

# МЕТОДЫ

## ГАММА-РЕЗОНАНСНАЯ (МЁССБАУЭРОВСКАЯ) СПЕКТРОСКОПИЯ — МЕТОД УСТАНОВЛЕНИЯ СВЯЗИ “СТРУКТУРА-ФУНКЦИЯ” БИОКОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА

### GAMMA-RESONANS SPECTROSCOPY (MOSSBAUER SPECTROSCOPY) IS A METHOD TO DETERMINE THE STRUCTURE- FUNCTION INTERACTION IN IRON BIOCOMPLEXES

Н.И. Калетина<sup>1</sup>, Е.Ю. Афанасьева<sup>2</sup>  
N.I. Kaletina<sup>1</sup>, E.U. Afanasjeva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ММА им. И.М. Сеченова, кафедра токсикологической химии, Никитский бульвар, 13, Москва 119881 Россия.

<sup>1</sup>I.M. Sechenov Moscow Medical Academy, Department of Toxicological Chemistry, Nikitsky boul. 13, Moscow 119881 Russia.

<sup>2</sup>ММА им. И.М. Сеченова, клиника терапии и профессиональных заболеваний, ул. Россолимо, 11А, Москва 119021 Россия.

<sup>2</sup>I.M. Sechenov Moscow Medical Academy, Clinic of Therapy and Professional Diseases, Rossolimo Str. 11a, Moscow 119021 Russia.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ГРС, комплексы, клатраты, железо, токсичность, экология.

KEY WORDS: GRS, complexes, clutrates, Iron, toxicity, ecology.

**РЕЗЮМЕ:** Применение мёссбауэровской спектроскопии позволяет контролировать динамику процессов трансформации железосодержащих удобрений и исследовать миграционные процессы различных комплексов железа в почве. Мёссбауэровская спектроскопия растительного лекарственного сырья может быть использована как метод контроля за состоянием окружающей среды по загрязнению соединениями железа. Приведены мёссбауэровские данные по оценке проницаемости мембран микроорганизмов. Токсичность клатратов железа значительно выше токсичности их биоконплексов. Биологическая активность клатратов и комплексов железа с одинаковыми лигандами сопоставима.

**SUMMARY:** The Mossbauer spectroscopy enables one to check up the dynamics of transformation processes in an iron-containing fertilizer and to investigate the migration processes of different iron complexes in soil. Mossbauer spectroscopy of the medical raw plant materials can be used as an environment control method in compounds polluted with iron. Mossbauer's data for microorganisms membranes permeability estimation presented. Toxicity of the clutrates iron with bioligands is noticeably higher then toxicity of their complexes. Bioactivity of the clutrates and bioactivity of the complexes of Iron with the same ligands are comparable.

Около 1 млрд. человек на земле страдает железодефицитными состояниями различной тяжести (Brundtland, 2000). В то же время была установлена корреляция между повышенным содержанием железа в организме и ранним развитием атеросклероза, ишемической болезни, опухолей. К генерализованным формам сидерозов относятся наследственные вторичные гемохроматозы, финалом которых выступают гепатомы, рак поджелудочной железы, лимфомы. В нашей стране в последнее время рост числа заболеваний вторичным гемохроматозом связан с распространением алкоголизма и повсеместным употреблением пива в металлической упаковке, ростом числа гемотрансфузий (Кудрин, 2001). Известно о существовании гомеостатического баланса вне- и внутриклеточных микроэлементов (МЭ) в здоровом организме. Поддержание стабильного уровня внутриклеточного содержания МЭ является наиболее необходимым (Калетина, 1988; Nishimuta, 1990), поскольку процессы апоптоза, регенерации, митоза, выживаемости клеток связаны преимущественно с внутриклеточными превращениями. Дисбаланс МЭ может быть следствием неполноценного питания, социально-экономического неблагополучия, введения ряда лекарственных препаратов, а также природных условий геобиопровинций, в почвах и водах которых очень низкое или очень высо-

кое содержание тех или иных МЭ. Например, в России почвы Ярославской, Ивановской и сопредельных с ними северных областей крайне бедны железом, а почвы Курской, западной части Московской области весьма насыщены этим элементом.

Изучение механизма действия железа в биохимических превращениях активно продолжается. К настоящему времени идентифицированы IRE (iron response element) — «железо-отвечающие» элементы, регулирующие метаболизм железа, как в норме, так и при патологии. Эти структуры находятся в иРНК и регулируют трансляцию иРНК трансферринового рецептора на посттранскрипционном уровне. Когда внутриклеточная концентрация железа достаточно высокая, образуются комплексы Fe(II)–IBP (железо-связывающий белок), которые не соединяются с IRE, что дестабилизирует иРНК трансферринового рецептора. Снижение экспрессии рецепторов к трансферрину на клеточной поверхности ограничивает поступление железа (Ross, 1995; Oria, 1995). Постоянно растет число работ о влиянии различных факторов на содержание железа и, самое главное, на восстановление внутриклеточного баланса этого элемента в организме (Lauffer, 1992; Oberleas, 1997, 2000; Beattie, 1998; Калетина, 1991).

