

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА И МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ В НОРМЕ И ПРИ ПРОЯВЛЕНИЯХ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

© 2019 г. Д.И. Грачев* **, А.Л. Дудылина**, В.Н. Титов**, Э.К. Рууге* **

*Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/2

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

E-mail: ruuge@mail.ru

Поступила в редакцию 25.01.2019 г.

После доработки 12.07.2019 г.

Принята к публикации 08.07.2019 г.

С помощью спектроскопии ЭПР спиновых меток проведено исследование структурно-конформационных характеристик сывороточного альбумина и мембран эритроцитов крови человека в норме и при признаках патологии сердечно-сосудистой системы. В качестве спиновых меток были использованы 5-доксилстеариновая кислота и 16-доксилстеариновая кислота, парамагнитные НО-фрагменты прикреплены к разным местам углеводородной цепи. Спектры ЭПР 16-доксилстеариновой кислоты свидетельствуют о том, что молекулы сывороточного альбумина характеризуются в физиологическом интервале температур центрами связывания жирных кислот нескольких типов, отличающимися по параметрам вращательной диффузии локализованных в них спиновых меток. Такое распределение центров связывания жирных кислот сохранялось для сыворотки крови всех исследованных нами пациентов, независимо от отклонений от нормы параметров крови. Мембранную микровязкость эритроцитов из крови исследованных пациентов измеряли с помощью спиновых меток 5-доксилстеариновой и 16-доксилстеариновой кислот, парамагнитные фрагменты которых находятся на разных глубинах внутри липидного бислоя. Было обнаружено, что в случае пациентов с повышенным коэффициентом анизотропии эритроцитов микровязкость мембранных липидов статистически достоверно выше, чем в норме.

Ключевые слова: спектроскопия ЭПР, спиновые метки, сывороточный альбумин, эритроциты, сердечная недостаточность, гиперхолестеринемия.

DOI: 10.1134/S0006302919050090

Сывороточный альбумин является наиболее распространенным белком плазмы крови человека, присутствующим в концентрациях ~40 мг/мл (~0,6 мМ) [1–3]. Этот белок с молекулярной массой 66,5 кДа синтезируется в печени, откуда секретируется как одиночная негликозилированная полипептидная цепь. Сывороточный альбумин человека имеет множество функций в физиологических условиях. Он обладает примечательной обратимой связывающей способностью к различным лигандам и может переносить множество эндогенных и экзогенных соединений, таких как жирные кислоты, билирубин, гемин, гормоны, полипептиды и свободные ионы металлов. Также он связывает широкий диапазон лекарственных препаратов, таких как аспирин, ибупрофен, ди-

азепам и варфарин [3]. Суммарная площадь поверхности относительно небольших молекул сывороточного альбумина велика, что делает его весьма эффективным для связывания и переноса различных соединений.

Семь основных центров связывания жирных кислот расположены в различных частях белка и показывают разные относительные сродства к жирным кислотам [1–3]. Кроме того, среднепочечные жирные кислоты связываются на дополнительных сайтах альбумина, образуя в общей сложности до одиннадцати различных локусов связывания. Основные центры, связывающие жирные кислоты, имеют топологические различия и содержатся, как правило, внутри одного из субдоменов сывороточного альбумина и перекрываются с близлежащими доменами или субдоменами. Эти особенности локализации центров связывания жирных кислот могут приводить

Сокращения: 5DS – 5-доксилстеариновая кислота, 16DS – 16-доксилстеариновая кислота.

к аллостерическому влиянию на взаимодействие альбумина как с другими лигандами, так и с самими жирными кислотами. В жидкой среде молекула сывороточного альбумина проявляет конформационную гибкость и подвергается нескольким переходам, которые зависят от рН среды.

Сопряженные с различными болезнями биомаркеры, связанные с сывороточным альбумином, могут вызывать аллостерические модификации этого белка, приводя к изменениям его связывающих и транспортных свойств. При этом одной из модификаций молекулы альбумина является изменение его способности связывать и транспортировать жирные кислоты. Во многих работах [4–10] показано изменение структурно-конформационных характеристик молекул сывороточного альбумина при различного рода онкологических заболеваниях, таких как лимфомы (болезнь Ходжкина) и лейкемии.

Структурные и функциональные изменения, которые происходят с альбумином, могут быть обнаружены с помощью различных физико-химических методов, в том числе с помощью спектроскопии ЭПР спиновых меток.

Мембрана эритроцитов представляет собой пластичную структуру из липидных участков, белков, липо- и гликопротеинов; толщина мембраны клетки составляет ~10 нм [4]. Плазматическую мембрану эритроцита можно разделить на три слоя. Наружный слой образован гликопротеинами и содержит комплексы концевых отделов антигенов. Поверхность мембраны эритроцита представляет собой сложную многомерную структуру. Эта структура определяется неоднородностью мембраны и широким спектром ее белкового состава.

