

МЕХАНИЗМ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФОСФОЛИПИДОВ

Шишкина Л.Н., Белецкая П.Д., Дубовик А.С., Машукова А.В., Швыдкий В.О.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

Ул. Косыгина, 4., г. Москва, 119334, РФ: e-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru

Поступила в редакцию 07.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0597

Аннотация. Изучено влияние двухвалентных ионов меди и железа на их способность образовывать комплексы с фосфолипидами и интенсивность процессов перекисного окисления липидов, воздействовать на спонтанную агрегацию природных липидов в водной среде и дзета-потенциал сформированных частиц в широком диапазоне концентрации ионов металлов. Математический анализ УФ-спектров водных растворов лецитина, ионов металлов и их смесей по методу Гаусса показал, что ионы меди и железа образуют комплексы с фосфолипидами и оказывают влияние на содержание продуктов окисления лецитина. При этом масштаб эффекта зависит от концентрации иона, его природы и степени окисляемости лецитина. Обнаружено отсутствие линейной зависимости величины дзета-потенциала частиц лецитина от концентрации ионов металлов в водной среде и существенные различия их способности влиять на размер сформированных лецитином агрегатов. Совокупность полученных данных позволяет заключить, что качество природной воды обусловлено как концентрацией ионов тяжелых металлов, так и их способностью оказывать влияние на параметры физико-химической системы регуляции перекисного окисления липидов присутствующих в воде биологических объектов.

Ключевые слова лецитин, двухвалентные ионы меди и железа, УФ-спектрометрия, метод Гаусса, мицеллообразование, дзета-потенциал.

Высокая диэлектрическая проницаемость воды обуславливает ее уникальные свойства как растворителя и создает условия для присутствия в природной воде огромного количества соединений, среди которых ионы тяжелых металлов и биологические объекты. Поэтому закономерно, что природная вода представляет собой сложную многокомпонентную систему [1]. Выраженная способность молекул воды к самоорганизации вследствие образования водородных связей является одним из основных факторов, обуславливающих воздействие различных биологически активных веществ даже в малых дозах на физико-химические свойства мембран присутствующих в ней биологических объектов [2,3].

В настоящее время не вызывает сомнения, что нормальное функционирование биологических систем зависит от протекания в них окислительных процессов, играющих важную роль как в оценке качества воды, так и в регуляции метаболизма в системах разной сложности [4,5]. Нормальное функционирование сложных биологических объектов обуславливает физико-химическая система регуляции процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [6,7]. Показано, что состояние параметров этой системы играет важную роль в экологическом мониторинге, а нарушения регуляции ПОЛ приводит к гибели клеток и обуславливает токсичность соединений при их поступлении в организм [8-10]. Поскольку фосфолипиды являются одними из основных компонентов биологических мембран, а среди компонентов природной воды, как правило, присутствуют двухвалентные ионы меди и железа, то возникает необходимость более детального анализа природы иона на физико-химические свойства фосфолипидов. Однотипность функционирования физико-химической системы регуляции ПОЛ на разных уровнях организации биообъектов [11] позволяет использовать различные модельные системы для изучения механизма воздействия компонентов водной среды на биообъекты. Ранее нами было показано, что водные растворы соевого лецитина могут быть использованы для первичной оценки качества природной воды и прогнозирования последствий влияния ее компонентов на организм [8-10].

Целью работы являлся сравнительный анализ влияния двухвалентных ионов меди и железа в широком диапазоне концентраций на способность образовывать комплексы с фосфолипидами и воздействовать на спонтанную агрегацию лецитина в водной среде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Соевый лецитин, представляющий собой смесь природных липидов, доля фосфолипидов (ФЛ) в составе которых не менее 40%, был использован как модель природных ФЛ. Высокая лабильность липидного компонента любых природных объектов обуславливает необходимость контролировать состав липидов конкретных образцов. Качественный состав липидов использованных в работе образцов лецитина определяли методом ТСХ, используя стеклянные пластинки размером 90×120 мм, силикагель типа Н (Sigma, США) и смесь хлороформ: метанол: ледяная уксусная кислота: дистиллированная вода в объемном соотношении 12,5: 7,5: 2: 1 в качестве мобильной фазы [12]. Хроматограммы проявляли в парах йода. После удаления пятен ФЛ с пластинки и сжигания их хлорной кислотой до неорганического фосфора (Р) количественный анализ состава ФЛ проводили спектрофотометрически по образованию фосфорномолибденового комплекса в присутствии аскорбиновой

кислоты при длине волны 815 нм (ПЭ 5400ВИ, Россия). Для каждой пробы анализировали 5 хроматографических дорожек. Подробности методики приведены в работе [10].

