

## КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ИОНОВ ЖЕЛЕЗА С ГРИБНЫМИ МЕЛАНИНАМИ

Багиров Р.М., Боброва Е.Ю., Гафарова Х.О., Багирова О.Ш.

Бакинский государственный университет

Ул. З. Халилова, 23, г. Баку, AZ1148, Азербайджан; e-mail: rafiqbagirov@list.ru

Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0554

**Аннотация.** В работе приводятся и обсуждаются результаты экспериментальных исследований комплексообразования ионов железа с меланинами, выделенными из чаги бука лесного (*faqus sylvatica*) и из чаги березы (*betula*), которые проявляют высокую антиоксидантную активность. Меланины выделены методом щелочной экстракции и осаждением в кислой среде. Для идентификации выделенных пигментов зарегистрировали их ИК- и ЭПР-спектры. Комплексообразование ионов железа с данными меланинами изучено методом гамма – резонансной спектроскопии (ГРС). Установлено, что грибные меланины способны эффективно связывать ионы железа как в его двух, так и в трех – валентном состоянии. Существенно, что грибные меланины, подобно меланинам животного и растительного происхождения, способны непосредственно связывать прооксидантные ионы  $Fe^{2+}$  и окислять их до  $Fe^{3+}$  неактивного в прооксидантном отношении с последующим комплексообразованием. Активность этих процессов растет по мере увеличения рН реакционной среды и освещении суспензии видимым светом.

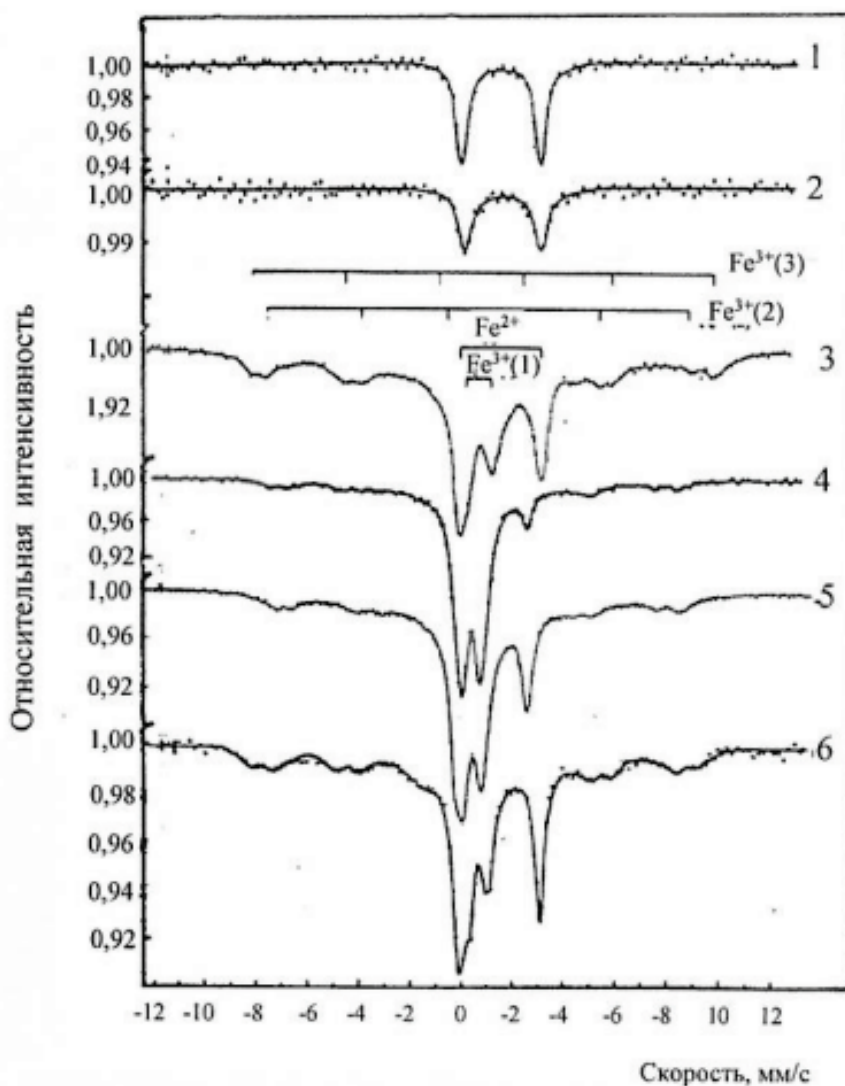
**Ключевые слова:** меланин, чага, комплексообразование с ионами железа, гамма – резонансная спектроскопия.