Изменения свойств мембран и общих физико-механических параметров эритроцитов крови характерны для многих заболеваний организма человека. Подобные изменения могут характеризоваться такими общими параметрами эритроцитов, как коэффициент их анизотропии — вариабельность среднего объема или сам средний объем клетки. При патогенезе заболеваний сердечно-сосудистой системы указанные изменения не так сильно выражены, однако в ряде работ показаны весьма значимые отклонения параметров эритроцитов от нормы [12–15]. В частности, выявлены значимые различия в физико-химических характеристиках эритроцитов для нормотензивных и гипотензивных пациентов [16], продемонстрировано существенное увеличение микровязкости мембран эритроцитов при острых приступах нестабильной стенокардии [17].

Спектроскопия ЭПР является важнейшим методом изучения физико-химических и функциональных характеристик различных биологических объектов на молекулярном и клеточном

уровне [18–21]. В данной работе с помощью спектроскопии ЭПР спиновых меток проведено исследование структурно-конформационных характеристик сывороточного альбумина и мембран эритроцитов крови человека в норме и при проявлении признаков различных патологий, связанных с сердечно-сосудистой недостаточностью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение препаратов сыворотки и эритроцитов крови человека. Образцы сыворотки и эритроцитарной массы крови 57 пациентов были получены в клиничко-диагностической лаборатории Национального медицинского исследовательского центра кардиологии Минздрава России. Там же проводили биохимический и гематологический анализ крови. Для исследования были отобраны образцы с различными характеристиками крови, в частности с гиперхолестеринемией, с гипертриглицеридемией, повышенной анизотропией эритроцитов, а также с нормальными показателями по соответствующим параметрам. Для получения образцов сыворотки крови и эритроцитарной массы и определения основных биохимических и гематологических показателей использовали стандартные клинические лабораторные методики.

Проведение опытов по ЭПР-спектроскопии со спиновыми метками 5DS и 16DS. Для изучения структурных и динамических характеристик мембран эритроцитов и сывороточного альбумина использовали нитроксильные свободные радикалы — спин-меченые производные стеариновой кислоты: 5-доксилстеариновую кислоту (5DS) и 16-доксилстеариновую кислоту (16DS) в концентрациях в образце от 0,4 до 1,6 мМ. Полученные образцы помещали в стеклянные капилляры с внутренним диаметром 0,8 мм.

Спектры ЭПР были записаны на спектрометре E-109E фирмы Varian (США), оснащенном температурной приставкой E-254, а также на малогабаритном автоматизированном спектрометре ESR 70-03 XD/2 УП («КБСТ» БГУ, Беларусь). Запись спектров на спектрометре Varian E-109E и их обработку проводили с помощью специальной программы, созданной на кафедре биофизики физического факультета МГУ; на спектрометре ESR 70-03 XD/2 — с помощью программного обеспечения от изготовителя спектрометра.

Спектры ЭПР регистрировали при СВЧ-мощности 10 мВт (E-109E) или 5 дБ (ESR 70-03 XD/2), частоте высокочастотной модуляции 100 кГц и амплитуде высокочастотной модуляции 0,2 мТл (в случае 5DS) или 0,1 мТл (в случае 16DS); разворотка магнитного поля составляла 10 мТл. Температурные зависимости снимали на спектрометре E-109E с помощью приставки E-254 в диапазоне температур от 0 до 50°C.