Помимо количественного соотношения фракций ФЛ оценивали также обобщенные показатели состава липидов: доля (%) ФЛ и отношение сумм более легкоокисляемых и более трудноокисляемых фракций ФЛ ($\Sigma\text{ЛЮФЛ}/\Sigma\text{ТОФЛ}$), характеризующее способность липидов к окислению [7]. Отношение $\Sigma\text{ЛЮФЛ}/\Sigma\text{ТОФЛ}$ вычисляли по формуле: $(\text{ФИ} + \text{ФС} + \text{ФЭ} + \text{КЛ} + \text{ФК})/(\text{ЛФХ} + \text{СЛ} + \text{ФХ})$, где ФИ – фосфатидилинозит, ФС – фосфатидилсерин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, КЛ – кардиолипин, ФК – фосфатидная кислота, ЛФХ – лизоформы ФЛ, СЛ – сфинголипиды, ФХ – фосфатидилхолин.

Концентрация ионов металлов в водных растворах опытных образцов варьировала от 10^{-6} до 10^{-4} М, использовали хлорид двухвалентной меди и соль Мора.

УФ-спектры водных растворов лецитина, ионов металлов и их смесей регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1700 PharmaSpec (Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн от 200 до 400 нм. Полученные УФ-спектры подвергали математической обработке по методу Гаусса в программе Excel solver при условии совпадения контура исходного спектра с расчетным после аппроксимации на уровне $10^{-3} - 10^{-5}$.

Размер и дзета-потенциал (ζ -потенциал) наночастиц лецитина в дистиллированной воде и в присутствии ионов металлов определяли методом динамического рассеяния света на приборе Malvern Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания) при температуре 25°C и угле рассеяния 173° . Источником света являлся гелий-неоновый лазер с длиной волны 633 нм. Исследуемый раствор объемом около 1 мл помещали в предварительно обеспыленную квадратную кювету толщиной 1 см. Концентрация лецитина составляла $4,3 \times 10^{-5}$ М. Сбор данных и первичную обработку осуществляли программой Zetasizer Software 6.20 (Malvern Instruments Ltd., Великобритания). Каждое измерение повторяли не менее 5 раз.

Экспериментальные данные обрабатывали стандартными статистическими методами, используя программный продукт MS Excel и пакет компьютерных программ KINS [13]. Данные представлены в виде средних арифметических значений с указанием их среднеквадратичных ошибок ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как и следовало ожидать, разные партии лецитина различались как значениями обобщенных показателей состава липидов, так и количественным соотношением фракций ФЛ. Так, доли ФЛ в составе общих липидов лецитина оказались равными $40,3 \pm 1,7\%$ ($n=7$) и $73,6 \pm 2,1\%$ ($n=7$), а способность липидов к окислению $0,0107 \pm 0,0011$ ($n=5$) и $0,0509 \pm 0,0005$ ($n=5$) для образцов 1 и 2 соответственно. Существенные различия выявлены и в количественном соотношении фракций ФЛ в образцах лецитина, что следует из данных таблицы 1.

Типичный УФ-спектр водного раствора лецитина и его гауссианы представлен на рисунке 1.

