

ВЛИЯНИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПОНЕНТОВ КРОВИ КРЫС

© 2019 г. А.А. Тимошин*, В.Л. Лакомкин*, Э.К. Рууге* **

*Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии МЗ РФ,
121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

**Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы, 1

E-mail: timoshin_a_a@mail.ru

Поступила в редакцию 21.01.2019 г.

После доработки 21.01.2019 г.

Принята к публикации 18.02.2019 г.

Проанализировано действие динитрозильных комплексов железа с лигандом глутатионом, вводимых внутривенно, на структурно-конформационные характеристики альбумина, как основного лиганда этих комплексов в плазме, и молекул липидной фазы мембран эритроцитов, составляющих микроокружение динитрозильных комплексов железа в эритроцитах. В ходе опытов проводился анализ спектров электронного парамагнитного резонанса таких спиновых зондов, как 5- и 16-доксилстеариновая кислота, в плазме и эритроцитарной массе, и их изменений в результате инъекции динитрозильных комплексов железа с глутатионом. Установлено, что введение в организм этих комплексов не приводит к изменениям молекулярного движения в гидрофобных областях альбумина в плазме крови и мембран эритроцитов, но при этом стимулируется встраивание в их мембрану заряженных спиновых зондов, что, вероятно, является следствием изменения заряда внешней поверхности этих клеток.

Ключевые слова: альбумин, динамика молекулярного движения, динитрозильные комплексы железа, мембрана эритроцитов, спиновый зонд, электронный парамагнитный резонанс.

DOI: 10.1134/S0006302919030098

Хорошо известно, что моноядерные и биядерные динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) являются одной из основных физиологических форм депонирования NO в организме животных и человека [1–8]. Эти природные соединения выполняют роль переносчиков и доноров NO, а также они способны оказывать антиоксидантное действие [8,9]. К настоящему времени многими авторами получены данные о том, что переход этих комплексов с одних тиолсодержащих лигандов на другие обеспечивают их перенос внутри организма и, в частности, переход через клеточные мембраны [1,10]. Методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) показано, что в организме животных моноядерные ДНКЖ присутствуют главным образом с высокомолекулярными белковыми лигандами [2].

Сокращения: ДНКЖ — динитрозильные комплексы железа, ЭПР — электронный парамагнитный резонанс, ДНКЖ-Глт — динитрозильные комплексы железа с лигандом глутатионом, 5-ДС — 5-доксилстеариновая кислота, 16-ДС — 16-доксилстеариновая кислота.

Учитывая то, что ДНКЖ являются природными высокоактивными комплексами, возникает вопрос о возможном взаимном влиянии этих соединений и их лигандов. Известно, что тип тиолсодержащих лигандов и их концентрация способны эффективно влиять на состояние ДНКЖ в крови и в других компартментах организма, и именно от них во многом зависит соотношение моноядерных и биядерных форм этих комплексов, их молекулярная подвижность, кинетика спонтанного распада [1,2] и т. д. Следует отметить, что если влияние лиганда на эти комплексы достаточно широко исследовано, то обратный эффект, т.е. действие ДНКЖ, как высокоактивных комплексов, на свои тиолсодержащие лиганды, а также на их микроокружение исследовано очень мало. При этом ДНКЖ, связанные с молекулой-лигандом по SH-группе, могут оказывать влияние на молекулярную динамику лиганда и другие характеристики, причем такое действие наиболее вероятно на лиганды, связанные с наибольшим количеством этих форм депонирования NO, а также на их микроокружение.

Хорошо известно, что сразу после внутривенного введения ДНКЖ с низкомолекулярными лигандами их наиболее высокая концентрация регистрируется в крови животного, причем в плазме концентрация ДНКЖ существенно выше, чем в эритроцитарной массе. При этом в плазме и эритроцитах ДНКЖ связываются с такими тиолсодержащими лигандами, как альбумин и гемоглобин соответственно [11].