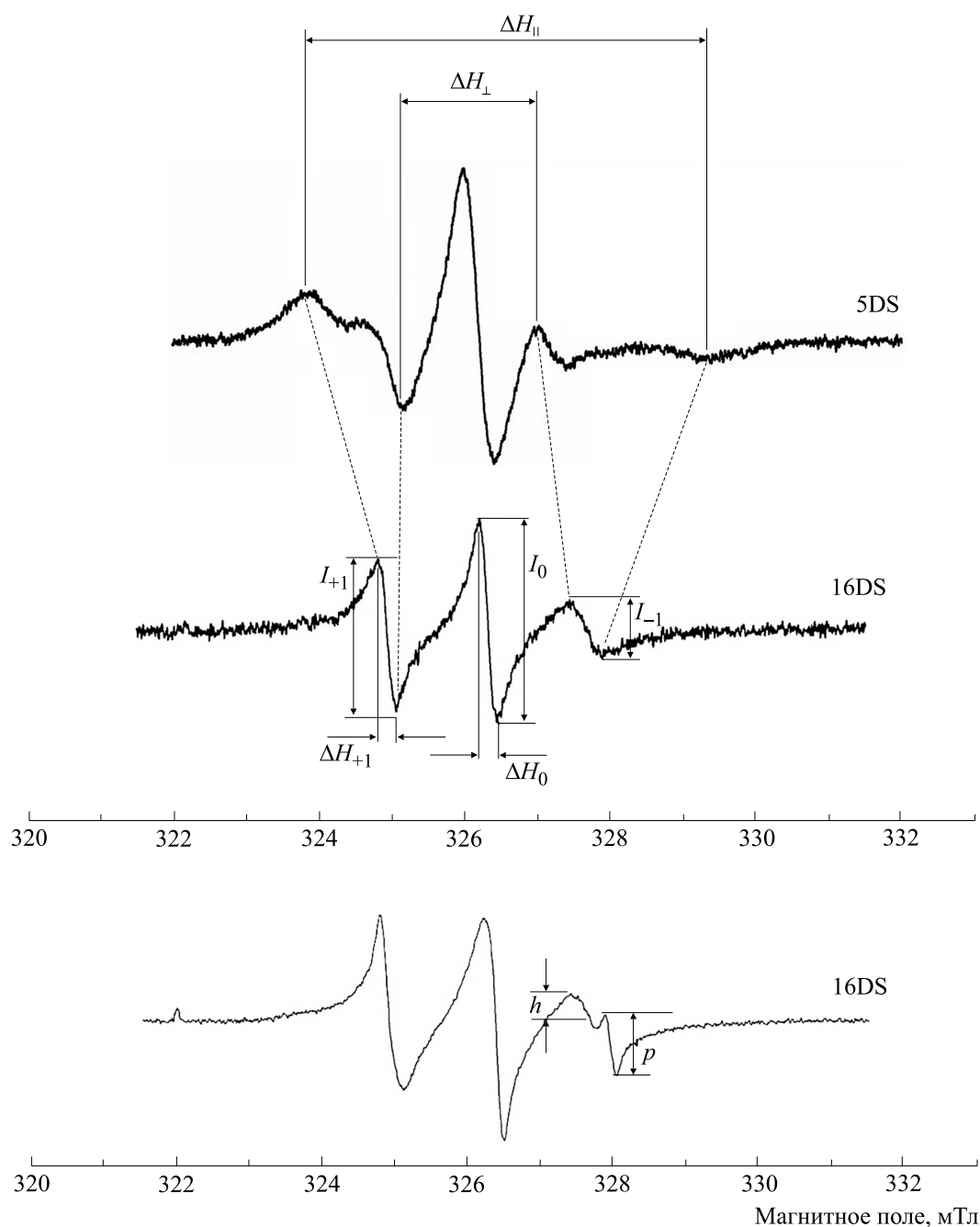


Рис. 1. Параметры спектров ЭПР спиновых меток 5DS и 16DS в мембранах эритроцитов донорской крови с нормальными показателями. В процессе выделения эритроциты дважды промывали. Температура $\sim 25^\circ\text{C}$.

На рис. 1 представлены характерные спектры ЭПР спиновых меток 5DS и 16DS в суспензии эритроцитов, выделенных из донорской крови с нормальными показателями. Эти спин-меченые производные стеариновой кислоты характеризуются разной глубиной погружения своего парамагнитного NO-фрагмента в липидный бислой мембран эритроцитов и, соответственно, разными скоростями вращательной диффузии. На

рис. 1 также показаны необходимые для анализа спектров ЭПР 5DS и 16DS параметры [18–20]:

1) Параметр порядка S , определяемый по формуле

$$S = (A'_{\parallel} - A'_{\perp}) / [A_{zz} - 1/2(A_{xx} + A_{yy})] \cdot a/a',$$

где $A'_{\parallel} = 1/2\Delta H_{\parallel}$ и $A'_{\perp} \approx 1/2\Delta H_{\perp}$, $a' = 1/3(A'_{\parallel} + 2A'_{\perp})$, $a = 1/3(A_{zz} + A_{xx} + A_{yy})$;

2) Время корреляции вращательной диффузии, оцениваемое по формулам

$$\tau_{+1} = 6,5 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta H_{+1} [(I_{+1}/I_{-1})^{1/2} - 1],$$

$$\tau_0 = 6,65 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta H_0 [(I_0/I_{-1})^{1/2} - 1], \text{ с};$$

3) Параметр p/h , позволяющий оценить соотношение метки, растворенной в полярной среде, к метке, встроенной в мембраны эритроцитов или связанной с различными центрами для жирных кислот на молекуле сывороточного альбумина.

Полученные значения спектральных параметров для меток 5DS и 16DS сравнивали по группам пациентов с различными показателями крови.

Реактивы. В работе использовали реактивы фирм Sigma (США), Aldrich (США), ICN (США), Serva (ФРГ), а также других фирм.

Статистический анализ. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка. Статистическую обработку результатов проводили по t-тесту и тесту ANOVA, используя приложения программы Origin 8 фирмы Origin Lab Corporation (США). Различия между экспериментальными данными считали достоверными при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектры ЭПР меток 5DS и 16DS в крови человека. На рис. 2 представлены спектры ЭПР меток 5DS и 16DS — спин-меченых производных стеариновой кислоты, внедренных в сыворотку и в мембраны эритроцитов крови человека. Используемые нами спиновые метки — 5-доксилстеариновая кислота и 16-доксилстеариновая кислота — различаются местами прикрепления парамагнитного фрагмента к углеводородной цепи и соответственно скоростью и характером его вращательной диффузии [5]. Спектр ЭПР метки 5DS в мембранах эритроцитов характерен для медленной вращательной диффузии при наличии более быстрого анизотропного вращения вокруг длинной оси молекулы стеариновой кислоты. Такие спектральные параметры свидетельствуют о локализации NO-фрагмента вблизи поверхности липидного бислоя мембраны эритроцитов. Спектр ЭПР метки 5DS, локализованной в гидрофобных карманах на молекуле сывороточного альбумина в сыворотке крови, также свидетельствует о замедлении вращательной диффузии парамагнитного фрагмента метки, которая, однако, носит более изотропный характер.