Экологическая обстановка, которая складывается из естественных и антропогенных факторов, обуславливает необходимость комплексного изучения элементного состава природных объектов в системе: человек — окружающая среда в различных биогеохимических провинциях. Лекарственные растения (ЛР) — важнейшие объекты экологического мониторинга железа. По нашим данным, среди более 100 исследуемых видов ЛР, железо содержится в весьма широком диапазоне. Будучи способным к активному комплексообразованию, железо может присутствовать в лекарственном сырье в виде различных комплексов с углеводами, алкалоидами, полифенолами и другими биологическими структурами. Однако значительная часть железа может находиться и в виде неорганических солей, имеющих иную активность по сравнению с биокомплексами. Высокий кларк и биогеохимическая активность железа позволяют рассматривать его в качестве гигиенического критерия состояния окружающей среды. При распределении в биосфере максимальное количество железа попадает в почву, где происходит трансформация исходных форм. Железо, поглощенное растениями, передается по трофическим цепям. Степень его утилизации определяется концентрацией и структурой железосодержащих соединений, что может служить биоиндикатором при проведении мониторинга за состоянием окружающей среды (Калетина, 1991). Достоверным является факт преимущественного поступления железа в растения (при корневом питании с возможностью сильного захвата элемента листьями) в виде ионной формы или транспорта через мембраны в виде комплексов с веществами-переносчиками — сидерофорами.

Сведения о структуре и трансформации железоорганических комплексов в почве (комплексов железа с гуминовыми и фульвокислотами) требуют уточнений, которые могут быть получены методом мессбауэровской спектроскопии (ГРС — гамма-резонансной спектроскопии). Этот метод является прямым методом определения электронного состояния железа и дает возможность рассматривать роль железа в структуре комплекса в зависимости от ближайшего лигандного окружения, значений pH среды, степени гидратации, а также определить, в какой форме — Fe(II), Fe(III), ионогенной или ковалентной — оно находится.

Совместно с В.Ф.Бабаниным и А.Г.Соломоновым (Ярославль) методом ГРС нами было установлено следующее. Конечным результатом фиксации железа в поверхностном почвенном слое при внесении железоудобрений в виде координационных соединений Fe(II)–ЭДТА и Fe(III)–ЭДТА являются прочные комплексы Fe(III) с гуминовыми кислотами тетраэдрической и октаэдрической формы. Высокая скорость образования малорастворимых железогуминовых комплексов предполагает быструю фиксацию ионных форм железа в поверхностном почвенном слое и уменьшение токсичности железосодержащих удобрений в случае их передозировки.

На индикаторные растения (*Calendula officinalis*) комплексы, содержащие Fe(II) и Fe(III), влияли по-разному. В вариантах с использованием максимальной дозы Fe(II)–ЭДТА наблюдали токсический эффект (перфорация, почернение листьев) и гибель части растений, в вариантах с такой же дозой Fe(III)–ЭДТА токсического эффекта и гибели растений не отмечали. Сохранение в среде высокой концентрации комплекса Fe(II)–ЭДТА, что связано с различием в константах образования комплексов Fe(II) и Fe(III) с гуминовыми кислотами, приводит к избыточному поступлению железа в растение. Комплекс Fe(II)–ЭДТА стабилен при pH 5–7 и обладает высокой проникающей способностью в растительные клетки. В случае комплекса Fe(III)–ЭДТА при увеличении pH выше 5 комплекс структурно перестраивается в клатрат (особая форма соединения металла с лигандом) и полимеризуется, что приводит к малому его поступлению в клетки из-за ограничений в проницаемости клеточных стенок.

Мессбауэровские спектры получали на установке NTA–1024 в режиме постоянных ускорений при комнатной температуре и температуре жидкого азота. Источником гамма-излучения являлся  $^{57}\text{Co}$  в матрице хрома. Обработку результатов вели на ЭВМ 666В методом наименьших квадратов в приближении к лоренцевой форме линии. Спектры почв получали для растертых в порошок навесок массой 500 мг, высушенных при  $105^{\circ}\text{C}$ . Растительные образцы прессовали в таблетки массой 1300 мг.

Мессбауэровские спектры растительных образцов представлены на рисунке 1, значения параметров сведены в таблицу 1.

Таблица 1. Параметры ГР спектров.