Таблица 1. Количественное соотношение фракций фосфолипидов (%P) образцов лецитина

Образец	ЛФХ	СЛ	ФХ	ФИ+ФС	ФЭ	КЛ+ФК
№1	$5,05 \pm 0,95$	$8,58 \pm 0,29$	$85,3 \pm 1,0$	$0,22 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,02$	$0,63 \pm 0,21$
№2	$0,92 \pm 0,23$	$7,65 \pm 0,70$	$86,60 \pm 0,37$	$1,13 \pm 0,45$	$2,60 \pm 0,45$	$1,11 \pm 0,15$

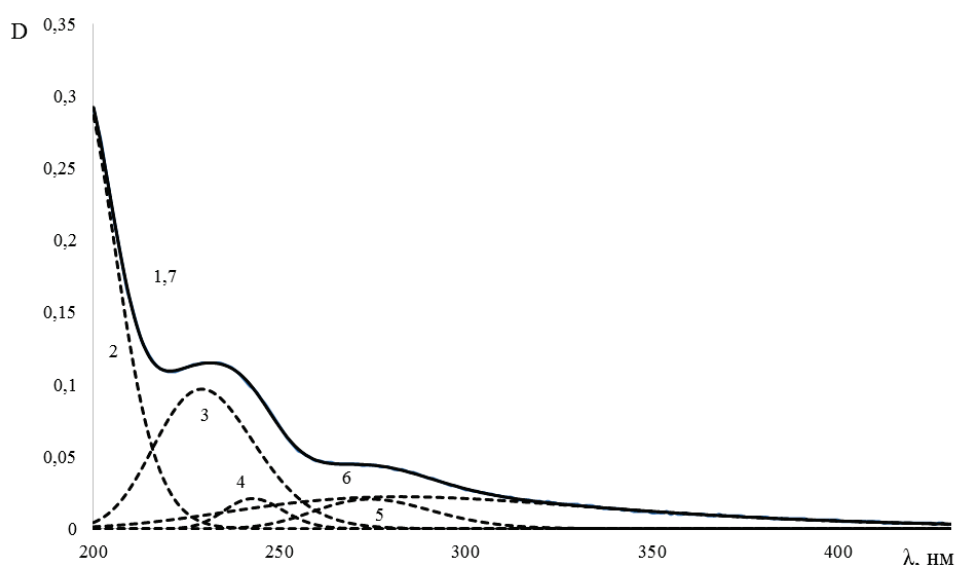


Рисунок 1. УФ-спектр лецитина и его гауссианы в водном растворе: 1,7 – исходный и расчетный спектры, 2 – 195,5 нм, 3 – 229,1 нм, 4 – 242,8 нм, 5 – 274,3 нм, 6 – 282,4 нм; [лецитин] = $4,3 \times 10^{-5}$ М

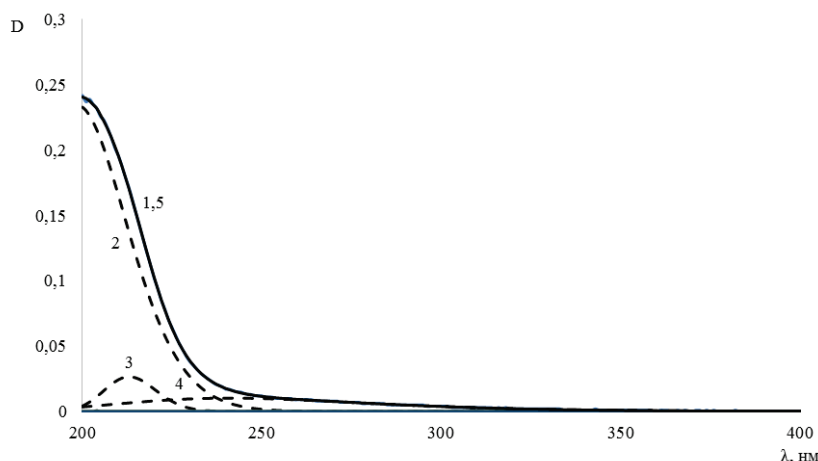


Рисунок 2. УФ-спектр растворов лецитина в присутствии ионов меди и их гауссианы: 1,5 – исходный и расчетный спектры, 2 – 198,5 нм, 3 – 213,0 нм, 4 – 241,1 нм; [лецитин] = $4,3 \times 10^{-5}$ М, $[\text{Cu}^{2+}] = 5,0 \times 10^{-5}$ М