В наших ранних работах было изучено комплексообразование прооксидантных ионов  $Fe^{2+}$  с синтетическим L-ДОФА-меланином, с меланинами животного и растительного происхождения [1-3]. Пигменты меланинового ряда играют важную роль и в микробном мире, где их функции связаны, главным образом, с защитой клеток от различных повреждающих факторов внешней среды и, в первую очередь, солнечной радиации. Как и в случае меланинов животного и растительного происхождения, защитное действие меланиновых пигментов грибного происхождения связано как с пассивным экранированием от солнечной радиации, так и с активным подавлением фотоиндуцированного перекисного окисления липидов. Как было показано нами, в случае меланинов животного и растительного происхождения подавление ими процесса перекисного окисления липидов связано, в первую очередь, со связыванием ионов  $Fe^{2+}$ , являющихся катализаторами перекисного окисления липидов [4]. Можно полагать, что этот механизм является существенным и в случае пигментов грибного происхождения.

В представленной работе приводятся и обсуждаются результаты экспериментальных исследований комплексообразования ионов железа с меланинами, выделенными из чаги бука лесного (*faqus sylvatica*) и из чаги березы (*betula*) которые проявляют высокую антиоксидантную активность. Меланины из чаги бука лесного (ГМ 1) и из чаги березы (ГМ 2) выделяли по методике, приведенной в работе [5] с небольшой модификацией. Комплексы ионов железа с меланинами получали инкубированием свежесыведенного меланина (18 мг сухого веса) в 10 мл  $^{57}Fe SO_4$  концентрацией  $c = 0,2$  мг/мл при комнатной температуре по ранее описанной методике [5]. Время инкубирования варьировали от 5 мин. до 2-х часов. Освещение суспензии проводили лампой накаливания (КГМ 24) с использованием водяного фильтра. Освещенность поверхности составляла  $7 \cdot 10^4$  лк. Во избежание окисления ионов  $Fe^{2+}$  в слабокислой среде в исходный раствор добавляли гидроксилламин  $((NH_2 OH)_2 H_2SO_4)$ , сильно препятствующего агента образования окислов или гидроокислов железа. Предварительные опыты показали, что гидроксилламин не восстанавливает меланин. ГР – спектры изученных образцов регистрировали на установке, работающей в режиме постоянных ускорений. Источником резонансных гамма – квантов служил изотоп  $^{57}Co$  в матрице Сг. Спектрометр откалибровали по ГР – спектрам  $\alpha$ -Fe при комнатной температуре.

С целью идентификации полученных пигментов, регистрировали их ИК – и ЭПР – спектры. Анализ параметров ИК – и ЭПР – спектров показал, что они хорошо согласуются с имеющимися в литературе аналогичными данными [5]. Это дает основание полагать, что выделенные нами пигменты являются меланинами.