Характеристика образца	$\delta I \pm 0,02$ мм/с	$\Delta E_Q \pm 0,04$ мм/с	W, мм/с	S, отн. ед.
Контрольный образец, листья, масса 3,00 г, T=295°K	0,56 0,02	0,69 0,02	0,58 0,02	0,51
Контрольный образец, листья, масса 3,00 г, T=130°K	0,61	0,74	0,67	0,56
Образец 1, листья, Fe(II)-ЭДТА, 400 мг/л, T=295°K	0,55	0,69	0,59	0,46
Образец 2, листья, Fe(III)-ЭДТА, 400 мг/л, T=295°K	0,54	0,65	0,59	0,32
Образец 4, листья, Fe(III)-ЭДТА, 1600 мг/л, T=295°K	0,55	0,66	0,59	0,46
Образец 4, листья, Fe(III)-ЭДТА, 1600 мг/л, T=130°K	0,60	0,66	0,68	0,48
Образец 3, листья, Fe(II)-ЭДТА, 1600 мг/л, T=295°K	0,56	0,69	0,56	0,53
Образец 3, листья, Fe(II)-ЭДТА, 1600 мг/л, T=130°K	0,67 1,47	0,60 1,79	0,78	0,53 0,14

$\delta I$  — изомерный сдвиг, мм/с;  $\Delta E_Q$  — квадрупольное расщепление; W — ширина линии, мм/с; S — площадь спектра, отн. ед.

При нормальном во внешней среде уровне доступного для растений железа оно включается в состав железосерных белков (ферредоксин, цитохромы, ферритин). Наблюдаемые спектры представляют собой результат совместного вклада всех атомов железа, входящих в различные соединения. Спектры растительных образцов, кроме образца 3, представляют единственный дублет (рис. 1а, б, в). Его параметры, а также вероятность мёссбауэровского эффекта меняются очень незначительно в температурном диапазоне «жидкий азот — комнатная» и при сопоставлении с данными, приводимыми в работе (Суздаев, 1988), позволяют идентифицировать как дублет, принадлежащий ферритину. Средние величины квадрупольного расщепления ( $\Delta E_Q$ ) различных видов ферритина также равны 0,68 мм/с, уменьшение вероятности мёссбауэровского эффекта для лиофилизированного ферритина менее 10%. Таким образом, можно говорить об абсолютном преобладании ферритина в исследуемых образцах в сравнении с другими формами железа. Отсутствие изменений в спектрах экспериментальных образцов при росте уровня доступного для растений железа во внешней среде по сравнению с контрольными показывает накопление железа в растении в виде ферритина. Ферритин относится к соединениям с низкой усвояемостью организмом, поэтому представляется маловероятной возможность увеличения в лекарственном сырье доли «активного» железа путем подкормки растений удобрениями, содержащими железо. При температуре жидкого азота в спектре не проявляется секстет линий, характерный для магнитоупорядоченных соединений. Это позволяет оценить размер железосодержащих «ядер» ферритина менее 10 нм.

Наиболее интересен низкотемпературный ГР спектр листьев образца 3, где наблюдался токсический эффект (рис. 1г) отсутствие секстета линий в спектре — при высокой концентрации железа в листьях — показывает, что рост содержания железа происходит не за счет увеличения размеров железосодержащих «ядер», которое наблюдается у млекопитающих при трансформации ферритина в гемосидерин как результат деструкции ферритина. Полученный спектр свидетельствует о содержании в об-

содержащих «ядер», которое наблюдается у млекопитающих при трансформации ферритина в гемосидерин как результат деструкции ферритина. Полученный спектр свидетельствует о содержании в об-

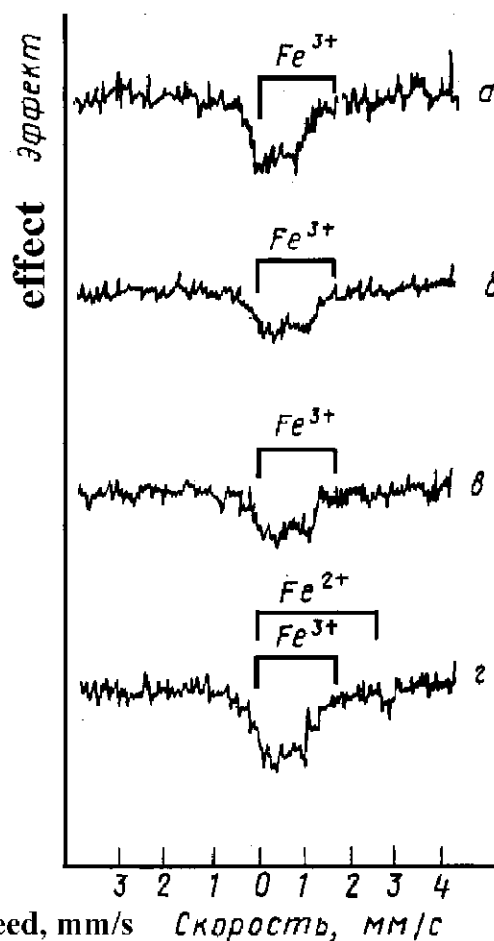


Рис. 1. ГР спектры образцов листьев *Calendula officinalis*. а — контроль, T=130°K; б — контроль, T=295°K; в — образец 4, T=130°K; г — образец 3, T=130°K.

