло записать ультрафиолетовый спектр вещества в момент прохождения его через кювету. Степень превращения ионола колебалась в пределах  $60 \pm 20$  % в зависимости от поглощенной суспензией дозы.

### Экспериментальные результаты и обсуждение

Яичный лецитин – это амфифильное соединение, содержащее полярную гидрофильную и неполярную гидрофобную группировки. Гидрофильная группа, являясь цвиттерионом, имеет положительный заряд на атоме азота холинового остатка и отрицательный на кислороде фосфорной кислоты, образующей двузамещенный эфир. Неполярная гидрофобная часть представляет собой остатки жирных кислот ( $C_{16}$ ,  $C_{18}$ ) различной насыщенности. Молекулы лецитина в воде образуют гетерогенные структуры, выделяясь в отдельную фазу. При обработке данной системы ультразвуком происходит формирование концентрических бислоиных везикул, в которых гидрофильные группы обращены в водную фазу, а остатки жирных кислот образуют самостоятельную гидрофобную область. Практически нерастворимый в воде ионол (его концентрация в насыщенном водном растворе при комнатной температуре, определенная с помощью ВЭЖХ, составляет  $\sim 2 \cdot 10^{-5}$  моль/л) находится в гидрофобной части липосомы.

При облучении водных суспензий липосом, содержащих в 1 л суспензии 4.8 г лецитина и 0.26 г ионола, 99.5%  $\gamma$ -излучения поглощается водной фазой и протекающие радиационно-химические процессы в липосоме связаны, главным образом, с косвенным действием ионизирующего излучения. Можно полагать, что наибольшее разрушение липосомы будут вызывать радикалы, образующиеся при радиоллизе воды ( $H^{\cdot}$ ,  $OH^{\cdot}$ ,  $HO_2^{\cdot}/O_2^{\cdot-}$ ), и в меньшей степени –  $e_{aq}^{-}$ . Реакционная способность сольватированных электронов относительно ионола мала [7], но с лецитином они могут реагировать с константой скорости порядка  $10^7 - 10^8$  л/моль·с. Так, холин, являющийся со-

Т а б л и ц а 1

Радиационно-химическое разложение ионола и выход его продуктов

Номер системы	Качественный состав радикалов в дисперсной среде	Радиационно-химический расход ионола, молек/100 эВ	Радиационно-химический выход радикалов в водной фазе [9], частиц/100 эВ	$G_{пр}$ , молек/100 эВ
1	$OH^{\cdot}$	$0.7 \pm 0.1$	6–6.5	–
2	$HO_2^{\cdot}/O_2^{\cdot-}$	$0.9 \pm 0.2$	6–6.5	0.4 0.1
3	$OH^{\cdot}$ , $HO_2^{\cdot}$	$1.3 \pm 0.3$	3 и 3.5	0.5 0.1
4	$OH^{\cdot}$ , $H^{\cdot}$ и $e_{aq}^{-}$	$0.6 \pm 0.1$	3, 0.5 и 3	–

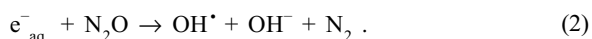
ставной частью молекулы лецитина, реагирует с  $e_{aq}^-$  с константой скорости  $8 \cdot 10^7$  л/моль·с [8].

Расход акцептора радикалов – ионола в процессе облучения свидетельствует о воздействии активных частиц радиолитиза воды на гидрофобную и гидрофильную части липосомы и на сам ионол.

В работе были исследованы 4 дисперсные системы, в которых необходимый качественный и количественный состав радикальных частиц в дисперсной среде достигался варьированием насыщающего газа (таблица).

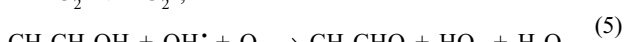
Во всех системах наблюдали уменьшение концентрации ионола во время облучения. Из зависимости изменения концентрации ионола от поглощенной дозы был определен радиационно-химический расход ионола путем экстраполяции к нулевой дозе. Зависимость расхода ионола от поглощенной системой дозы была линейной в пределах ошибки эксперимента.

Первая дисперсная система (система 1) была приготовлена путем насыщения водного раствора липосом  $N_2O$ . При воздействии ионизирующего излучения в дисперсионной среде протекают процессы с образованием следующих основных радиолитических частиц:



Таким образом, радикал  $OH^\cdot$  в этой системе является единственной радикальной частицей, реагирующей с липосомой. Влиянием радикала  $H^\cdot$  в этой системе в первом приближении можно пренебречь, так как его выход составляет примерно 10% от выхода  $OH^\cdot$ .

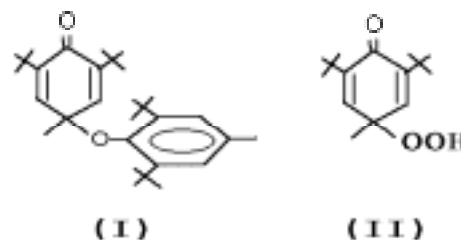
С целью изучения взаимодействия радикала  $HO_2^\cdot/O_2^-$  с липосомами и с ионолом, включенным в липидный бислои, в воду добавляли 0.2 моль/л этанола и аэрировали суспензию во время облучения (система 2). В водно-этанольных суспензиях протекают следующие радиационно-химические процессы:



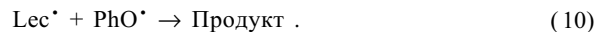
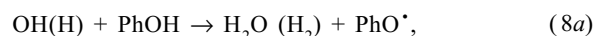
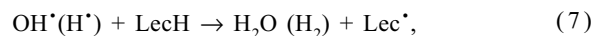
В аэрированных водных суспензиях растворенный кислород ( $2.7 \cdot 10^{-4}$  моль/л), акцептируя все радикалы  $H^\cdot$  и  $e_{aq}^-$ , трансформирует их в  $HO_2^\cdot/O_2^-$  [9], которые одновременно с  $OH^\cdot$  воздействуют на липосому (система 3).