ГР – спектры изученных образцов при температуре 80 К, представлены на рисунке 1. В таблице 1 приведены параметры их ГР – спектров, а распределение ионов железа по формам в изученных системах в предположении равенства  $f'$  при 80 К представлены в таблице 2. Исходный раствор ( $^{57}Fe SO_4$ ) и супернатанты имеют аналогичные ГР – спектры, представляющие собой четкий дублет с параметрами, характерными для аквакомплексов высокоспиновых (ВС) ионов  $Fe^{2+}$ . ГР – спектры осадков (комплексов), идентичны по формам. Это сложный ГР – спектр, состоящий, по крайней мере, из четырех парциальных спектров: двух дублетов и двух секстетов с уширенными линиями релаксационной природы. Более интенсивный широкий дублет, доля которого составляет 11–34% от общей площади спектра в зависимости от типа меланинов, характерен для ВС комплексов  $Fe^{2+}$ . Отличие их параметров, главным образом  $\Delta E_Q$ , от параметров ГР -спектров исходного раствора указывает на связывание ионов  $Fe^{2+}$  грибными меланинами. Центральный узкий дублет по величине параметров характерен для парамагнитных ВС комплексов  $Fe^{3+}$ . Величины параметров секстетных парциальных спектров также характерны для ВС комплексов ионов  $Fe^{3+}$ .



**Рисунок 1.** ГР – спектры излученных образцов (pH 5,7) при 80 К. 1 – исходный раствор  $^{57}\text{Fe SO}_4$ , 2 – Супернатант после осаждения, 3 – комплекс  $^{57}\text{Fe SO}_4^+$ . L – ДОФА-меланин, 4 –  $^{57}\text{Fe SO}_4$  + МПП, 5 –  $^{57}\text{Fe SO}_4$  + ГМ1, 6 –  $^{57}\text{Fe SO}_4$  + ГМ2. МПП – меланопротеиновая гранула пигментной эпителии глаза

Как уже отмечалось, для дополнительного исключения возможного образования высокодисперсных окислов или гидроокислов  $\text{Fe}^{3+}$ , которые тоже могли бы дать размытый секстетный ГР – спектр, в исходный раствор добавляли гидросиламин. Отмывка осадков (комплексов) и полученных в идентичных условиях окислов и гидроокислов ионов  $\text{Fe}^{3+}$  в растворе  $\text{H}_2\text{SO}_4$  показала, что окислы и гидроокислы  $\text{Fe}^{3+}$  хорошо растворяются в  $\text{H}_2\text{SO}_4$  при pH 2,5, в то время, как ионы  $\text{Fe}^{3+}$  в осадке не отмываются даже при значении pH 1,7. Наконец, сравнение параметров ГР – спектров осадков и образцов из высокодисперсных частиц окислов и гидроокислов ионов  $\text{Fe}^{3+}$  (суперпарамагнетизм) показало, что они достаточно отличаются [6,7]. Это позволяет полагать, что наблюдаемые секстетные парциальные спектры действительно относятся к комплексу ионов железа с грибными меланинами. Таким образом, грибные меланины подобно синтетическому L – ДОФА – меланину и меланинам животного и растительного происхождения способны образовывать комплексы с ионами железа как в двух, так и в трехвалентном состоянии. Причем, при взаимодействии с ионами  $\text{Fe}^{2+}$  грибные меланины частично окисляют их до  $\text{Fe}^{3+}$  с последующим комплексованием  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$ . Величины параметров всех парциальных ГР – спектров указывают на октаэдрическое лигандное окружение ионов  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  в комплексе  $^{57}\text{Fe SO}_4^+$  грибные меланины. Другими словами, в изученных комплексах меланины выступают как лиганды слабого поля.

Связывание ионов железа грибными меланинами, как и в случае синтетических меланинов, а также меланинов животного и растительного происхождения происходит, в основном, за первые 5 мин. инкубации. При дальнейшем инкубировании доля связанных ионов железа с грибными меланинами увеличивается незначительно.

Освещение суспензии видимым светом привело к незначительному дополнительному связыванию ионов железа. Сравнительный анализ параметров ГР – спектров изученных образцов, полученных в темноте и на свету, показал, что они почти одинаковы. Следовательно, можно полагать, что освещение суспензии видимым светом не приводит к сколь-нибудь существенному изменению способа координации ионов железа с меланинами и

искажению хелатного узла. Также следует отметить, что параметры парциальных ГР – спектров в комплексе ионов железа с грибными меланином ГМ1 и ГМ2 заметно не отличается. Однако существенные различия обнаружены в способностях к связыванию ионов железа и соотношениях различных форм комплексов железа в образцах (табл. 2). ГМ2 по сравнению с ГМ1 в меньшей степени связывает ионов железа, а также в меньшей степени окисляет Fe до Fe<sup>3+</sup>.