разце как Fe(II), так и Fe(III), что проявляется наличием в ГР-спектре наряду с дублетом ферритина дублета с большим квадрупольным расщеплением. Наиболее вероятно его принадлежность к комплексным соединениям типа сидерофраксов, синтезируемых растениями для нейтрализации избытка поступающих Fe(II)-содержащих соединений. По-видимому, присутствие в спектре подобного дублета можно считать показателем существования токсического для растений уровня доступных соединений железа во внешней среде.

Определение содержания железа, а также форм, в виде которых оно присутствует в растениях, дает дополнительные сведения для метода контроля за состоянием окружающей среды по биоиндикаторам.

Исследования в области биокоординационных соединений свидетельствуют о принципиально иной возможности получения эффективных лекарственных средств с низкой токсичностью (Акбаров, 1990; Григорьева, 2000; Калетина, 1988, 1997, 2002).

Достигнутый в настоящее время уровень понимания роли металлов *in vivo* позволяет надеяться, что использование их биокоординационных соединений в медицине значительно расширится. В результате наших работ синтезирована большая группа биокоординационных соединений переходных металлов с N-гликозидами (глюкозидами, галактозидами, маннозидами, ксилозидами, рибозидами), сульфаниламидами. Комплексы Fe(III) с некоторыми сульфаниламидами и их N-гликозидами представляют интерес в качестве потенциальных лекарственных средств. Антибактериальная активность координационных соединений зависит не только от природы металла-комплексобразователя и свойств биоактивного лиганда, но и от структуры образовавшихся комплексов. Введение в молекулу N-глюкозидов сульфаниламидов (сульфалена, сульфадиметоксина, сульфацидазина, уросульфана, сульфгина, сульфацила) железа повысило их биологическую активность, но степень увеличения активности менялась в зависимости от типа координации металл-лиганд и структуры комплекса. При изучении строения комплексов использовали методы ИК, УФ, ПМР, ГР спектроскопии.

Гамма-резонансные измерения проводились на установке электродинамического типа с постоянным ускорением, источник  $^{60}\text{Co}$  в Сг. Поглотителями служили порошки исследованных комплексов. Значения изомерных сдвигов получены относительно нитропрусида натрия при  $T = 300^\circ\text{K}$ . ГР спектры обрабатывались на ЭВМ БЭСМ-6 по методу наименьших квадратов в предположении лоренцевой формы мессбауэровской линии. Интерпретацию ГР спектров комплексов Fe(III) с N-гликозидами сульфаниламидов (как и в случае ИК спектров) проводили при сравнении с данными ГРС комплексов железа с исходными сульфаниламидами.

Параметры ГР спектров при  $300^\circ\text{K}$  изученных соединений железа с различными сульфаниламидами и их N-гликозидами весьма близки друг к другу,

валентное состояние Fe(III) в процессе реакции не изменилось, что может свидетельствовать об одинаковом окружении атомов железа и одинаковой геометрии комплексов. Принимая во внимание существенные различия в строении исследованных веществ, а также большую чувствительность метода ГРС, трудно было объяснить полученную информацию. Однако при понижении температуры измерений было обнаружено, что комплексы дают ГР спектры, имеющие магнитную сверхтонкую структуру (СТС). Наличие внутренних магнитных полей на ядрах, проявляющееся в магнитной сверхтонкой структуре ГР спектров, связано с особенностями электронной структуры комплексных соединений. Внутренние поля на ядрах возникают в случае парамагнитных комплексов (в комплексах парамагнитным центром обычно является металл) за счет магнитного момента электронной оболочки, при этом магнитное взаимодействие ядерного и электронного магнитных моментов наиболее эффективно проявляется в ГР спектрах, если магнитный момент комплекса локализован на мессбауэровском атоме.

ГР спектры изученных соединений (рис. 2) представляют собой дублеты с двумя системами магнитной сверхтонкой структуры в различном соотношении по интенсивности ( $H_{\text{эфф}} = 450 \text{ кэ}$  и  $400 \text{ кэ}$  при  $80^\circ\text{K}$ ). Наличие магнитной СТС в ГР спектрах может указывать на то, что исследуемые соединения являются не чистым продуктом, а смесью, причем одним из компонентов смеси могут быть частицы гидроокиси, покрытые свободными лигандами. Данные рентгенофазового анализа, которым были исследованы продукты взаимодействия  $\text{FeCl}_3$  с сульфаниламидами и их N-гликозидами отрицают наличие частиц гидроокиси железа.