Максимум полосы поглощения при длинах волн в области 195 нм характерен для сложных эфиров и соединений с несопряженными двойными связями. По величине оптической плотности (D) данной полосы обычно судят о содержании липидов в биологическом объекте. Полоса поглощения в области 225–230 нм обусловлена наличием соединений с сопряженными двойными связями, так называемых диеновых конъюгатов. Полосу поглощения в области 265–275 нм связывают преимущественно с наличием соединений с карбонильными группами (кетодиенов), поэтому по величине D данной полосы поглощения судят о степени окисленности липидов. Появление в УФ-спектрах использованных образцов лецитина полосы поглощения в области 235–240 нм, характеризующейся наиболее низкой величиной D, обусловлено присутствием в ФЛ образцов лецитина относительно высокой доли N-содержащих фракций ФЛ: СЛ, ФЭ, ФС (табл. 1).

Присутствие в растворе ионов железа и меди вызывает как сдвиги максимумов полос поглощения лецитина и изменение величин их оптической плотности, так и появление новых полос поглощения в УФ-спектрах смесей, что свидетельствует об образовании комплексов ионов металлов с фосфолипидами и их влиянием на окисление лецитина. Однако эффект зависит от природы иона (рис. 2, 3).

Как следует из данных, представленных на рисунке 2, в присутствии ионов меди в растворе при близких к эквимольным концентрациям с лецитином существенно уменьшается D полосы поглощения в области 240 нм, которая характерна для N-содержащих соединений, и обнаружена дополнительная полоса поглощения в области 213 нм, что свидетельствует о наличии в растворе свободных жирных кислот. При этом отсутствуют полосы поглощения диеновых конъюгатов и кетодиенов. Следовательно, ионы меди активно участвуют в процессах окисления лецитина и образуют комплекс с N-содержащими фракциями ФЛ лецитина.

В аналогичных условиях в присутствии ионов железа выявлены сдвиги максимумов полос поглощения лецитина, определенный рост оптической плотности полос поглощения диеновых конъюгатов и кетодиенов и отсутствие полосы поглощения N-содержащих компонентов ФЛ, появление дополнительных полос поглощения в более длинноволновой области, что связывают с наличием P-содержащих соединений ионов железа (рис. 3). Следовательно, ионы железа образуют комплексы и с N-, и с P-содержащими фракциями ФЛ и интенсифицируют окисление лецитина.

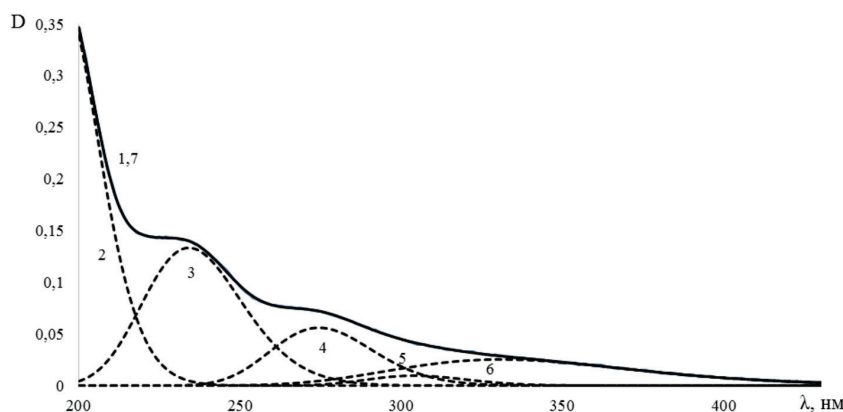


Рисунок 3. УФ-спектр растворов лецитина в присутствии ионов железа и их гауссианы: 1,7 – исходный и расчетный спектры, 2 – 194,7 нм; 3 – 232,2 нм; 4 – 275,2 нм; 5 – 304,0 нм, 6 – 330,9 нм; [лецитин] = $4,3 \times 10^{-5}$ М, $[\text{Fe}^{2+}] = 5,0 \times 10^{-5}$ М