Целью данной работы является анализ действия ДНКЖ с лигандом глутатионом (ДНКЖ-Глт), вводимого внутривенно, на структурно-конформационные характеристики альбумина как основного лиганда этих комплексов в плазме и молекул липидной фазы мембран эритроцитов, составляющих микроокружение ДНКЖ в эритроцитах.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Эксперименты проводили на крысах линии Wistar (самцы массой 350–450 г). В начале каждого опыта животным ставили венозный катетер на хвостовую вену. После этого с помощью катетера получали образец цельной крови животного объемом 1,5 мл. Далее в полученную пробу добавляли гепарин (10–20 МЕ/мл), далее ее центрифугировали и отделяли плазму от эритроцитарной массы. Эритроциты ресуспендировали и промывали в 1,0 мл физиологического раствора с последующим центрифугированием. Далее удаляли супернатант, осажденные эритроциты еще раз ресуспендировали в 100 мкл физиологического раствора. Полученные в результате образцы плазмы и эритроцитарной массы хранили при температуре 0–4°C не более 1–2 ч до регистрации их спектров ЭПР.

Далее крысам вводили ДНКЖ-Глт, в качестве которого применяли стандартный препарат «Оксаком», изготовленный на Экспериментальном предприятии медико-биологических препаратов ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, активным веществом которого являлся ДНКЖ-Глт. Данный препарат всегда вводили внутривенно болюсно в дозе 1,6 мкмоль/(кг массы тела). Далее через венозный катетер получали еще одну пробу цельной крови объемом 1,5 мл и по аналогичной методике готовили образцы плазмы и эритроцитарной массы.

Перед регистрацией спектров ЭПР в образцы плазмы и эритроцитарной массы вводили растворенные в этаноле спиновые зонды, в качестве которых применяли 5- и 16-доксилстеариновую кислоту (5-ДС и 16-ДС соответственно). Их концентрация во всех образцах составляла 200 мкМ,

а содержание вносимого при этом этанола было не более 2%.

Кроме того, в ходе работы проводили регистрацию спектров плазмы и эритроцитов, полученных через 10 мин после введения ДНКЖ-Глт без добавления спиновых зондов для контроля содержания связанных с белками ДНКЖ.

Спектры ЭПР полученных образцов регистрировали при комнатной температуре с помощью ЭПР-спектрометра X-диапазона E-109E (Varian, США). Амплитуда модуляции магнитного поля составляла 0,2 мТл (при регистрации спектров спиновых зондов) или 0,4 мТл (при регистрации связанных с белками ДНКЖ) при частоте 100 кГц. Уровень сверхвысокочастотной мощности спектрометра составлял 10 мВт. При записи сигналов спиновых зондов проводили сканирование магнитного поля с центром при $g = 2,00$; а при регистрации сигналов связанных с белками ДНКЖ – $g = 2,03$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для анализа действия ДНКЖ на молекулярную динамику в плазме крови и в эритроцитах применяли такие липофильные спин-меченые производные стеариновой кислоты, как 5- и 16-ДС. После введения этих соединений в плазму или эритроциты регистрировали их спектры ЭПР, исходя из которых судили об изменениях скорости молекулярного движения зондов, происходящих в результате изменения их микроокружения вследствие внутривенной инъекции ДНКЖ-Глт.

Известно, что в плазме такие липофильные спиновые зонды, как производные стеариновой кислоты, связываются главным образом с молекулами сывороточного альбумина [12,13]. В эритроцитарной массе эти два спиновых зонда находятся преимущественно в липидной фазе мембран эритроцитов [14], причем при встраивании этих зондов в мембрану парамагнитный фрагмент 5-ДС находится вблизи поверхности мембраны, в области плотной упаковки липидов, а 16-ДС – ближе к середине мембраны, в зоне их рыхлой упаковки [15]. Молекулы этих зондов при физиологических значениях pH имеют отрицательный заряд с одного конца углеводородной цепи. Поэтому, несмотря на то, что данные соединения обладают гидрофобными свойствами, их небольшие количества могут находиться и в водном окружении [15].