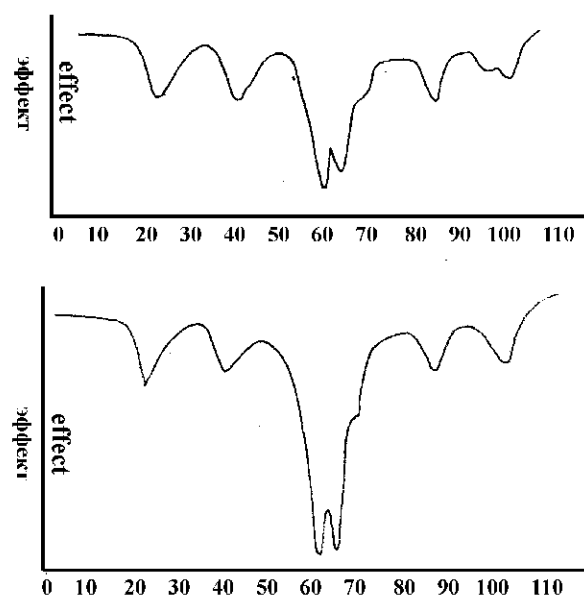


Рис. 2. ГР спектры комплексов  $\text{FeCl}_3$  с сульфаленом (а) и N-глюкозидом сульфалена (б).

Учитывая совокупность результатов исследования, полученных методами ИКС, ГРС и рентгенофазового анализа, можно считать, что продукты взаимодействия  $FeCl_3$  с рассматриваемыми биолигандами представляют собой неорганические полимерные структуры, в которые включены сульфаниламиды (или их N-гликозиды), удерживаемые силами межмолекулярного взаимодействия, т.е. клатраты.

Однако при использовании унифицированной методики синтеза комплексов  $Fe(III)$  с однотипными структурами — N-D-глюкозидами сульфаниламидов, отличающимися заместителями в агликонной части, комплексообразование шло по-разному. Продукты взаимодействия  $FeCl_3$  с сульфацилом, сульгином, уросульфаном и их N-гликозидами по данным ИКС являются истинными комплексами, координация металл-лиганд, в которых осуществляется через атом азота ароматической аминогруппы (для сульфаниламидов), через атом кислорода группы  $>C=O$  или атом азота гуанидинового остатка (для N-гликозидов). Чувствительность и информативность метода ГРС позволили представить структуру этих соединений как октаэдрических высокоспиновых комплексов  $Fe(III)$ , метод ИКС дал возможность определить способ координации изучаемых соединений.

При рассмотрении вопроса о зависимости биологического действия комплексов N-гликозидов сульфаниламидов с переходными металлами от их строения следует учитывать влияние углеводного компонента лиганда, природу центрального атома, структуру комплекса, устойчивость образуемых комплексов.

Усиление бактериостатической активности сульфаниламидов (~100% по показателю выживаемости животных) при N-гликозилировании и взаимодействии с металлами есть результат суммарного действия углеводного остатка и введенного металла с преимущественным влиянием углеводного фрагмента на усиление антимикробного действия по сравнению с введением металла в молекулу сульфаниламид. Антимикробная активность продуктов взаимодействия солей металлов  $Fe(III)$ ,  $Co(II)$ ,  $Si(II)$ ,  $Zn(II)$  с N-глюкозидами сульфаниламидов возрастает по сравнению с N-глюкозидами тех же сульфаниламидов. Например, суммарная продолжительность жизни животных при лечении комплексами солей металлов с N-глюкозидом сульфалена в дозе 50 мг/кг составляет в среднем 96%, такой же процент выживаемости животных достигается при лечении N-глюкозидом сульфалена в дозе 80 мг/кг, а свободным сульфаленом — в дозе 500 мг/кг. Обсуждаемые результаты статистически достоверны. Другой пример: образование комплексов железа с сульгином не изменяет спектра фармакологического действия сульгина, N-глюкозилированный сульгин имеет определенный антимикробный эффект при пневмококковой инфекции, усиливающийся при использовании комплексов железа с N-глюкозидом сульгина (69% по показателю выживаемости животных).

Некоторое различие биологической активности (по показателю выживаемости животных) при одинаковой дозе введения препаратов наблюдается в ряду исследованных соединений в зависимости от природы центрального атома. Большой процент выживаемости животных (при одинаковой дозе введенных соединений) характерен для производных цинка, кобальта, меди, чем для производных железа. Однако возможно, что это связано не только с природой металла-комплексообразователя, но и со структурой образуемых соединений — комплексов или клатратов.

Введение металла в N-гликозиды сульфаниламидов привело к новому свойству сульфаниламидов и их N-гликозидов к способности противодействовать гиперплазии тиреоидной паренхимы, т.е. к снятию струмогенного эффекта, которым, как нежелательным побочным действием, обладают все сульфаниламиды и, в меньшей степени, их N-гликозиды (Калетина, 1988).