**Таблица 1.** Параметры ГР – спектров замороженных растворов изученных образцов при температуре 80 К. (А – исходный раствор, В – супернатант после осаждения, С – комплекс (осадок))

№	образец	Fe <sup>2+</sup>		Fe <sup>3+(1)</sup>		Fe <sup>3+(2)</sup>			Fe <sup>3+(3)</sup>		
		$\delta I$ , мм/с	$\Delta E_Q$ , мм/с	$\delta I$ , мм/с	$\Delta E_Q$ , мм/с	$\delta I$ , мм/с	$\Delta E_Q$ , мм/с	$V_{ef}$ , Г/с	$\delta I$ , мм/с	$\Delta E_Q$ , мм/с	$V_{ef}$ , Г/с
<sup>57</sup> FeSO <sub>4</sub> + L – ДОФА – меланин, pH 5, 6											
1	A	1,27	3,38	-	-	-	-	-	-	-	-
2	B	1,29	3,39	-	-	-	-	-	-	-	-
3	C	1,34	3,14	0,54	0,82	0,68	0,19	50,0	0,53	0,38	54,8
<sup>57</sup> FeSO <sub>4</sub> + МПГ, pH 5, 8											
4	A	1,30	3,40	-	-	-	-	-	-	-	-
5	B	1,33	3,41	-	-	-	-	-	-	-	-
6	C	1,32	3,09	0,51	0,83	0,68	0,21	50,1	0,51	0,36	55,0
<sup>57</sup> FeSO <sub>4</sub> + ГМ 1, pH 5, 7											
7	A	1,29	3,39	-	-	-	-	-	-	-	-
8	B	1,27	3,35	-	-	-	-	-	-	-	-
9	C	1,31	3,11	0,50	0,88	0,65	0,22	50,7	0,53	0,34	55,1
<sup>57</sup> FeSO <sub>4</sub> + ГМ 2, pH 5, 7											
10	A	1,29	3,39	-	-	-	-	-	-	-	-
11	B	1,26	3,33	-	-	-	-	-	-	-	-
12	C	1,32	3,08	0,52	0,86	0,64	0,24	50,2	0,52	0,32	55,4

\*МПГ – меланопротеиновые гранулы пигментного эпителия глаза быка

**Таблица 2.** Распределение железа по формам в изученных системах по данным ГРС (А – исходный раствор <sup>57</sup>Fe SO<sub>4</sub>; В – <sup>57</sup>Fe SO<sub>4</sub> + L – ДОФА – меланин, pH 5,6; С – <sup>57</sup>FeSO<sub>4</sub> + МПГ, pH 5,8; D – <sup>57</sup>FeSO<sub>4</sub> + ГМ 1, pH 5,7; E – <sup>57</sup>FeSO<sub>4</sub> + ГМ 2, pH 5,7)

№	образец	В системе			В растворе			В осадке				
		$\sum Fe$	$\sum Fe^{2+}$	$\sum Fe^{3+}$	$\sum Fe$	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	$\sum Fe$	Fe <sup>2+</sup>	$\sum Fe^{3+}$	Fe <sup>3+</sup> (II)	Fe <sup>3+</sup> (M)
<b>В темноте</b>												
1	A	1,00	0,99	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
2	B	1,00	0,52	0,48	0,52	0,51	0,01	0,48	0,16	0,32	0,10	0,22
3	C	1,00	0,55	0,45	0,50	0,49	0,01	0,50	0,06	0,44	0,26	0,18
4	D	1,00	0,57	0,43	0,40	0,39	0,01	0,60	0,18	0,42	0,13	0,29
5	E	1,00	0,58	0,42	0,41	0,40	0,01	0,59	0,18	0,41	0,08	0,33
<b>При освещении</b>												
6	A	1,00	0,99	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	B	1,00	0,53	0,47	0,39	0,38	0,01	0,61	0,15	0,46	0,22	0,24
8	C	1,00	0,53	0,47	0,43	0,42	0,01	0,57	0,09	0,45	0,12	0,31
9	D	1,00	0,54	0,46	0,38	0,37	0,01	0,62	0,17	0,45	0,13	0,32
10	E	1,00	0,55	0,45	0,39	0,38	1,01	0,61	0,17	0,44	0,09	0,35