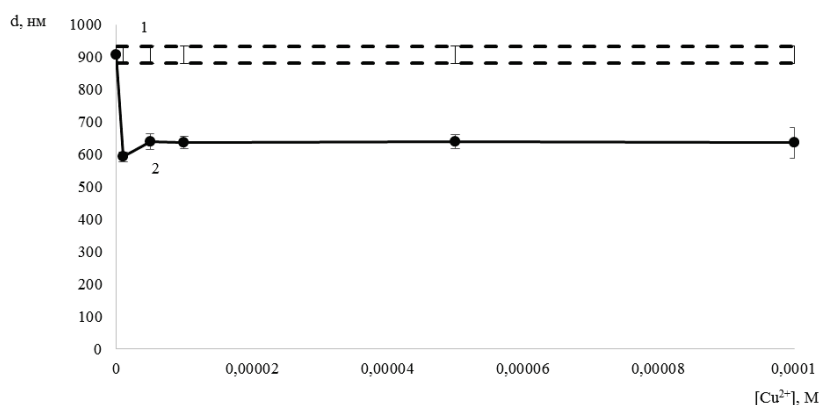


Рисунок 4. Зависимость среднего динамического диаметра основной фракции частиц лецитина от концентрации ионов Cu^{2+} в растворе. [лецитин] = $4,3 \times 10^{-5}$ М, Пунктирная линия указывает интервал точности анализа размера частиц основной фракции лецитина

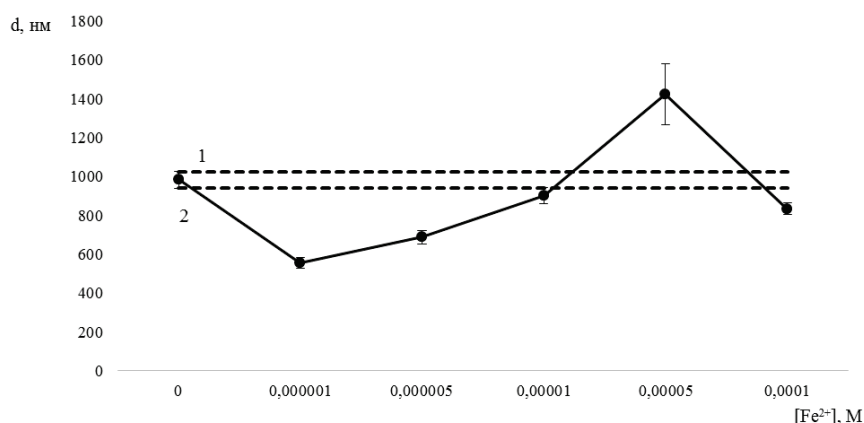


Рисунок 5. Зависимость среднего динамического диаметра основной фракции частиц лецитина от концентрации ионов Fe^{2+} в растворе. [лецитин] = $4,3 \times 10^{-5}$ М, Пунктирная линия указывает интервал точности анализа размера частиц основной фракции лецитина

Существенные различия выявлены и при исследовании способности ионов меди и железа влиять на мицеллообразование лецитина в водной среде и электрофоретические свойства образующихся агрегатов в зависимости от концентрации ионов. Однако нельзя исключать и влияние состава липидов лецитина, так как эксперименты с ионами железа были проведены на образце лецитина № 1, а с ионами меди на образце № 2, для которых выше уже отмечались достоверные различия в количественном соотношении фракций ФЛ и обобщенных показателей состава липидов: %ФЛ в составе общих липидов и способности липидов лецитина к окислению. Несмотря на то, что размер основной фракции частиц лецитина, доля которых составляет 85,3–90,7%, в зависимости от состава его липидов различался незначительно (985±40 нм и 905±25 нм для образцов №1 и №2 соответственно), более крупные агрегаты лецитина обладали достоверно менее отрицательным ξ -потенциалом: $-24,8 \pm 0,9$ мВ и $-32,9 \pm 1,8$ мВ соответственно. Влияние концентрации ионов Cu^{2+} и Fe^{2+} на мицеллообразование лецитина приведено на рисунках 4 и 5.

Сравнительный анализ представленных результатов свидетельствует о существенных различиях динамика влияния исследованных ионов металлов от их концентрации воздействовать на способность лецитина к мицеллообразованию. Это выявляется и при определении величин ξ -потенциала сформированных агрегатов лецитина (табл. 2).