Известно также, что спектры ЭПР этих зондов представляют собой триплетные сигналы с центром при $g = 2,00$, причем расщепление и форма линий этих спектров зависит от их микроокружения. Так, при встраивании в мембрану они нахо-

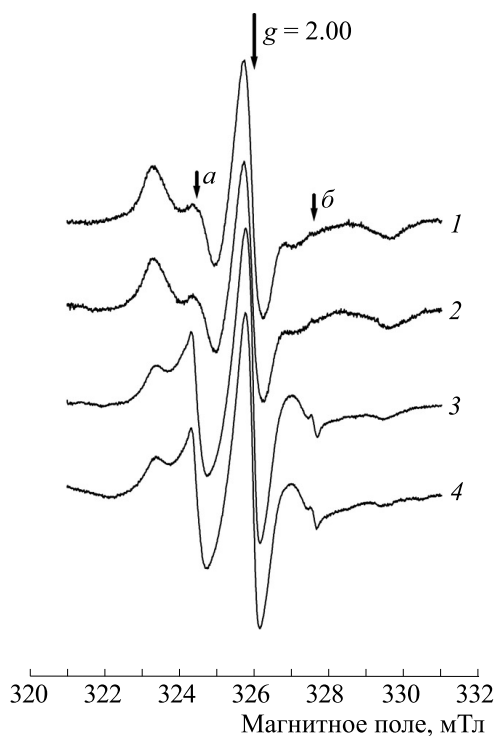


Рис. 1. Спектры ЭПР образцов плазмы крови: 1 – в начале опыта, в присутствии 5-ДС; 2 – через 10 мин после введения ДНКЖ-Глт, в присутствии 5-ДС; 3 – в начале опыта, в присутствии 16-ДС; 4 – через 10 мин после введения ДНКЖ-Глт, в присутствии 16-ДС. Регистрация сигналов при комнатной температуре. Очень слабые узкие компоненты, соответствующие этим зондам в водном окружении, отмечены стрелками *a* и *b*.

дятся в вязком гидрофобном окружении, в результате чего могут быть охарактеризованы сигналами, состоящими из трех уширенных и несколько асимметричных линий. Напротив, молекулярное движение зондов в водном окружении менее заторможено и более изотропно, вследствие чего их спектр ЭПР представляет собой триплет более узких и симметричных компонентов. Кроме того, сигналы этих зондов, локализованных в гидрофобном и полярном окружениях, различаются значениями константы изотропного расщепления [15].

В ходе опытов проводили анализ спектров ЭПР данных спиновых зондов в плазме и эритроцитарной массе и изменений этих спектров в результате введения ДНКЖ-Глт. Безусловно, в столь гетерогенной системе, как плазма крови, нельзя назвать единственного места встраивания молекул 5-ДС и 16-ДС. Однако, учитывая то, что содержание альбумина в плазме наиболее велико по сравнению с другими тиолсодержащими белками, и молекулы 5- и 16-ДС способны встраи-

ваться в его гидрофобные карманы, то изменения структурно-функциональных характеристик альбумина и характера его молекулярного движения несомненно должны приводить к изменениям формы спектров данных спиновых зондов.

На рис. 1 представлены характерные спектры ЭПР образцов плазмы крови, содержащих 5-ДС и 16-ДС, полученных как в начале опыта, так и через 10 мин после введения ДНКЖ-Глт. Из этого рисунка видно, что в обоих случаях спектры 5-ДС и 16-ДС представляли собой главным образом триплетные уширенные сигналы, что свидетельствовало о заторможенном движении парамагнитных фрагментов этих зондов в гидрофобном микроокружении. При этом на спектрах регистрировались лишь очень слабые узкие компоненты, соответствующие этим зондам в водном окружении (линии *a* и *b* на рис. 1).