Одна из причин токсического действия сульфаниламидов связана с наличием ароматической аминогруппы, склонной к комплексообразованию с металлами ферментных систем клетки, например, с активным центром карбоангидразы. По-видимому, чем прочнее связь в комплексе металл-сульфаниламид, образующемся *in vivo*, тем больше повреждающее действие можно ожидать от сульфаниламида. По нашим данным, введение в молекулу сульфаниламида углеводного остатка значительно уменьшало токсичность сульфаниламидов, а последующее комплексообразование с металлами снижало токсичность исходных лигандов еще больше. Вероятность образования комплекса металла со свободными сульфаниламидами, координированными через атом азота ароматической аминогруппы, выше, чем с N-гликозилированными, так как понижение основности сульфаниламида при N-гликозилировании ослабляет его свойства как биолиганда *in vivo*. Тем не менее, надо полагать, что такая возможность все-таки сохраняется для N-гликозидов, так как *in vitro* эти соединения комплексируются с металлами различными способами: через атомы азота гетероциклов, карбонильную группу и т. п. В связи с этим, встает вопрос о сравнительной оценке прочности связей между лигандами — свободными и гликозилированными сульфаниламидами — и металлами. По теории ЖМКО трехвалентное железо относится к жестким кислотам, а двухвалентные железо, цинк, кобальт и медь занимают промежуточное положение. Согласно порядку изменения устойчивости в ряду биометаллов, железо двухвалентное образует, с аналогичными лигандами менее прочные комплексы, чем трехвалентное. С другой стороны, ароматические амины, к которым можно отнести сульфаниламиды, занимают промежуточное положение по шкале ЖМКО среди оснований. N-гликозилирование сульфаниламидов перемещает их положение в сторону «мягких» оснований. Следовательно, в случае комплексообразования как с трехвалентным

железом, так и с двухвалентным, получающиеся комплексы металлов с сульфаниламидами будут обладать сравнительно большей прочностью, чем с N-гликозилированными аналогично пиримидиновым основаниям и нуклеозидам, в которых введение остатка рибозы ослабляет способность к комплексообразованию с металлами (например, лабильные полинуклеотидные комплексы в структуре ДНК). По всей вероятности, наличие именно закомплексованного металла (а не в виде клатрата), а также и способ координации металла с биолигандами играет важную роль в снижении токсических свойств сульфаниамидов. Сопоставим эти рассуждения с полученными экспериментальными данными по изучению сравнительной токсичности сульфаниамидов и их N-гликозидов, комплексов и клатратов переходных металлов со свободными и N-гликозилированными сульфаниламидами.

Токсичность клатратных соединений сульфаниамидов и их N-гликозидов с металлами практически не изменяется по сравнению со свободными сульфаниламидами или их N-гликозидами, но N-гликозилирование значительно снижает токсические свойства сульфаниамидов. По-видимому, клатратные соединения металлов как с сульфаниламидами, так и с их N-гликозидами при поступлении в организм быстро распадаются, и возможность координировать металлы *in vivo* у исходных лигандов сохраняется, следовательно, токсичность не меняется.

Образование комплексов металлов с N-гликозидами сульфаниамидов приводит к получению практически нетоксичных соединений.

Установлена закономерность усиления антимикробного действия и снижения токсических свойств изученных соединений в зависимости от их структуры в ряду: комплексы солей металлов с N-гликозидами сульфаниамидов > N-гликозиды сульфаниамидов > комплексы солей металлов с сульфаниламидами > сульфаниамиды. Наибольшее снижение токсичности сульфаниамидов достигалось N-гликозилированием и последующим комплексообразованием с металлами при координации биолигандов через атом азота гетероцикла. Именно *такая* структура соединения, по нашим данным, обеспечивала и наибольшую антимикробную активность. Совокупность результатов исследования, полученных методами автордиографии, электронной микроскопии, гистохимии, с одной стороны, и ГР, ИК, ПМР спектроскопии, рентгено-флуоресцентного анализа, с другой стороны, позволили утверждать следующее. Уменьшение токсичности сульфаниамида при N-гликозилировании обусловлено снижением его основности, приводящим к подавлению способности остатка сульфаниамида выступать в качестве биолиганда *in vivo* и тем самым к уменьшению возможности вызывать дисбаланс микроэлементов клетки.

Установленные факты могут служить обоснованием предлагаемого нами пути повышения эффективности биологически активных соединений на основе гликозилирования и комплексообразования

с металлами, а также подтверждением механизма снижения токсичности сульфаниамидов и других лекарственных средств, содержащих аминогруппы, при N-гликозилировании.

Полученные данные позволяют предложить новый прием для повышения эффективности лекарственных средств, который технически прост и не требует существенных экономических затрат на производстве. Однако для успешного и целенаправленного получения такого типа препаратов (например, лекарственных средств для лечения и профилактики гнойно-воспалительных процессов) надо установить закономерности в изменении микроэлементного состава крови, пораженных органов и тканей при конкретной патологии. Сведения об изменении микроэлементного статуса организма при патологических состояниях исключительно важны, но до настоящего времени разрознены и еще мало доступны для практической медицины.