Возможно, столь существенные различия Cu^{2+} и Fe^{2+} в зависимости от их концентрации оказывать воздействие на структурное состояние мембран и их электрофоретические свойства, образовывать комплексы с природными ФЛ и участвовать в регуляции окислительных процессов, выявленные уже на уровне модельных систем, обуславливают и различия их участия в регуляции клеточного метаболизма в организме [14,15].

Таблица 2. Влияние двухвалентных ионов меди и железа на величины ξ -потенциала частиц лецитина в дистиллированной воде

Ионы металлов	Концентрации ионов, М				
	10^{-6}	5×10^{-6}	10^{-5}	5×10^{-5}	10^{-4}
Cu^{2+}	$-32,6 \pm 0,8$	$-31,7 \pm 0,7$	$-30,8 \pm 0,4$	$-19,2 \pm 0,6$	$-16,8 \pm 0,5$
Fe^{2+}	$-35,0 \pm 0,8$	$-30,0 \pm 0,6$	$-30,7 \pm 0,7$	$-25,3 \pm 1,2$	$13,0 \pm 0,9$

Таким образом, совокупность полученных данных позволяет заключить, что качество природной воды обусловлено как концентрацией ионов тяжелых металлов, так и их способностью оказывать влияние на параметры физико-химической системы регуляции ПОЛ присутствующих в воде биологических объектов.

Список литературы / References:

1. Гуриков Ю.В., Бондаренко Н.Ф. Природная вода как окислительная среда. *Журнал физической химии*, 2001, т. 75, № 7, с. 1221-1224 [Gurikov YU.V., Bondarenko N.F. Natural water as an oxidizing system. *Russ. J. Phys. Chem. A*, 2001, vol. 75, no. 7, p. 1103-1006 (In Russ.)].
2. Коновалов А.И., Рыжкина И.С. Образование наноассоциатов - ключ к пониманию физико-химических и биологических свойств высокоразбавленных водных растворов. *Известия АН. Серия химическая*, 2014, № 1, с. 1-14 [Konovalov A.I., Ryzhkina I.S. Formation of nanoassociates as a key to understanding of physicochemical and biological properties of highly dilute aqueous solutions. *Russ Chem Bull*, 2014, vol. 63, pp. 1-14 (In Russ.)].
3. Пальмина Н.П., Мальцева Е.Л., Часовская Т.Е. Действие разбавленных растворов биологически активных веществ на клеточные мембраны. *Биофизика*, 2014, т. 59, № 4, с. 704-716 [Palmina N.P., Maltseva E.L., Chasovskaya T.E. Effect of dilute solutions of biologically active substances on cell membranes. *Biophysics*, 2014, vol. 59, pp. 577-587 (In Russ.)].
4. Vigo Pelfrey C. *Membrane Lipid Oxidation*. Ed. Boston: CRC Press, 1991, vol. III, 300 p.
5. Shvydkiy V.O., Shtamm E.V., Skurlatov Yu.I., Vichutinskaya E.V., Zaitseva N.I., Semenyak L.V. Intoxication of the Natural Aqueous Medium Resulting from Disbalan of Redox and Free Radical Intrabacin Processes. *Russ. J. Phys. Chem. B*, 2017, vol. 11, no. 4, pp. 643-651, doi: 10.1134/S1990793117040248.
6. Burlakova Ye.B., Pal'mina N.P., Mal'tseva Ye.L. A physicochemical system regulating lipid peroxidation in membrane during tumor growth. *Membrane Lipid Oxidation*, 1991, vol. III, pp. 209-237.
7. Шишкина Л.Н., Кушнирева Е.В., Смотряева М.А. Новые подходы к оценке биологических последствий воздействия радиации в малых дозах *Радиаци. биология. Радиоэкология*, 2004, т. 44, № 3, с. 289-295 [Shishkina L.N., Kushnireva Ye.V., Smotryaeva M.A. A new approach to assessment of biological consequences of exposure to low-dose radiation. *Radiat. Biologiya. Radioekologiya*, 2004, vol. 44, no. 3, pp. 189-295 (In Russ.)].
8. Шишкина Л.Н., Козлов М.В., Повх А.Ю., Швыдкий В.Ю. Роль перекисного окисления липидов в оценке последствий воздействия химических токсикантов на биообъекты. *Химическая физика*, 2021, т. 40, № 8, с. 57-63, doi: 10.1134/S19907931210500880 [Shishkina L.N., Kozlov M.V., Povkh A.Yu., Shvydkiy V.O. Role of lipid peroxidation in the assessment of the consequences of exposure to chemical toxicants on bio-objects. *Russ. J. Phys. Chemistry B*, 2021, vol. 15, no 5, pp. 57-63 (In Russ.)].
9. Shvydkiy V., Dolgov S., Dubovik A., Kozlov M., Povkh A., Shishkina L., Duca G. New Aspects for the Estimation of the State of the Natural Water. *Chemistry Journal of Moldova*, 2022, vol. 17, no. 2, pp. 35-42, doi: 10.19261/cjm.2022.973.
10. Шишкина Л.Н., Дубовик А.С., Козлов М.В., Повх А.Ю., Швыдкий В.О. Модельные системы для оценки воздействия компонентов водной среды на биологические объекты. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2022, т. 7, № 1, с. 160-165 [Shishkina L.N., Dubovik A.S., Kozlov M.V., Povkh A.Yu., Shvydkiy V.O. Model systems for the estimation of action of compobebts of the water medium on the biological objects. *Russian Journal of Biological Physics and Chemisrty*, 2022, vol. 7, no. 1, pp. 160-165 (In Russ.)].
11. Shishkina L.N., Klimovich M.A., Kozlov M.V. Similarity Functioning of the Physicochemical Regulatory System on the Membrane and Organ Levels. *Pharmaceutical and Medical Biotechnology. New Perspective*, N.Y.: Nova Science Publishers, 2013, pp. 151-157.
12. Финдлея Дж.Б.С., Эванза В.Х. *Биологические мембраны: методы*. М.: Мир, 1990, 423 с. [Findley J.B.C., Evanz W.H. *Biological membranes: methods*. Moscow, 1990, 423 p. (In Russ.)].
13. Брин Э.Ф., Травин С.О. Моделирование механизма химических реакций. *Химическая физика*, 1991, т. 10, № 6, с. 830-837 [Brin E.F., Travin S.O. Modeling of mechanisms of chemical reactions. *Khimicheskaya fizika*, 1991, vol. 10, no. 6, pp. 830-837 (In Russ.)].
14. Ohgami R.S., Campagna D.R., VcDonald A., Fleming M.D. The Steap proteins are metalloredutases. *Blood*, 2006, vol. 108, no 4, pp. 1388-1394.
15. Shawki A., Anthony S.R., Nose Y., Engevik M.A., Niespodzany E.J. Intestinal DMT1 is critical for iron absorption in the mouse but is not required for the absorption of copper and manganese. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physio*, 2015, vol. 309, pp. G635-G647, doi: 10.1152/ajpgi.00160.2015.

