

P. RAUDSEPP

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИОНОВ ЖЕЛЕЗА С КЛЕТЧНЫМИ МЕМБРАНАМИ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ПОМОЩИ ЭФФЕКТА МЁССБАУЭРА

R. RAUDSEPP. RAUAIOONIDE JA ERÜTROTSÜÜTIDE MEMBRAANIDE KOOSMOJU UURIMINE MOSSBAUERI EFEKTI ABIL

R. RAUDSEPP. INVESTIGATION OF THE INTERACTION BETWEEN IRON IONS AND THE MEMBRANES OF ERYTHROCYTES BY MOSSBAUER SPECTROSCOPY

Установлено взаимодействие ионов железа с поверхностью нативных эритроцитов и безгемоглобинных мембран в кислой среде.  $\text{FeO}(\text{OH})$ , образующийся при более высоких значениях pH, с мембранами не связывается.

В настоящее время можно с уверенностью сказать, что большинство химических и физических событий в любой биологической системе имеют место у мембран, на мембранах, в мембранах или через мембраны. Всасывание железа в организм также связано с проблемой взаимодействия ионов или комплексов металла с поверхностью мембран клеток слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта. Молекулярная сторона этого процесса почти не исследована, хотя имеется цикл работ о взаимодействии ионов  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  с бимолекулярными липидными мембранами [1–5]. Несмотря на то, что изучение этих модельных мембран дает некоторое представление о взаимодействии ионов железа с липидным остовом мембран, разрешить проблему могут только исследования нативных мембран со всеми ее структурными элементами.

В данной работе впервые исследовалось взаимодействие ионов  $\text{Fe}^{3+}$  с нативными мембранами при помощи эффекта Мёссбауэра. Метод ядерного гамма-резонанса выгодно отличается от других методов исследования (ЭПР, спектрофотометрии) возможностью селективно изучать электронную структуру и симметрию ближайшего окружения атомов железа в этих сложных биологических структурах и комплексах.

В качестве модели мембран клеток слизистой оболочки были выбраны мембраны эритроцитов благодаря их относительной простоте, гомогенности и возможности выделения в необходимых количествах; к тому же они содержат все структурные элементы мембран и их общая структура относительно хорошо изучена [6–10]. В качестве моделей железосодержащих сред использовались растворы  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ , комплекса железоглицин и гидроксид  $\text{FeO}(\text{OH})$ .

Тени (мембраны) эритроцитов человека выделяли по модифицированной методике Доджа—Митчелла—Ханахана [11].

Полное удаление гемоглобина контролировали измерением поглощения света при 418 нм. Вместе с гемоглобином удаляется, по-видимому, и часть адсорбированного на мембране белка [7].

Комплекс железо-глицин синтезировали по методике Де-Воре [12]. Для приготовления раствора  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$  использовали металлическое железо, обогащенное изотопом  $^{57}\text{Fe}$  до 80%. Маточный раствор  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$  готовили растворением металлического железа в горячей 35%-ной перхлоровой кислоте (марки «х. ч.») и выпаривали до начала кристаллизации. Маточный раствор разбавляли дистиллированной водой до концентрации  $4 \cdot 10^{-2}$  М (по Fe). Образцы готовили смешиванием суспензии мембран (или эритроцитов) и соответствующего количества раствора  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$  или комплекса железо-глицин. pH измеряемого образца устанавливали прибавлением растворов  $\text{HClO}_4$  или  $\text{NaHCO}_3$ , измеряли с точностью до  $\pm 0,1$  pH единиц и замораживали жидким азотом.

Мёссбауэровские спектры  $^{57}\text{Fe}$  замороженных образцов измерялись на спектрометре постоянного ускорения. Калибровка шкалы скорости спектрометра проводилась поглотителем из металлического железа. Измеренные (а также взятые из литературы) изомерные сдвиги даны относительно центра спектра нитропруссиды натрия. Источником  $\gamma$ -квантов служил  $^{57}\text{Co}$  в хrome при 295 К (активностью  $\sim 5$  мкюри). Для измерений спектров поглотители (концентрация  $^{57}\text{Fe} \sim 0,35$  мг/см<sup>2</sup>) помещались в пенопластовый криостат и поддерживались при температуре 78 К. Для установления температуры образца измерения начинали через 1 ч после вливания жидкого азота в криостат.