Продукты превращения ионола были обнаружены во второй и третьей дисперсных системах. Их идентификацию проводили по временам удерживания и по УФ-спек-

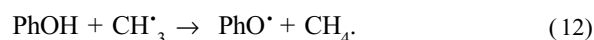
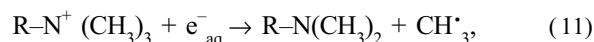
трам, снятым на пике выхода вещества в процессе хроматографического разделения. УФ-спектр поглощения продукта превращения ионола в водных суспензиях, насыщенных кислородом, оказался идентичен спектру поглощения димера, образованного рекомбинацией феноксильного и циклогексадиенильного радикалов (I) ( $\lambda_{max1,2} - 230; 282$  нм [10]), а в водно-этанольных суспензиях – спектру продукта (II) ( $\lambda_{max} - 234$  нм [11]).



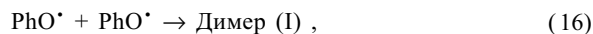
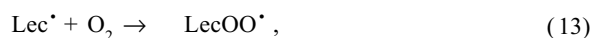
Радиационно-химический механизм разрушения ионола и образования продуктов его превращения схематично можно представить следующим образом. В суспензиях, насыщенных  $N_2O$ , и в дезаэрированных системах расход ионола связан с протеканием реакций



Вопрос о том, может ли ионол разрушаться непосредственно  $OH^\cdot$ -радикалами, остается невыясненным, так как не совсем ясно, как располагаются молекулы ионола в липидном бислое и как их количество влияет на саму структуру бислоя. В дезаэрированных водных суспензиях основными радикальными частицами, разрушающими липосому, являются  $H^\cdot$  и  $OH^\cdot$ . Однако, как видно из таблицы (система 4), при выходе радикальных частиц 3.5 радикалов/100 эВ радиационно-химический расход ионола практически тот же, что и в системе 1, хотя выход радикалов  $H^\cdot$  и  $OH^\cdot$  в два раза меньше. Такой эффект можно объяснить взаимодействием  $e_{aq}^-$  с холиновой группой лецитина (11) с образованием метильного радикала [12], который в свою очередь по реакции (12) разрушает ионол ( $K = 4 \cdot 10^3$  л/моль·с) [13].



В суспензиях, содержащих только  $O_2$  или этанол и  $O_2$ , феноксильные радикалы могут гибнуть или в реакциях димеризации (16), или в реакциях, приводящих к образованию продукта (II) (17).



Продукты рекомбинации феноксильного радикала с  $\text{Lec}^{\bullet}$ - и  $\text{LecOO}^{\bullet}$ -радикалами в данных условиях анализа регистрировать невозможно, однако на основании литературных данных по радиационно-химическим превращениям ионола в углеводородных средах [14] их образование можно предположить. Анализируя экспериментальные результаты по зависимости радиационно-химического разложения ионола и выхода продуктов его превращения от качественного и количественного состава радиолитичес-

ких частиц водной фазы, можно заметить, что системы 1 и 4 кардинально отличаются от систем 2 и 3. Так, при воздействии  $\text{H}^{\bullet}$ - и  $\text{OH}^{\bullet}$ -радикалов предположительными продуктами могут быть соединения, являющиеся результатом рекомбинации феноксильного и лецитинового радикалов. Изменяя условия эксперимента таким образом, что в системе появляется радикал  $\text{HO}^{\bullet}_2/\text{O}^{\bullet}_2$ , мы изменяем и качественный состав продуктов превращения ионола. В данном случае происходит преимущественная рекомбинация феноксильных радикалов либо друг с другом, либо трансформация феноксильных радикалов в продукт (II).

Представляет интерес тот факт, что все феноксильные радикалы, образующиеся в системе 3, гибнут в основном в реакциях рекомбинации друг с другом. Выход димера (I) примерно в два раза ниже расхода ионола.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 95-03-09162).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khare S., Jayakumar A. et al. // Rad. Res. 1982. **90**. P. 233.
2. Коломийцева И.К. Радиационная биохимия мембранных липидов. Сер. Теоретическая и прикладная биофизика. М., 1989. С. 181.
3. Stark R.K. // Biochim. Biophys. Acta. 1991. **1071**. P. 103.
4. Erriu G., Ladu M., Meleddu G. // Biophys. J. 1981. **35**. P. 799.
5. Kale R.K., Sitasawad S.L. // Ind. J. Exper. Biol. 1991. **29**. P. 778.
6. Генкин М.В., Уланов Б.П. и др. // ЖФХ. 1987. **61**. С. 220.
7. Brede O., Hermann R., Mehnert R. // Radiat. Phys. Chem. 1986. **28**. P. 507.
8. Buxton G.V. // J. Phys. Chem. Ref. Data. 1988. **17**. P. 513.
9. Пикаев А.К. Современная радиационная химия. М., 1986. С. 203.
10. Mueller E., Ley K., Schlechte G. // Chem. Ber. 1957. **90**. P. 2660.
11. Антонова Е.А., Жиркова О.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1993. **34**. С. 213.
12. Егоров Г.Ф. Радиационная химия экстракционных систем. М., 1986. С. 208.
13. Антонова Е.А. // Химия высоких энергий. 1996. **30**. С. 58.
14. Антонова Е.А., Троцилова Т.Ф. // Вести Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1993. **34**. С. 157.

Поступила в редакцию 16.12.97