

УДК 577.352.3

## СПЕКТРЫ ВОЗБУЖДЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ СУММАРНЫХ ЛИПИДОВ С ПАРАМАГНИТНЫМИ СВОЙСТВАМИ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ

© 2020 г. Ю. А. Усс<sup>1,\*</sup>, Б. Н. Крашенинников<sup>2</sup>, В. Т. Минлигареев<sup>3</sup>

Представлено академиком РАН В.Н. Егоровым

Поступило 26.12.2019 г.

После доработки 03.03.2020 г.

Принято к публикации 10.03.2020 г.

Представлены результаты исследования спектров возбуждения флуоресценции суммарных липидных экстрактов морских гидробионтов. Ранее методом ЭПР–спектроскопии в этих экстрактах были зарегистрированы идентичные парамагнитные центры. Анализ спектров возбуждения флуоресценции суммарных липидных экстрактов *Mytilus galloprovincialis* L. (гонады) и *Squalus achantias* (печень) показал, что после окисления диоксидом свинца в гексане появляются идентичные флуоресцирующие продукты с двумя сходными максимумами: 306 и 321 нм.

**Ключевые слова:** липиды, морские гидробионты, флуоресценция, ЭПР–спектроскопия, стабильный свободный радикал, парамагнитные центры

**DOI:** 10.31857/S2686738920030208

При окислении диоксидом свинца в толуоле суммарных липидных экстрактов *Mytilus galloprovincialis* L. (гонады) и *Squalus achantias* (печень) методом ЭПР–спектроскопии были зарегистрированы при температуре +24°C стабильные свободные радикалы с идентичным редокс–фрагментом [1]. Анализ спектров электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) позволил сделать предположение о наличии в суммарных липидах морских гидробионтов природной молекулярной структуры, которая после реакции одноэлектронного переноса с неорганическим окислителем (диоксидом свинца) при комнатной температуре трансформировалась в стабильный свободный радикал. 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 [1]. Гетероциклические молеку-

лярные структуры в конденсированном состоянии могут обладать флуоресценцией [2].

Целью исследования было изучение спектров возбуждения флуоресценции не окисленных и окисленных диоксидом свинца в гексане суммарных липидных экстрактов *Mytilus galloprovincialis* L. (гонады) и *Squalus achantias* (печень), которые демонстрируют при окислении парамагнитные свойства.

Флуоресцентная спектроскопия широко используется для исследования флуоресценции липидов в качестве маркера перекисного окисления липидов (ПОЛ) *in vitro* и радикальных цепных реакций *in vivo* [2, 3]. Метод позволяет проанализировать механизмы и пути образования флуоресцирующих продуктов, изменения их структурных свойств и формы межмолекулярного взаимодействия [4, 5]. Флуоресцентный анализ во много раз превосходит чувствительность таких методов как спектрофотометрия, ЯМР спектроскопия и ЭПР спектроскопия, позволяя определять очень низкие концентрации исследуемых молекул [5].

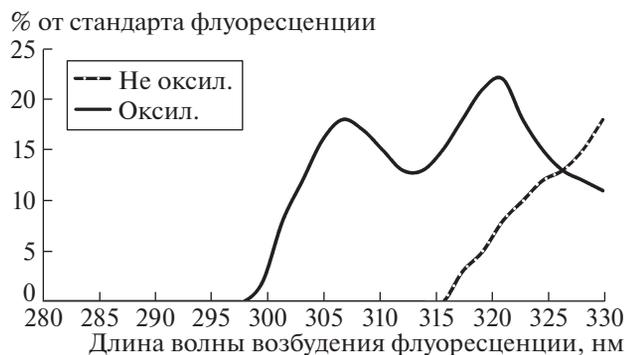
Флуоресцирующие продукты ПОЛ имеют максимум испускания в области 430–470 нм при двух максимумах возбуждения в диапазонах 260–280 и 350–390 нм, которые были идентифицированы как шиффовы основания (азометины) [6]. Флуоресцентные свойства проявляют также природные жирорастворимые витамин А (ретинол) и витамин Е. Ретинол имеет максимум флуорес-