Спектр ЭПР метки 16 DS в эритроцитах типичен для спиновой метки с локализацией парамагнитного фрагмента в глубине липидного бислоя мембраны и свидетельствует о замедленной и практически изотропной вращательной диффузии. В случае метки 16 DS в сыворотке крови, однако, наблюдается более сложный спектр ЭПР, обусловленный существованием на поверхности сывороточного альбумина — основного транс-

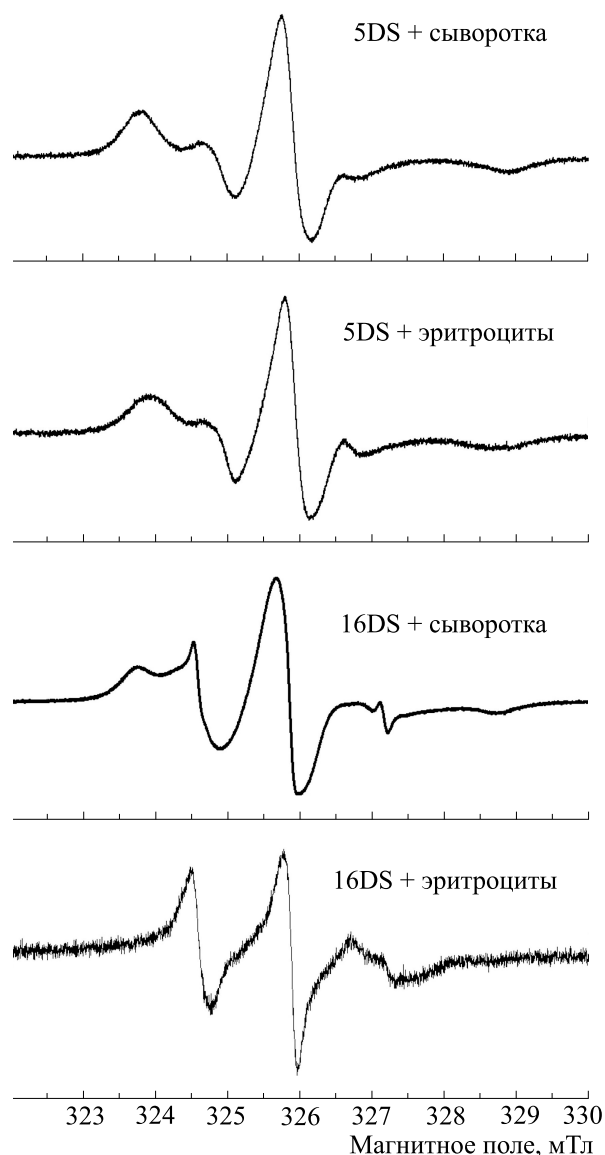


Рис. 2. Спектры ЭПР спиновых меток 5DS и 16DS в сыворотке и эритроцитах крови пациента с нормальными показателями. Температура $\sim 25^\circ\text{C}$.

портного белка крови — нескольких типов гидрофобных карманов для связывания жирных кислот, характеризующихся различными возможностями для вращательной диффузии парамагнитного фрагмента этой спиновой метки.

Особенности связывания метки 16DS с сывороточным альбумином крови человека. 16-доксилстеариновая кислота нашла широкое применение в качестве весьма информативной для сывороточного альбумина крови человека маркера во многих биофизических и медико-биологических исследованиях. Было показано, что отклонения показателей крови от нормы при патогенезе ряда онкологических заболеваний сопровождаются значительными структурно-конформационными изменениями в молекулах сы-