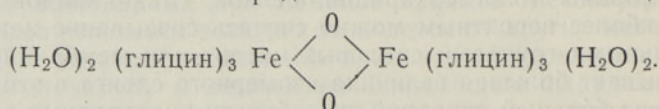
Целью первого этапа исследования было установление взаимодействия ионов  $\text{Fe}^{3+}$  с промытыми нативными эритроцитами. Для предотвращения гидролиза железа и осмотического гемолиза эритроцитов работу проводили при pH 1,2 в изотоническом растворе. В этих условиях ионы железа способны взаимодействовать только с внешней стороной мембраны. Согласно [13], при данной pH железо находится в растворе  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$  в виде мономерных ионов  $\text{Fe}[\text{OH}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$  и  $\text{Fe}[(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4]^+$ . Мы установили, что в ходе связывания железа с мембраной плотность электронного заряда на ядрах железа уменьшается — это отражается в значительном увеличении изомерного сдвига; повышается также симметрия непосредственного окружения атомов железа (см. таблицу). При сравнении параметров спектров комплексов железо-эритроцит и гидроксиоксида железа бросается в глаза, что последний имеет меньшую величину изомерного сдвига и более низкую симметрию ближайшего окружения иона железа. Учитывая вышесказанное, можно предполагать, что при pH 1,2 происходит связывание ионов железа с мембраной при участии, видимо, компонентов внешней стороны мембраны (олигосахаридов, белков, гликолипидов, гликопротеидов). Наиболее вероятным можно считать связывание ионов железа с карбоксильными группами сиаловых кислот или мембранных белков. На это указывает большая величина изомерного сдвига в этих комплексах вследствие большей донорной способности кислородных атомов карбоксильных групп по сравнению с таковыми в молекулах воды или в гидроксильных группах олигосахаридов; в результате повышается плотность заполнения *d*-орбит атомов железа и, как следствие, понижается плотность *s*-электронов на ядре за счет повышения эффекта экранирования последних.

Целью следующего этапа исследования было изучение комплексообразования ионов железа с мембранами теней эритроцитов (при pH 1,2). Спектры показали неизменность изомерного сдвига ионов железа. Значит, гемолиз — полное удаление гемоглобина и части адсорбированного белка из клетки — не влияет на характер химических связей ионов железа. Значительное же уширение резонансных линий указывает, видимо, на увеличение быстрых локальных смещений отдель-

Состав исследованной системы	pH раствора	Изомерный сдвиг $\delta$ , мм/сек $\pm 0,05$	Квадрупольное расщепление $\Delta$ , мм/сек $\pm 0,05$	Величина резонансного эффекта (без поправки на фон) $\epsilon$ , %	Ширина резонансной линии $\Gamma$ , мм/сек $\pm 0,05$
$Fe[OH(H_2O)_5]^{2+}$	1,2	0,59	1,50	—	—
$Fe[(OH)_2(H_2O)_4]^+$	1,2	0,47	—	—	—
$Fe(ClO_4)_3$ + промытые эритроциты	1,2	0,81	0,50	35,0	0,69
$Fe(ClO_4)_3$ + тени эритроцитов	1,2	0,82	0,76	4,3	0,87
$Fe(ClO_4)_3$ + супернатант теней эритроцитов (25000g)	1,2	0,80	0,31	6,2	1,02
$FeO(OH)$ + тени эритроцитов	8,4	0,73	0,71	29,3	0,72
$FeO(OH)$	14,0	0,73	0,68	31,1	0,71
$Fe$ -глицин	1,2	0,81	0,82	8,6	0,61
$Fe$ -глицин + тени эритроцитов	3,0	0,79	0,55	10,6	0,66
$Fe$ -глицин + тени эритроцитов (лиофилизованное)	—	0,80	0,50	30,5	0,71