Из этого рисунка также видно, что форма и параметры спектров практически не изменялись при переходе от исходных образцов к пробам плазмы крови, полученным после введения этих комплексов. Следовательно, скорость и характер вращательной диффузии зондов 5-ДС и 16-ДС практически не меняются в результате введения ДНКЖ-Глт. Учитывая то, что альбумин является основным тиолсодержащим белком в плазме крови, а также тот факт, что данные спиновые зонды способны интегрироваться в его гидрофобных карманах [12,13], полученные данные заставляют думать о том, что присутствие ДНКЖ, связанных с этим белком по SH-группе, не приводит к заметным структурно-конформационным изменениям этого лиганда в плазме.

Следует отметить, что, несмотря на то что инъекция ДНКЖ-Глт не приводит к изменениям характера молекулярного движения 5-ДС и 16-ДС в плазме, в крови животного происходило формирование и накопление связанных с белками ДНКЖ. Для контроля образования таких стабилизированных форм NO в компонентах крови проводились специальные эксперименты, в которых регистрировались сигналы ЭПР плазмы и эритроцитарной массы через 10 мин после инъекции ДНКЖ-Глт при отсутствии в них спиновых зондов. Характерный спектр ЭПР плазмы крови после введения данного препарата представлен на рис. 2. Из этого рисунка видно, что в этих образцах присутствовали связанные с белками мономерные ДНКЖ, в то время как комплексы с низкомолекулярным лигандом практически не регистрировались.

Содержание связанных с белками мономерных ДНКЖ в плазме на данном этапе опыта составляло в среднем 28 нмоль/г. В эритроцитарной массе также регистрировались эти комплексы с белковыми лигандами, при этом их концентра-

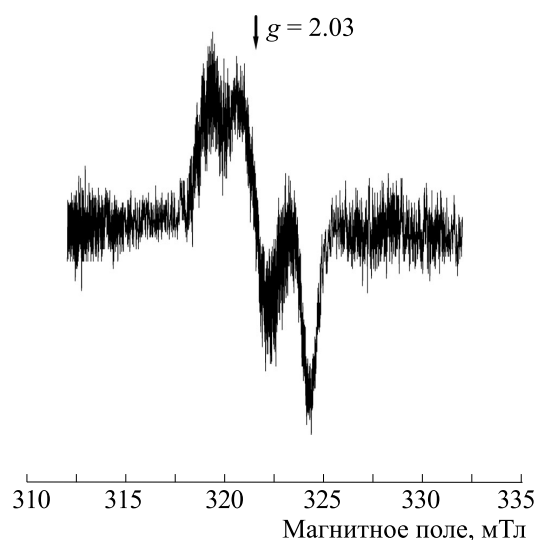


Рис. 2. Спектр ЭПР плазмы крови, полученной через 10 мин после введения ДНКЖ-Глт. Регистрация сигнала при комнатной температуре.

ция была ниже, чем в плазме, в 10–12 раз. Аналогичное распределение этих комплексов с белковыми лигандами в компонентах крови было получено нами ранее [11]. Следовательно, в результате инъекции ДНКЖ-Глт происходит формирование этих комплексов, связанных с белковыми лигандами, в плазме и эритроцитарной массе, при этом мономерные ДНКЖ с низкомолекулярными лигандами практически отсутствуют.

Необходимо отметить, что данный этап опыта (10 мин после введения препарата ДНКЖ-Глт) может быть охарактеризован тем, что к этому моменту в организме уже завершена «быстрая фаза» гипотензивного эффекта данного препарата, характеризующаяся резким снижением среднего артериального давления с последующим его частичным восстановлением, и наблюдается более медленная фаза снижения давления, которая продолжается в течение более длительного времени. В крови при этом формируется пул связанных с белками ДНКЖ, которые далее подвергаются сравнительно медленному распаду с высвобождением NO [11,16].