Уникальные возможности метода мессбауэровской спектроскопии были использованы нами в следующих направлениях: при изучении строения биок комплексов железа в качестве потенциальных лекарственных средств, при изучении биотрансформации комплексов железа и механизма их токсического действия в растениях, для определения чистоты лекарственных средств, которые могут содержать железо в виде примеси.

Для фармацевтического анализа важно селективное определение различных форм железа в лекарственных препаратах, растительном сырье и полученных из него лекарственных формах (Калетина, 1995).

Экспериментальные результаты по мессбауэровской спектроскопии модельных систем комплексов железа с лекарственными препаратами и другими биоактивными лигандами показали возможность выявления корреляции между физиологическим действием комплексов и изменением электронной структуры их центрального атома.

Получены комплексы Fe(III) с производными 5-нитрофурана (I), 5-нитроимидазола (II), адамантана (III). Синтезированные соединения охарактеризованы данными элементного, рентгено-флуоресцентного, термического анализа, атомно-абсорбционной, инфракрасной, ультрафиолетовой и мессбауэровской спектроскопии. Установлены состав и строение комплексов Fe(III). Гамма-резонансные измерения проводили на установке электродинамического типа с постоянным ускорением; источник  $^{60}\text{Co}$  в матрице хрома. Поглотителями служили порошки исследуемых комплексов с  $\text{FeCl}_3$ . Значения изомерных сдвигов приведены относительно нитропруссиды натрия.

Замороженные растворы образцов в диметилформамиде готовили впрыскиванием диметилформамидного раствора образца в жидкий азот, чтобы избежать кристаллизации соединений из раствора. ГР спектры полученных комплексов отличаются от спектра исходного хлорного железа. Параметры ГР спектров для I и II характерны для октаэдрических

высокоспиновых комплексов Fe(III). ГР спектры замороженных растворов комплексов в диметилформамиде не отличаются в пределах ошибки от ГР спектров этих же образцов в твердом состоянии. Это указывает на отсутствие межмолекулярной координации и на вхождение хлорид-ионов в первую координационную сферу как в твердом состоянии, так и в замороженных растворах. Образование координационных связей железа с (I) и (II) происходит через атомы азота имидазольного кольца (II) и гидантоиновой группировки (I). Образование комплекса железа с (III) обеспечивает мало искаженную структуру октаэдрического высокоспинового комплекса:  $\delta I = 0,86 \pm 0,02$  мм/с;  $\Delta E_Q = 0,93 \pm 0,04$  мм/с. Большая величина квадрупольного расщепления комплекса Fe(III) с (I) указывает на резко асимметричную структуру центрального узла:  $\delta I = 0,67 \pm 0,02$  мм/с;  $\Delta E_Q = 2,34 \pm 0,04$  мм/с. Столь высокая величина квадрупольного расщепления характерна для плоских комплексов Fe(III). По-видимому, комплексы Fe(III) с (I) образуют искаженные (вытянутые) октаэдры.

При изучении токсичности полученных комплексов Fe(III) было установлено, что наименее искаженная структура октаэдрического высокоспинового комплекса имеет меньшую токсичность.

Для комплексов Fe(II) и Fe (III) с производным адамантана зарегистрирована низкая вероятность эффекта Мессбауэра, несмотря на достаточное большое содержание железа в комплексах (около 5%). Это обусловлено отсутствием жестких внутри- и межмолекулярных связей, высокой внутримолекулярной подвижностью иона железа. Бактерицидное действие комплексов производного адамантана связано с избирательным транспортом железа в микроорганизмы. Объектами исследования были выбраны микроорганизмы с различным систематическим положением, отличающиеся строением клеточных структур: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* (грамотрицательные), *Bacillus polymyxa*, *Bacillus megaterium* (грамположительные), *Arthrobacter siderocapsulatus* (капсулообразующие). Железо вносили в среду в виде адамантанового комплекса Fe(II) и Fe(III), цитратного комплекса и в ионогенном состоянии (хлориды и сульфаты). После культивирования микробные клетки, отмытые в центрифуге физиологическим раствором, исследовали методом ГРС в виде влажной пасты и в высушенном состоянии при комнатной температуре и температуре жидкого азота. Спектры различных культур показывают отсутствие единого механизма железотрансформации микроорганизмами и максимальный эффект поглощения железа при внесении в среду комплексов производного адамантана. Известно о способностях живых организмов образовывать магнетит (оксид железа смешанной валентности). У бактерий магнетит находится в форме однородных по размерам одиночных магнитных доменов. На основе результатов, полученных с помощью просвечивающей электронной микроскопии высокого разреше-