ных, связанных с атомами железа, участков мембраны относительно остова при условии, что подвижность мембраны как целого практически исключена (заморожена). Комплекс железа с мембранами теней эритроцитов подвергается гидролизу аналогично солям железа. Первоначальный белый осадок комплекса (рН 1,2) в ходе подщелачивания (рН 8,4) превращается в коричневую массу, мессбауэровские параметры которой совпадают с параметрами гидроксиоксида железа. Учитывая данные [14] о взаимодействии ионов  $Fe^{3+}$  с модельными мембранами из фосфатидил холина (лецитина), можно в нашем случае предполагать, что образующийся при физиологических значениях рН  $FeO(OH)$  связан с мембраной весьма слабо.

Определенный интерес с точки зрения всасывания железа из пищевого тракта представляет взаимодействие комплекса железо-глицин с мембранами. Как показано в [12, 15], при низких значениях рН ионы  $Fe^{3+}$  образуют двухъядерный устойчивый комплекс с глицином, где атомы железа связаны кислородными мостиками и с глицином:



В ходе взаимодействия этого комплекса с мембранами теней эритроцитов величина изомерного сдвига не изменилась, но уменьшилось квадрупольное расщепление. Последнее можно связать с повышением симметрии ближайшего окружения ионов железа, видимо, в результате некоторого взаимодействия с мембраной. Лиофилизация смеси  $Fe$ -глицин-мембрана не изменяет параметров  $\delta$  и  $\Delta$ , но значительно повышает величину резонансного эффекта.

Обобщая изложенное, можно заключить, что в условиях наших опытов взаимодействие ионов  $Fe^{3+}$  с мембранами эритроцитов осуществляется путем координации ионов металла с кислородными атомами в первой координационной сфере (аналогично комплексу железо-глицин) при участии, по-видимому, карбоксильных остатков сиаловых кислот или

мембранных белков. При физиологических значениях рН взаимодействие Fe<sup>3+</sup> с мембраной слабое вследствие образования полиядерного гидроксидоксида.

В заключение выражаю благодарность Э. Реало и И. Яэку за ценные замечания при обсуждении результатов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Mueller P., Rudin D. O., Tien H. T., Wescott W. C., *Nature*, **194**, 979 (1962).
2. Pant H. C., Rosenberg B., *Photochem. Photobiol.*, **14**, 1 (1972).
3. Karvaly B., Pant H. C., *Studia Biophys.*, **33**, 51 (1972).
4. MacDonald R. C., Thompson T. E., *J. Membr. Biol.*, **7**, 54 (1972).
5. Karvaly B., *Studia Biophys.*, **38**, 9 (1973).
6. Lessin L. S., *Nouv. rev. franc. hématol.*, **12**, 871 (1972).
7. Warren M. C., In: *Biomembranes*, **1**, Ed. by L. A. Manson, 1971, p. 257.
8. Finean J. B., *Sub-Cell. Biochemistry*, **1**, 363 (1972).
9. Lehninger A. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **60**, 1069 (1968).
10. Боровягин В. Л., *Биофизика*, **16**, 746 (1971).
11. Dodge J. T., Mitchell G., Hanahan D. J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 119 (1963).
12. De Vore E. C., Holt S. L., Asplund P. O., Catalano A. W., *Arch. Biochem. Biophys.*, **146**, 658 (1971).
13. Dezsi I., Vertes A., Komor M., *Inorg. Nucl. Chem.*, **4**, 649 (1968).
14. Karvaly B., Badinka C. S., Keszthelyi L., Erdei L., In: *Abstracts of the 5th Intern. Conf. on Mössbauer Spectrometry, Bratislava 1973*, p. 55.
15. Буканова А. Е., Прокофьева И. В., Звягинцев О. Е., *Ж. неорганической химии*, **13**, 1865 (1968).

Институт физики  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
26/XII 1974