В другой части работы исследовали действие ДНКЖ на поведение спиновых зондов 5-ДС и 16-ДС, находящихся в суспензии эритроцитов. В этом случае применение данных производных стеариновой кислоты позволяло провести анализ действия ДНКЖ, связанных с гемоглобином по SH-группе, на динамику молекулярного движения в липидной фазе мембран эритроцитов. Кроме того, изменение распределения этих заряженных зондов, встроенных в мембрану и находящихся за ее пределами в физиологическом

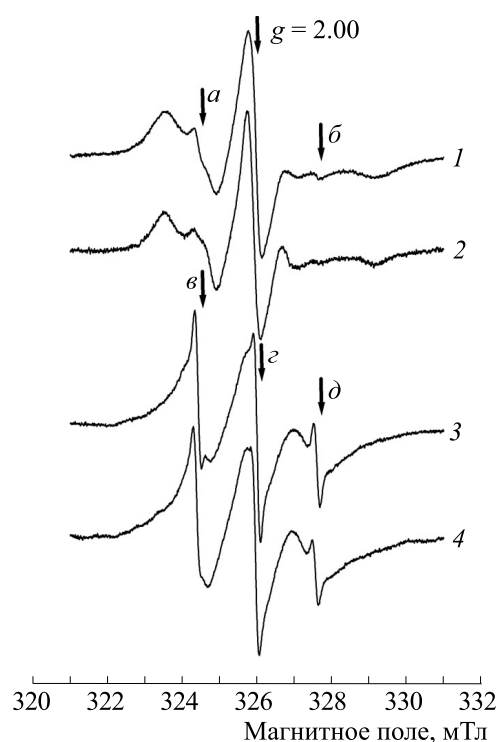


Рис. 3. Спектры ЭПР образцов эритроцитарной массы: 1 – в начале опыта, в присутствии 5-ДС; 2 – через 10 мин после введения ДНКЖ-Глт, в присутствии 5-ДС; 3 – в начале опыта, в присутствии 16-ДС; 4 – через 10 мин после введения ДНКЖ-Глт, в присутствии 16-ДС. Регистрация сигналов при комнатной температуре.

растворе, позволяло судить об изменениях заряда на внешней поверхности мембран эритроцитов в результате введения ДНКЖ-Глт.

На рис. 3 представлены характерные спектры ЭПР образцов суспензии эритроцитов, полученных как в начале опыта, так и после введения ДНКЖ-Глт, и содержащих спиновые зонды 5-ДС или 16-ДС. Из этого рисунка видно, что сигналы 5-ДС (кривые 1 и 2 на рис. 3) представляли собой триплет широких линий, что соответствовало заторможенному и анизотропному движению молекул этого зонда в зоне плотной упаковки липидов мембран эритроцитов [14,15]. Из рис. 3 также видно, что форма и ширина компонентов спектров 5-ДС, а также общая ширина их сигналов, оцениваемая как расстояние между крайними экстремумами их компонентов, практически не изменялись в результате введения животным ДНКЖ-Глт. Следовательно, введение этих комплексов не приводило к изменениям скорости и характера молекулярного движения липидов мембран эритроцитов в области их плотной упаковки.

Из рис. 3 также видно, что спектр 1 (кровь, полученная в начале опыта и содержащая 5-ДС) кроме широких асимметричных компонентов содержал также небольшие компоненты, представляющие собой узкие линии этого зонда в полярном окружении (компоненты *a* и *b* на рис. 3). При этом средняя компонента 5-ДС в водном окружении перекрывалась с соответствующей линией этого зонда в гидрофобном микроокружении и поэтому практически не проявлялась в суммарном спектре. Из этого рисунка также видно, что спектр 2 (кровь, полученная после введения ДНКЖ-Глт, содержащая 5-ДС) характеризовался меньшей амплитудой этих узких компонентов, по сравнению со спектром 1. Следовательно, в результате введения ДНКЖ-Глт стимулировалось встраивание этого зонда в липидную фазу мембраны.