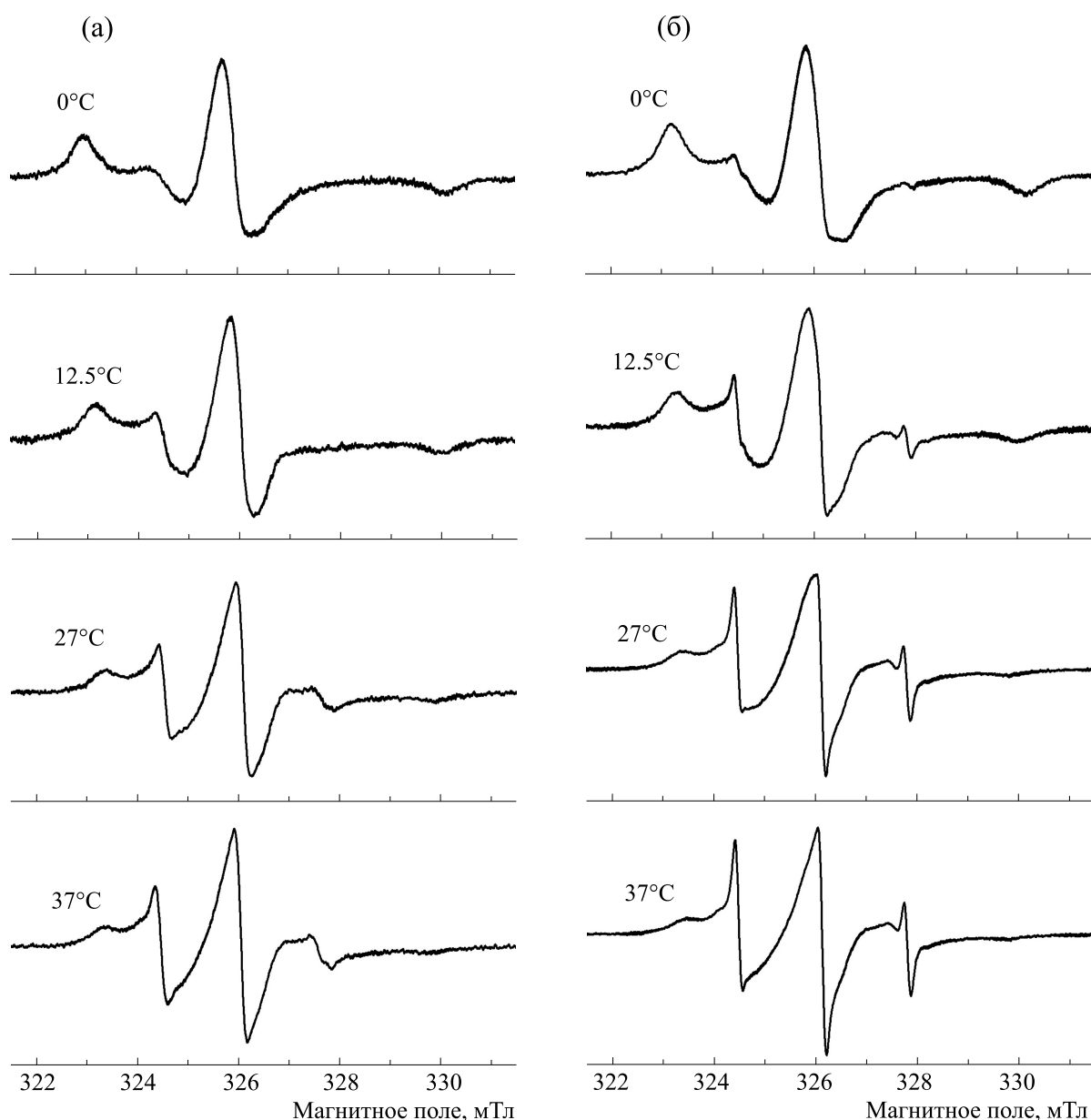


Рис. 3. (а) — Спектры ЭПР 0,4 мМ 16DS в сыворотке крови, снятые при различных значениях температуры. (б) — Спектры ЭПР 1,6 мМ 16DS в сыворотке крови, снятые при различных значениях температуры.

вороточного альбумина, приводящими к изменению степени связывания жирных кислот и их распределения по гидрофобным карманам с различными характеристиками (см. работу [4]). Кроме онкологических заболеваний, влияние отклонения показателей крови от нормы на физико-химические характеристики сывороточного альбумина было выявлено также для других заболеваний, таких как сердечная недостаточность и гипертония. Разными исследователями было показано, что регистрируемый суммарный спектр ЭПР сыворотки крови человека является суперпозицией спектров от сильно иммобилизованной метки 16DS ($\tau \geq 10^{-8}$ с), среднее

иммобилизованной метки 16DS ($\tau \approx 10^{-9}$ с), свободной метки 16DS в плазме крови ($\tau < 10^{-10}$ с) и метки 16DS в микромицеллах (широкий синглет без разрешенной сверхтонкой структуры). При этом вклад каждого из указанных спектров определяется воздействием патогенеза данного заболевания на структурно-функциональные характеристики компонентов крови.

На рис. 3 представлены спектры ЭПР метки 16DS в сыворотке крови, зарегистрированные при разных температурах (0, 12,5, 27 и 37°C) и концентрациях 16DS в среде инкубации (0,4 мМ — рис. 3а, 1,6 мМ — рис. 3б). Из представленных на этом ри-

Соотношение параметров p/h спектров ЭПР метки 16DS для группы пациентов с нормальными показателями холестерина и триглицеридов и группы пациентов с повышенными показателями (гиперхолестеринемия и гипертриглицеридемия)

Группа	p/h		$p/h(1,6 \text{ мМ } 16\text{DS})/$ $p/h(0,4 \text{ мМ } 16\text{DS})$
	при 0,4 мМ 16DS	при 1,6 мМ 16DS	
Норма ($n = 24$)	$1,153 \pm 0,014$	$1,411 \pm 0,018$	$1,213 \pm 0,022$
Холестерин $> 6 \text{ мМ}$ ($n = 7$)	$1,139 \pm 0,029$	$1,415 \pm 0,026$	$1,29 \pm 0,07$

сунке спектров ЭПР видно, что 16-доксилстеариновая кислота связывается с сывороточным альбумином в нескольких гидрофобных карманах с разными условиями для вращательной диффузии парамагнитного фрагмента радикала. При концентрации метки 16DS, равной 0,4 мМ, практически вся спиновая метка связывается с сывороточным альбумином, при концентрации 1,6 мМ значимая часть метки остается в сыворотке крови, не связанной с белком.