ния, и данных ГРС была предложена рабочая модель (схема) образования магнетита в бактериальных клетках: комплексы Fe(II) и Fe(III) проходят через плазматическую мембрану, во внутренней водной среде происходит разрушение комплексов, восстановление Fe(III) до Fe(II), а в мембране магнитосомы вновь наблюдается образование соединений Fe(III), но уже в форме гидроксида, который трансформируется в магнетит. Стадия преобразования гидроксида Fe(III) в магнетит уникальна, в то время как начальные реакции этой схемы аналогичны образованию «ядра» из ферригидрата у железозапасающего белка ферритина. У микроорганизмов кристаллы магнетита расположены рядом с образованиями, имеющими аморфную структуру, это позволяет предположить, что в изучавшихся системах формирование кристаллов магнетита происходит в результате структурной модификации предшественников (оксида Fe(III)), а не вследствие непосредственной кристаллизации присутствующих в водном растворе ионов. Поскольку морфология кристалла определяется взаимодействием между структурой кристалла и его окружением, не исключено, что окончательное формирование этих кристаллов идет под контролем регуляторных систем, а не путем пассивной кристаллизации. Большое влияние на зарождение и рост бактериального магнетита имеют химические факторы. Известно, что небольшие изменения концентрации анионов в реакционной среде сильно влияют на реакцию образования магнетита *in vitro*, следовательно, должны существовать системы контроля за концентрациями и “посторонних” ионов компартмента с кристаллами магнетита, окруженных оболочкой. Явление биоманетизма свойственно многим живым объектам — от бактерий до человека. Тем не менее, ещё очень много неясного в функциях и механизмах действия магнетита, его биосинтеза, локализации и утилизации. Возможно, образующийся значительный избыток магнетита в микробной клетке при поглощении комплексов железа с производным адамантана приводит к её гибели.

Обсуждаемые в статье биокоординационные соединения синтезированы нами и защищены патентами РФ как биоактивные и нетоксичные вещества.

## Литература

- Акбаров А.Б., Харитонов Ю.Я. 1990. Бионеорганическая химия металлов, аминокислот и биоконплексов. Ташкент: изд-во ФАН. 325 с.
- Григорьева А.С. 2001. Оптимизация фармакотерапевтической активности биометаллов при комплексообразовании с НПВС // Микроэлементы в медицине. Т.2. Вып.1 С.17–22.
- Калетина Н. И., Соломонов А. Г., Глебова И.Н. 1991. Исследование состояния железа в растительном лекарственном сырье и синтетических биоконплексах методом мессбауэровской спектроскопии // Биологические науки. Биофизика. №12. С.37–45.

- Калетина Н.И. 1988. N-гликозиламины и микроэлементы. Ереван: изд-во АН Арм. ССР. 160 с.
- Калетина Н.И., Арзамасцев Е.В., Афанасьева Е.Ю. 2002. Биокомплексы микроэлементов — регуляторы металл-лигандного гомеостаза // Микроэлементы в медицине. Т.3. Вып.1. С.8–14.
- Калетина Н.И., Рубинов Г.Е., Кокорникова О.Ф. 1997. Антимикробная и противотрихомонадная активность новых лекарственных средств из группы 5-нитроимидазола // Эпидемиология инфекционные болезни. М.: Медицина. № 3 С.23–33.
- Кудрин А.В., Скальный А.В., Жаворонков А.А., Скальная М.Г., Громова О.А. 2001. Иммунофармакология микроэлементов. М.: изд-во КМК. 537 с.
- Суздаев И.П. 1988. Гамма-резонансная спектроскопия белков и модельных соединений. М.: Наука. 262 с.
- Beattie J.H. 1998. Roles of metallothionein in cellular metabolism // Metal Ions in Biology and Medicine / Ph.Collery et al. (eds.). Paris. Vol.5. P.117–127.
- Brundtland G.H. 2000. Nutrition and Infection: Malnutrition and mortality in public health // Nutr. Revs. Vol.58. No.2. P.51–54.
- Iron and human disease. 1992. / R.V.Lauffer (ed.). Boca Raton: CRC Press. 534 pp.
- Kaletina N.I., Irkaev S.M., Babanin V.F. 1995. Mossbauer spectrometry and quality control of medicine // 14<sup>th</sup> Conference of the Biomedical Engineering Society. Delhi, 15–18.02. P.7–11.
- Nishimuta M. 1990. The concept intra and extra cellular // Metal Ions in Biology and Medicine / Ph.Collery et al. (eds). Paris. Vol.2. P.69–74.
- Oberleas D. 2000. Ferrous and ferric ions with phytate in vitro // Metal Ions in Biology and Medicine / Ph.Collery et al. (eds). Paris. Vol.6. P.558–560.
- Oria R., Sanchez L. 1995. Effect of nitric oxide on cellular iron metabolism in K562 human erythroleukemia cells // Blood. Vol.85. No.10. P.2962–2966.
- Ross J. 1995. mRNA stability in mammalian cells // Microbiol. Rev. Vol.59. No.3. P.423–450.