Как известно, грибные меланины подобно меланинам животного и растительного происхождения являются сложным полимерным образованием, состоящим из мономерных единиц различной структуры. Они содержат в своем составе орто – хиноидные, орто – гидрохиноидные группы, amino- и имино-группы, а также карбоксильные – и карбонильные – группы, каждая из которых может участвовать в связывании ионов железа полимером [8].

Одновременное присутствие магнитной и дублетной парциальных ГР-спектров в образце, по-видимому, связано с неоднородным распределением железосвязывающих центров в полимере меланина. Для двух или более близкорасположенных ионов  $Fe^{3+}$  (например, они могут входить в состав полиядерных ( $n \geq 2$ ) кластеров), благодаря быстрой релаксации, обусловленной эффективным спин-спиновым взаимодействием, будут наблюдаться дублетные парциальные ГР-спектры. В случае достаточно разделенных в пространстве ионов  $Fe^{3+}$  спин-спиновое взаимодействие сильно ослабится, и для таких структур будут наблюдаться релаксационные ГР-спектры с размытой сверхтонкой структурой. Секстет с эффективным магнитным полем  $\sim 55$  Тл, по-видимому, соответствует ионам  $Fe^{3+}$  связанным с карбоксильными группами. Секстет с меньшим полем ( $\sim 50$  Тл) соответствует структурам, где в координации  $Fe^{3+}$ , наряду с  $COO^-$  группами полимера участвуют также amino- или имино-группы меланина.

Исходя из полученных данных, можно полагать, что все эти меланины содержат в своем составе аналогичные функциональные группы по отношению к связыванию ионов железа. Наблюдаемые отличия в ГР – спектрах комплексов ионов железа с этими лигандами, по – видимому, связаны со структурными особенностями меланинов. Так как в молекулах меланинов животного происхождения преобладают обычно индольные мономерные единицы, а в молекулах меланинов растительного и грибного происхождения – пирокатехиновые [9].

Таким образом, из полученных результатов следует, что грибные меланины способны эффективно связывать ионы железа как в его двух-, так и трехвалентном состоянии. Существенно, что грибные меланины подобно меланинам животного и растительного происхождения способны непосредственно связывать прооксидантные ионы  $Fe^{2+}$  и окислять их до  $Fe^{3+}$  неактивного в прооксидантном отношении с последующим комплексообразованием. Активность обоих этих процессов растет по мере увеличения pH реакционной среды и освещении суспензии видимым светом