Для суммарного спектра ЭПР метки 16DS в сыворотке крови можно было вычислить расстояние между крайними экстремумами ΔH_{II} , характеризующее вращательную диффузию той части меток, которые сильно иммобилизованы в своих гидрофобных карманах (см. рис. 1, 2 и 3). Было найдено, что $\Delta H_{II} = 6,004 \pm 0,013 \text{ мТл}$ со значением медианы 6,016 мТл ($n = 42$). Почти такое же расстояние между крайними экстремумами спектра ЭПР спин-меченой сыворотки ($\Delta H_{II} = 6,134 \pm 0,045 \text{ мТл}$, медиана 6,190 мТл) наблюдалось и в случае использования метки 5DS — спиновой метки с другой локализацией парамагнитного фрагмента на молекуле стеариновой кислоты. Однако, в отличие от метки 16DS, спектр ЭПР метки 5DS во всех гидрофобных карманах сывороточного альбумина был характерен только для сильно иммобилизованных спиновых меток.

Для групп пациентов с отличающимися от нормы показателями крови в наших экспериментах наблюдались небольшие различия в значениях ΔH_{II} , однако эти различия не оказались статистически достоверными.

Еще в ранних работах по использованию метки 16DS в исследованиях физико-химических параметров компонентов сыворотки крови внимание было обращено на зависимость степени связывания этой спиновой метки с сывороточным альбумином от развития различных заболеваний, в первую очередь онкологических [4,5]. Весьма информативным оказался параметр p/h (см. рис. 1), определяющий долю несвязанной с белками сыворотки крови метки 16DS в невязкой среде. В наших экспериментах по параметру p/h сравнивались группы пациентов с нормальными и с повышенными показателями холестерина и триглицеридов в крови (т.е. в норме и в условиях

гиперхолестеринемии и/или гипертриглицеридемии). Результаты представлены в таблице.

Сравнение групп пациентов по данным параметрам не выявило существенных различий. Средние значения для группы с повышенным холестерином в крови достоверно не отличались от среднего значения по общей выборке.

Физико-химические свойства мембран эритроцитов. На рис. 4 представлены спектры ЭПР метки 5DS в мембранах эритроцитов, зарегистрированные при температурах 0°C, 12,5°C, 27°C и 37°C. Приведенные на этом рисунке спектры ЭПР характерны для медленной вращательной диффузии спиновой метки при наличии более быстрого анизотропного вращения вокруг длинной оси молекулы стеариновой кислоты. Спектральные параметры метки 5DS свидетельствуют также о локализации NO-фрагмента метки вблизи поверхности липидного бислоя мембраны эритроцитов.

Вращательную диффузию метки 5DS в мембране эритроцитов при разных температурах можно характеризовать расстоянием между крайними экстремумами ΔH_{II} и/или параметром порядка S (см. раздел «Материалы и методы»). На рис. 5 приведена типичная зависимость параметра ΔH_{II} от температуры, которая характеризуется изломом при 20°C.

В случае пациентов с незначительными отклонениями показателей крови от нормы ($n = 24$) было найдено, что $\Delta H_{II} = 5,781 \pm 0,029 \text{ мТл}$ со значением медианы 5,751 мТл (при комнатной температуре). Для групп пациентов с более существенными отклонениями показателей крови от нормы в значениях ΔH_{II} наблюдались заметные различия, которые, однако, не оказались статистически достоверными.

Вращательная диффузия 16DS в мембране эритроцитов характеризовалась при комнатной температуре временами корреляции $\tau_{+1} = (1,46 \pm 0,19) \cdot 10^{-9} \text{ с}$ и $\tau_0 = (1,89 \pm 0,21) \cdot 10^{-9} \text{ с}$, т.е. коэффициент эллиптичности вращательного движения метки $\varepsilon = \tau_0/\tau_{+1} = 1,3$.