<sup>1</sup> Филиал Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова в г. Севастополе, Севастополь, Россия

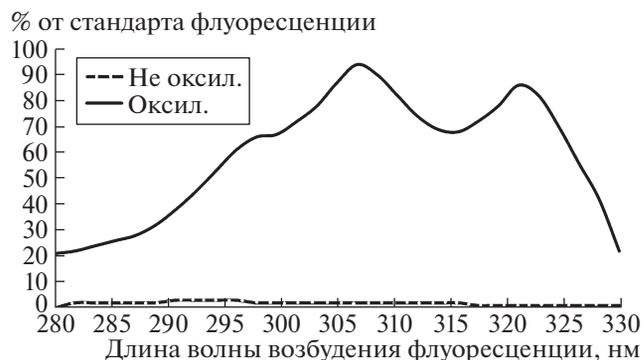
<sup>2</sup> ФГБУ Институт природно-технических систем, Севастополь, Россия

<sup>3</sup> ФГБУ Институт прикладной геофизики им. акад. Е.К. Фёдорова, Москва, Россия

\*e-mail: ussyuri@gmail.com



**Рис. 1.** Спектр возбуждения флуоресценции суммарных липидных экстрактов *Mytilus galloprovincialis* L. (гонады) до окисления (не оксил.) и после окисления (оксил.) диоксидом свинца в гексане.



**Рис. 2.** Спектр возбуждения флуоресценции суммарных липидных экстрактов *Squalus achantias* (печень) до окисления (не оксил.) и после окисления (оксил.) диоксидом свинца в гексане.

ценции в области 460–490 нм при максимуме возбуждения в диапазоне 335–360 нм [2]. Гексановые экстракты витамина Е имеют максимум флуоресценции в диапазоне 320–325 нм при возбуждении в диапазоне 292–295 нм [7].

Мешающим фактором при исследовании природных флуорофоров могут быть ароматические углеводороды. По литературным данным известно, что двустворчатые моллюски рода *Mytilus* и другие морские гидробионты могут накапливать в тканях значительные концентрации углеводородов [8]. Углеводороды имеют максимумы возбуждения и испускания флуоресценции соответственно 305–390 нм и 400–580 нм [8, 9].

Суммарные липидные экстракты из тканей *Mytilus galloprovincialis* L. (гонады) и *Squalus achantias* (печень) получили методом, описанным в работе [1].

Спектры возбуждения флуоресценции липидных экстрактов регистрировали на флуориметрической приставке к спектрофотометру Specord-M40. Чтобы исключить влияние известных природных флуорофоров на спектры возбуждения флуоресценции исследуемых липидных экстрактов, был выбран рабочий диапазон длин волн 280–330 нм и отсекающий светофильтр WK-38/GG 13/желтый – 363 нм. Стандарт флуоресценции GVD 37-79 /GG 17/: 238–526 нм. Длина оптического пути герметичной кварцевой кюветы – 10 мм. Значение флуоресценции определялось в процентах к стандарту флуоресценции в исследуемом диапазоне возбуждения.

Для анализа брали 10 мг липидов и растворяли в 6 мл спектрально чистого гексана. Для окисления липидных экстрактов добавляли в раствор 0.5 мг диоксида свинца (марки ЧДА) в виде кристаллического порошка. Смесь осторожно встряхивали и выдерживали в темноте при температуре +24°C в течение 60 мин до проведения спектрального анализа.

Влияния флуоресценции углеводов при анализе природных флуоресцирующих продуктов исключали пропуская исследуемых экстрактов липидов через колонку с активированной окисью алюминия. Липиды сорбировались на колонке, а углеводороды нет. Соответственно, спектры возбуждения флуоресценции липидов снимали до и после пропускания через колонку с окисью алюминия. Эта процедура позволила инструментально вычистить из общего значения флуоресценции флуорофоры углеводов.

Анализ спектров возбуждения флуоресценции суммарных липидных экстрактов *Mytilus galloprovincialis* L. (гонады) (рис. 1) и *Squalus achantias* (печень) (рис. 2) показал, что после окисления диоксидом свинца в гексане появляются идентичные флуоресцирующие продукты с двумя максимумами: 306 нм и 321 нм.