#### Список литературы / References:

1. Багиров Р. М., Багирова О. Ш., Турабова Г.А. Комплексообразование ионов железа с фитомеланинами. *Proc. International Conf. "Modern trends in physics"*, Baku, 2017, с. 84-86. [Bagirov R.M., Bagirova O.Sh., Turabova G.A. Complex formation of iron ions with fitomelanins. *Proc. International Conf. "Modern trends in physics"*, Baku, 2017, pp. 84-86. (In Russ.)]
2. Рамазанов М.А., Багиров Р.М., Багирова О.Ш., Турабова Г.А. Изучение методом гамма – резонансной спектроскопии(ГРС) связывания ионов железа с растительными меланинами. *Journal of Radiation Researches*, 2018, т. 6, № 2, с. 219-224. [Ramazanov M.A., Bagirov R.M., Bagirova O.Sh., Turabova G.A. Gamma – resonance spectroscopic (GRS) study of iron ions binding by vegetable melanins. *Journal of Radiation Researches*, 2018, vol. 6, no. 2, pp. 219-224. (In Russ.)]
3. Багиров Р.М., Боброва Е.Ю., Гафарова Х.О., Турабова Г.А., Багирова О.Ш. Связывание ионов железа с меланинами растительного происхождения. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2019, т. 4, № 2, с. 190-194. [Bagirov R.M., Bobrova E.Yu., Gafarova H.O., Turabova G.A., Bagirova O.Sh. The binding of iron ions with melanins of plant origin. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2019, vol. 4, no. 2, pp.190-194. (In Russ.)]
4. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. *Перекисное окисление липидов в биохимических мембранах*. М.: Наука, 1972. [Vladimirov Yu.A., Archakov A.I. *Lipid peroxidation in biochemical membranes*. М.: Nauka, 1972. (In Russ.)]
5. Грачева Н.В., Желтобрюхов В.Ф. Способ получения меланина из лузги подсолнечника и исследование его антиоксидантной активности. *Вестник Казанского технол. университета*, 2016, т. 19, № 15, с. 154-157. [Gracheva N.V., Zheltobryukhov V.F. Method of producing melanin from sunflower husk and the study of its antioxidant activity. *Vestnik of Kazan Technology University*, 2016, vol. 19, no. 15, pp. 154-157. (In Russ.)]
6. Фабричный П.Б., Похолок К.В. *Мессбауэровская спектроскопия и её применение для химической диагностики неорганических материалов*. М.: МГУ, 2012, 142 с. [Fabrichniy P.B., Pokholok K.V. *Mossbauer spectroscopy and its application for the chemical diagnosis of inorganic materials*. Moscow: MSU, 2012, 142 p. (In Russ.)]
7. Vertes A., Korecz L., Burger K. *Mossbauer spectroscopy*. Budapest: Akad. Kiado, 1979, 432 p.
8. Борщевская М.И., Васильева С.М. Развитие представлений о биохимии и фармакологии меланиновых пигментов. *Вопросы медицинской химии*, 1999, т. 45, № 1, с. 13-23. [Borschevskaya M.I., Vasilieva S.M. The development of ideas on biochemistry and pharmacology of melanin pigments. *Questions of Medical Chemistry*, 1999, vol. 45, no. 1, pp. 13-23. (In Russ.)]
9. Abbas M., Amico F.D., Morresi L. et al. Struktural, electrical and optical properties of melanin films. *European Physical Journal E*, 2009, vol. 28, no. 3, pp. 285-291.

## COMPLEX FORMATION OF IRON IONS WITH FUNGAL MELANINS

Bagirov R.M., Bobrova E.Yu., Gafarova H.O., Bagirova O.Sh.

Baku State University

Z. Khalilov str., 23, Baku, AZ1148, Azerbaijan; e-mail: rafiqbagirov@list.ru

Received 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0554

**Abstract.** The paper presents and discusses the results of experimental studies of the complex formation of iron ions with melanins isolated from forest beech chaga (*faqus sylvatica*) and birch chaga (*betula*), which exhibit high antioxidant activity. Melanins were isolated by alkaline extraction and precipitation in an acidic medium. To identify the isolated pigments, their IR and EPR spectra were recorded. The complex formation of iron ions with these melanins was studied by the method of gamma-resonance spectroscopy (GRS). It has been established that fungal melanins are able to effectively bind iron ions both in their two- and three-valence states. It is significant that fungal melanins, like melanins of animal and plant origin, are able to directly bind prooxidant  $Fe^{2+}$  ions and oxidize them to prooxidant inactive  $Fe^{3+}$  with subsequent complexation. The activity of these processes increases as the pH of the reaction medium increases and the suspension is illuminated with visible light.

**Key words:** melanin, chaga, complexation with iron ions, gamma-resonance spectroscopy.