Нами был проведен сравнительный анализ параметров спектров ЭПР метки 5DS группы пациентов

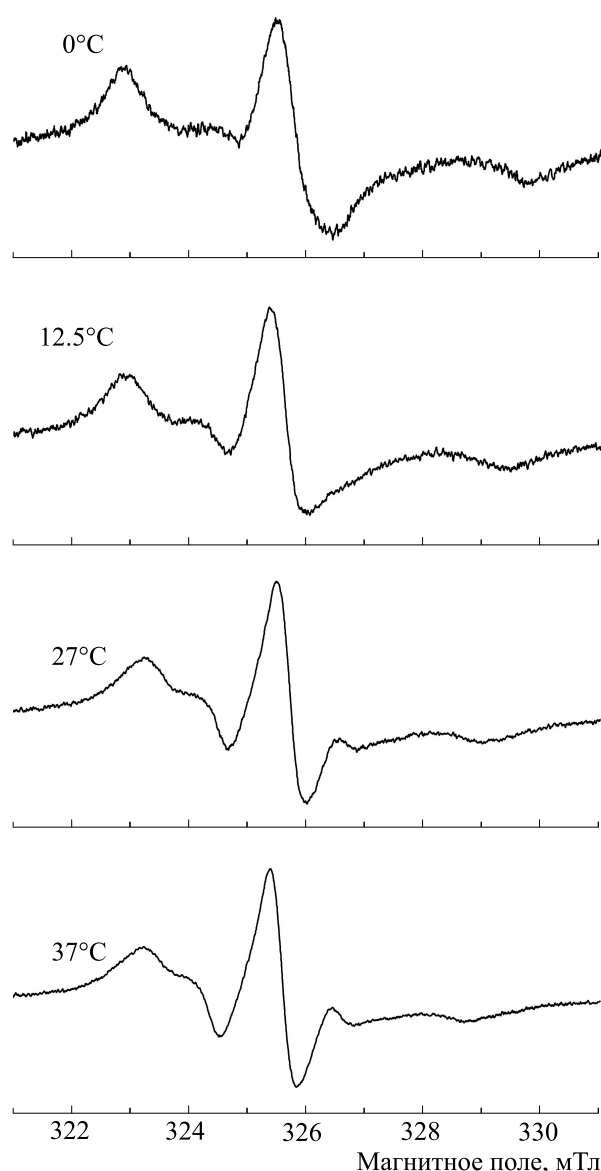


Рис. 4. Спектры ЭПР метки 5DS в мембранах эритроцитов, снятые при различных значениях температуры.

с повышенным коэффициентом анизотропии эритроцитов ($RDW > 16\%$) и группы с нормальными показателями анизотропии эритроцитов ($11,5 \leq RDW \leq 14\%$). Усредненные значения параметра порядка S для указанных групп пациентов приведены на рис. 6. Из этого рисунка видно, что повышенная по сравнению с нормой анизотропия эритроцитов сопровождается статистически достоверным ростом параметра S , т.е. увеличением микровязкости липидов их мембран.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные нами исследования показали, что метод спектроскопии ЭПР спиновых меток может дать значимую информацию о физико-химических свойствах сывороточного альбумина и

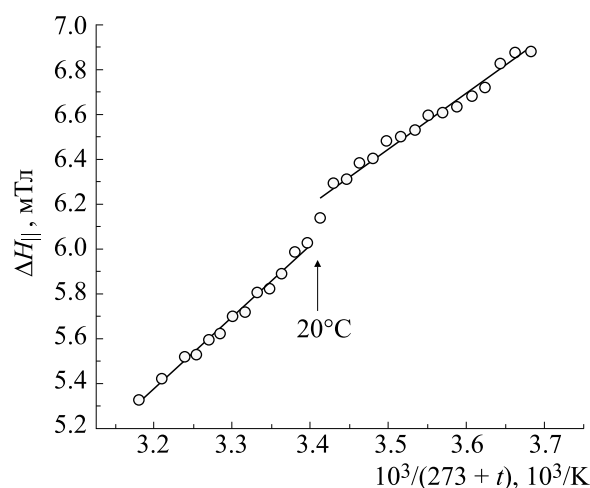


Рис. 5. Температурная зависимость спектрального параметра ΔH_{II} (см. рис. 1) для метки 5DS в мембранах эритроцитов донорской крови с нормальными показателями.

мембран эритроцитов крови человека. В случае использования метки 16DS наблюдался сложный спектр ЭПР сыворотки крови, свидетельствующий о существовании по крайней мере двух типов центров связывания жирных кислот. По ряду параметров спектров ЭПР обоих спиновых меток (5DS и 16DS), связанных с сывороточным альбумином и мембранами эритроцитов, при относительно небольших отклонениях показателей крови не выявлено статистически достоверных различий между группами пациентов с гиперхолестеринемией и гипертриглицеридемией, с одной стороны, и пациентами с нормальными параметрами — с другой.

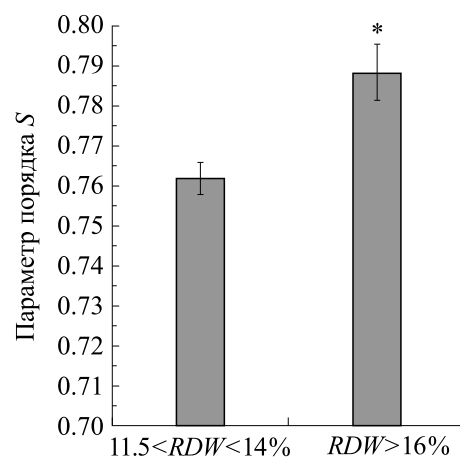


Рис. 6. Значения параметра порядка S для спиновой метки 5DS в мембранах эритроцитов пациентов с нормальным значением коэффициента анизотропии эритроцитов ($RDW = 11,5-14\%$, $n = 27$) и с повышенным значением этого коэффициента ($RDW > 16\%$, $n = 8$); $p < 0,05$; температура $\sim 25^\circ\text{C}$.