MECHANISM OF ACTION OF THE HEAVY METAL IONS ON THE PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF PHOSPHOLIPIDS

Shishkina L.N., Beletskaya P.D., Dubovik A.S., Mashukova A.V., Shvydkiy V.O.

Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences
Kosygin str., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru

Received 07.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0597

Abstract. Effect of the divalent copper and iron ions on their ability to form complexes with phospholipids and the lipid peroxidation processes intensity, to affect the self-aggregation of the natural lipids in the water medium and ζ -potential of formed particles are studied in the wide range of the metal ion concentrations. Mathematical analysis of UV-spectra of the water solutions of lecithin, metal ions and their mixtures by Gauss method is revealed that copper and iron ions form complexes with phospholipids and act on content of the oxidation products. Besides, the scale of effect depends on the ion concentration, its nature and the lipid oxidizability. The absence of the linear dependence of the ζ -potential value for the lecithin particles on the ion concentration in the water medium and the essential differences of their ability to act on size of formed by lecithin aggregates are obtained. The obtained data allow us to conclude that quality of the natural water is due to both concentrations of the heavy metal ions and their ability to act on the lipid peroxidation regulatory system parameters of the inherent in water bio-objects.

Key words: *lecithin, divalent copper and iron ions, UV-spectrometry, Gauss method, formation of micelles, ζ -potential.*