Исходя из интенсивности флуоресценции экстрактов, имеющих одну исходную концентрацию исследуемого вещества, можно предположить, что в липидах *Squalus achantias* (печень) концентрация флуоресцирующего продукта выше примерно в четыре раза, чем в липидах *Mytilus galloprovincialis* L. (гонады).

Идентичность редокс-фрагментов стабильных парамагнитных центров [1] и флуорофоров с одинаковыми максимумами возбуждения флуоресценции (306 и 321 нм) в окисленных суммарных липидных экстрактах *Mytilus galloprovincialis* L. (гонады) и *Squalus achantias* (печень) может говорить о наличии близких по строению природных молекулярных структур с антиокислительной активностью.

Примененный методический подход к изучению флуоресценции исследуемых природных липидов с парамагнитными свойствами, учитывая высокую чувствительность этого метода, позволит использовать его при разработке оптимальной схемы выделения активного вещества для

изучения его молекулярной структуры и функциональных свойств. Эти данные предполагается применить при создании бионического полупроводникового сенсора в качестве новой элементной базы для высокочувствительных магнитометров и гравиметров.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и г. Севастополя в рамках научного проекта № 18–47–920006 “Исследование слабых геофизических полей методами радиооптической спектроскопии и магнитометрии с использованием бионического полупроводникового сенсора”.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Усс Ю.А., Крашенинников Б.Н., Минлигареев В.Т. Исследование парамагнитных свойств суммарных липидов морских организмов // Системы контроля окружающей среды. 2018. № 14 (34). С. 138–142.
2. Dillard C.J., Tappel A.L. Fluorescent damage products of lipid peroxidation // *Methods in enzymology*. 1984. V. 105. P. 337–341.
3. Kagan Valerian K. Lipid peroxidation in biomembranes. Boca Raton (Fla.): CRC press; 2018.
4. Free Radicals in Biology. Pryor William A., ed. V. 1. New York: Academic Press; 1976.
5. Vekshin N.L. Photonics of Biopolymers. Berlin: Springer; 2002.
6. Ivica J., Wilhelm J. Lipophilic fluorescent products of free radicals // *Biomedical papers*. 2014. V. 158. № 3. P. 365–372.
7. Leonard S.W., Traber M.G. Methods for assessment of Vitamin E. In: Harrington D. editor. *Laboratory Assessment of Vitamin Status*. New York: Academic Press; 2019. P. 79–105.
8. Santana Rodríguez J.J., Padrón Sanz C. Fluorescence techniques for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine environment: an overview // *Analisis*. 2000. V. 28. № 8. P. 710–717.
9. Steffens J., Landulfo E., Courrol L.C., Guardani R. Application of Fluorescence to the Study of Crude Petroleum // *Journal of Fluorescence*. 2010. V. 21. № 3. P. 859–864.

## EXCITATION SPECTRA OF FLUORESCENCE OF SUMMARY LIPIDS WITH PARAMAGNETIC PROPERTIES ISOLATED FROM MARINE ORGANISMS

Yu. A. Uss<sup>a,#</sup>, B. N. Krasheninnikov<sup>b</sup>, and V. T. Minligareev<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Branch of Moscow State University named after M.V. Lomonosov in the city of Sevastopol, Sevastopol, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Natural and technical Systems, Sevastopol, Russian Federation

<sup>c</sup> Institute of Applied Geophysics named after Academician E.K. Fedorov, Moscow, Russian Federation

#e-mail: ussyuri@gmail.com

Presented by Academician of the RAS V.N. Egorov

Results of analysis of fluorescence excitation spectra of total lipid extracts of marine hydrobionts are presented. Previously, identical paramagnetic centers were recorded in these extracts by EPR spectroscopy. Analysis of fluorescence excitation spectra of total lipid extracts *Mytilus galloprovincialis* L. (gonads) and *Squalus achantias* (liver) showed that after oxidation with lead dioxide, identical fluorescent products appeared in hexane with two similar highs: 306 and 321 nm.

**Keywords:** lipids, marine hydrobionts, fluorescence, EPR spectroscopy, stable free radical, paramagnetic centers