На рис. 3 представлены также характерные сигналы 16-ДС в образцах крови, полученных как в начале опыта (спектр 3), так и после введения ДНКЖ-Глт (спектр 4). Видно, что эти спектры также представляют собой суперпозицию двух сигналов. Присутствующий в обоих спектрах триплетный сигнал, состоящий из более широких компонентов, как известно (см. работу [15]), соответствует зонду, локализованному в липидной фазе мембраны эритроцитов, а три узкие линии (обозначенные буквами *v*, *z*, и *d* на рис. 3) принадлежат молекулам этого зонда в водном окружении. Из рисунка видно, что форма и ширина широких компонентов практически не менялись в результате введения ДНКЖ-Глт, что заставляет думать о том, что скорость молекулярного движения в середине мембраны эритроцитов, в области рыхлой упаковки липидов, также не изменялась в результате инъекции этой стабилизированной формы NO.

Из спектров 3 и 4 (рис. 3) также видно, что амплитуда узких компонентов 16-ДС, соответствующих молекулам этого зонда в водном окружении, уменьшалась в результате введения ДНКЖ-Глт, что может свидетельствовать о том, что данный препарат стимулирует встраивание 16-ДС в мембрану эритроцитов.

Следовательно, введение в организм препарата ДНКЖ-Глт, приводящее к формированию и накоплению в плазме и эритроцитах связанных с белками ДНКЖ, не приводит к каким-либо изменениям структурно-функциональных характеристик альбумина в плазме крови, а также молекулярной подвижности в липидной фазе мембран эритроцитов. Такой результат можно объяснить тем, что молекулярная масса групп $\text{Fe}^+(\text{NO}^+)_2$, связывающихся с белком, во много раз меньше, чем самих тиолсодержащих белковых молекул,

поэтому они не оказывают заметного влияния на их молекулярное движение, а также подвижность и упорядоченность находящихся вблизи липидов в областях их плотной и рыхлой упаковки.

Действие ДНКЖ-Глт, способное стимулировать встраивание 5-ДС и 16-ДС в мембрану эритроцитов, можно объяснить следующим образом. Как известно, некоторые амфифильные препараты влияют на структуру и проницаемость мембран эритроцитов [17]. Однако полученные нами результаты свидетельствуют о том, что введение ДНКЖ-Глт не оказывает заметного влияния на микроокружение 5-ДС и 16-ДС, локализованных в липидной фазе мембран эритроцитов. В связи с этим можно предположить, что стимулирование встраивания этих зондов в мембраны эритроцитов под действием исследуемых комплексов NO связано с нитрозилированием белковых компонентов мембраны или изменением заряда ее внешней поверхности.

Нельзя также исключить, что причиной наблюдаемых эффектов является взаимодействие гемоглобина с NO и его метаболитами, в результате чего может происходить нитрозилирование железа гемовых групп и SH-групп цистеиновых остатков гемоглобина, а также формирование связанных с ними ДНКЖ [9]. Действительно, изменения молекулярного профиля и латеральной организации молекул мембраны могут изменять распределение зарядов на ее поверхности [18]. В частности, изменение потенциала мембран эритроцитов происходит при их обработке нитритом натрия, который, как и ДНКЖ, в физиологических условиях может быть источником NO, причем важную роль в этом процессе играет образование связанного с мембраной гемихрома (продукта модификации гемоглобина) [18]. Существенно, что в этом случае отрицательный заряд поверхности мембраны снижается. Учитывая то, что молекулы 5-ДС и 16-ДС, представляющие собой спин-меченые аналоги стеариновой кислоты, в области физиологических значений pH имеют отрицательный заряд с одного конца углеводородной цепи [15], можно предположить, что изменение заряда мембраны эритроцитов в результате действия комплексов NO будет способствовать встраиванию исследуемых зондов в липидную фазу этих мембран.

Таким образом, введение в организм ДНКЖ-Глт не приводит к изменениям молекулярного движения в гидрофобных областях альбумина в плазме крови и мембран эритроцитов, но при этом стимулируется встраивание в их мембрану заряженных спиновых зондов, что, вероятно, является следствием изменения заряда внешней поверхности этих клеток.