Физико-химические характеристики мембран эритроцитов изменялись только в группе пациентов с повышенным коэффициентом анизотропии эритроцитов. По параметру порядка S было выявлено значимое различие по сравнению с контрольной группой, свидетельствующее о повышении микровязкости.

Дальнейшие исследования в данной области должны выяснить, наблюдаются ли изменения параметров спектров ЭПР спиновых меток, связанных с сывороточным альбумином и мембранами эритроцитов при более существенных патологических отклонениях от нормы (сильная гиперхолестеринемия, атеросклероз, стенокардия, постинфарктное состояние).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-015-00125).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Н. Н. Пшенкина, *Фармакология* **12**, 1067 (2011).
2. J. R. Simard, *Anal. Biochem.* **347**, 97 (2006).
3. A. A. Pavićević, A. D. Popović-Bijelić, M. D. Mojović, et al., *J. Phys. Chem.* **118**, 10898 (2014).
4. S. C. Kazmierczak, A. Gurachevsky, G. Matthes, et al., *Clin. Chem.* **52**, 2131 (2006).
5. S. A. Gurachevsky, E. Muravskaya, T. Gurachevskaya, et al., *Cancer Invest.* **25** (6), 378 (2007).
6. Ю. М. Петрусевиц, О. П. Ревокатов и А. Н. Тихонов, Авторское свидетельство СССР № 1319705 (1984).
7. M. Moergel, P. W. Kämmerer, K. Schnurr, et al., *Clin. Oral Invest.* **16**, 1529 (2012).
8. Y. Akdogan, M. Emrullahoglu, D. Tatlidil, et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 22531 (2016).
9. A. Gurachevsky, E. Shimanovitch, T. Gurachevskaya, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **360**, 852 (2007).
10. M. Gelos, D. Hinderberger, E. Welsing, et al., *Int. J. Colorectal Dis.* **25**, 119 (2010).
11. В. В. Мороз, А. М. Голубев, А. В. Афанасьев и др., *Общая реаниматология* **8**, 1 (2012).
12. M. Minetti, *J. Cell. Biochem.* **25**, 73 (1984).
13. P. S. C. Preté, C. C. Domingues, N. C. Meirelles, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1808** (1), 164 (2011).
14. M. Montagnana, G. Cervellin, T. Meschi, et al., *Clin. Chem. Lab. Med.* **50**, 635 (2011).
15. E. Danese, G. Lippi, and M. Montagnana, *J. Thoracic Disease* **7**, 402 (2015).
16. K. Tsuda, *Int. Heart J.* **54**, 154 (2013).
17. E. K. Ruuge, E. A. Noeva, T. Sh. Sharifov, et al., *Eur. Heart J.* **16** (Suppl.), 473 (1995).
18. H. M. McConnell and B. G. McFarland, *Quart. Rev. Biophys.* **3**, 91 (1970).
19. B. J. Gaffney and H. M. McConnell, *J. Magn. Reson.* **16**, 1 (1974).
20. M. A. Hemminga, *Chem. Phys. Lipids* **32**, 323 (1983).
21. T. Pohl, T. Spatzal, M. Aksoyoglu, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1797**, 1894 (2010).

Physicochemical Peculiar Properties of Serum Albumin and Red Blood Cell Membranes under Normal and Heart Failure Symptom Condition

D.I. Grachev* **, A.L. Dudylna**, V.N. Titov**, and E.K. Ruuge* **

*Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1/ 2, Moscow, 119991 Russia

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

Spin labeling EPR spectroscopy has been used to study structural and conformational characteristics of human serum albumin and human erythrocyte membranes under normal and heart failure symptom conditions. 5-doxyl stearic acid and 16-doxyl stearic acid have been employed as spin labels; whose paramagnetic NO-fragments are identified as binding to different sites of the hydrocarbon chain. The EPR spectra of 16-doxyl stearic acid indicate that in the physiological temperature range serum albumin molecules are characterized by fatty acid binding sites of several types, which differ in spin-label rotational diffusion parameters. The same distribution of the said fatty acid binding sites was representative of blood serum in all patients who participated in our study, regardless of deviations from the normal blood parameters. The microviscosity of erythrocytes membranes from patients was measured using both 5-doxyl stearic and 16-doxyl stearic spin labels, the paramagnetic fragments of which are located at different depths inside the lipid bilayer. It was found that in patients with an increased erythrocyte anisotropy coefficient, the membrane lipid microviscosity is statistically significantly higher than under normal conditions.

Keywords: EPR spectroscopy, spin labels, serum albumin, erythrocytes, heart failure, hypercholesterolemia