Авторы выражают благодарность д. б. н. К.Б. Шумаеву за ценные советы при обсуждении результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 18-015-00027а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. F. Vanin, Nitric Oxide: Biol. Chem. **21**, 1 (2009).
2. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide: Biol. Chem. **23**, 136 (2010).
3. Y. S. Rahmanto, D. S. Kalinowski, D. J. Lane, et al., J. Biol. Chem. **287** (10), 6960 (2012).
4. A. F. Vanin, Nitric Oxide: Biol. Chem. **54**, 156 (2016).
5. V. D. Mikoyan, E. N. Burgova, R. R. Borodulin, et al., Nitric Oxide: Biol. Chem. **62**, 1 (2017).
6. А. Ф. Ванин, Биофизика **62** (4), 629 (2017).
7. С.-Н. Ке, С.-Н. Chen, М.-Л. Tsai, et al., J. Am. Chem. Soc. **139** (1), 67 (2017).
8. K. B. Shumaev, A. L. Dudylyna, M. V. Ivanova, et al., BioFactors **44** (3), 237 (2018).
9. K. B. Shumaev, A. A. Gubkin, V. A. Serezhnikov, et al., Nitric Oxide: Biol. Chem. **18**, 37 (2008).
10. Y.-J. Chen, W.-C. Ku, L.-T. Feng, et al., J. Am. Chem. Soc. **130** (33), 10929 (2008).
11. A. A. Timoshin, A. F. Vanin, Ts. R. Orlova, et al., Nitric Oxide: Biol. Chem. **16** (2), 286 (2007).
12. J. Reichenwallner and D. Hinderberger, Biochim. Biophys. Acta **1830** (12), 5382 (2013).
13. A. A. Pavicevic, A. D. Popovic-Bijelic, M. D. Mojovic, et al., J. Phys. Chem. B **118** (37), 10898 (2014).
14. K. Tsuda, Heart Vessels **31** (10), 1724 (2016).
15. *Метод спиновых меток. Теория и применение*, под ред. Л. Берлинера (Мир, М., 1979).
16. V. L. Lakomkin, A. F. Vanin, A. A. Timoshin, et al., Nitric Oxide: Biol. Chem. **16**, 413 (2007).
17. A. Alaarg, R. M. Schiffelers, W. W. van Solinge, et al., Front Physiol. **4**, 365 (2013). DOI: 10.3389/fphys.2013.00365.
18. F. Tokumasu, G. A. Nardone, G. R. Ostera, et al., PLoS One **4** (6), e5828 (2009). DOI: 10.1371/journal.pone.0005828.

The Influence of Dinitrosyl Iron Complexes on Physicochemical Characteristics of Rat Blood Components

A.A. Timoshin*, V.L. Lakomkin*, and E.K. Ruuge* **

*National Medical Research Centre for Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation,
3-ya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia

**Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1, Moscow, 119991 Russia

The present research was designed to analyze the effect of dinitrosyl iron complexes with intravenous glutathione as the primary ligand of these complexes in plasma on structural and conformational characteristics of albumin and molecules of the lipid phase in the erythrocyte membrane, that constitute the microenvironment of dinitrosyl iron complexes in red blood cells. We performed the analysis of EPR spectra of spin labels such as 5- and 16-doxylstearic acid in plasma and red blood cells suspension before and after injection of dinitrosyl iron complexes with glutathione. It has been found that dinitrosyl iron complexes with glutathione injected to rats had no effect on molecular motion in hydrophobic regions of albumin in plasma and red blood cells, but herewith charged spin labels penetrated into the red blood cell membrane more effectively. Apparently, it was due to a change in the charge on the outer surface of the red blood cells.

Keywords: albumin, dynamics of molecular motion, dinitrosyl iron complexes, erythrocyte membrane, spin label, electron paramagnetic resonance