

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД РЕГИСТРАЦИИ ХЛОРНОВАТИСТОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ПРОИЗВОДНЫХ В СУСПЕНЗИИ АКТИВИРОВАННЫХ НЕЙТРОФИЛОВ С ПОМОЩЬЮ ЦЕЛЕСТИНОВОГО СИНЕГО В

Луценко В.Е.¹, Григорьева Д.В.¹, Козлов С.О.², Горудко И.В.¹, Черенкевич С.Н.¹

Панасенко О.М.^{3,4}, Соколов А.В.^{2,3,5}

¹Белорусский государственный университет
просп. Независимости, 4, г. Минск, 220030, Республика Беларусь
e-mail: nika.lutsenko@tut.by

²ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»

Санкт-Петербург, Россия

³ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России
Москва, РФ

⁴ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет
имени Н.И. Пирогова Минздрава России
Москва, РФ

⁵Санкт-Петербургский государственный университет
Санкт-Петербург, РФ

Аннотация. Фермент азурофильных гранул нейтрофилов – миелопероксидаза (МПО), катализирующая образование гипохлоридных кислот, вовлечена в развитие многих заболеваний, среди которых сердечно-сосудистые, нейродегенеративные, онкологические и др. Актуальной является разработка современных методов обнаружения продуцируемых МПО активных форм галогенов в различных биологических жидкостях. В данной работе показана возможность использования красителя целестинового синего В для регистрации синтеза гипохлоридных кислот и их производных при активации нейтрофилов агонистами различной природы – фобол-12-миристан-13-ацетатом, N-формил-метионил-лейцил-фенилаланином, а также лектинами различной углеводной специфичности: из зародышей пшеницы (*Triticum vulgare* агглютинин), коры караганы древовидной *Caragana arborescens* агглютинин), коры бузины черной (*Sambucus nigra* агглютинин), сои (*Glycine hispida* агглютинин), канавалии (*Canavalia ensiformis* агглютинин) и семян фасоли (*Phaseolus vulgaris* агглютинин). Данный метод может быть использован при разработке подходов для контроля активности МПО и исследовании функционального состояния нейтрофилов.

Ключевые слова: целестиновый синий В, HOCl, миелопероксидаза, НАДФН-оксидаза, нейтрофилы, флуоресценция.

FLUORESCENT METHOD REGISTRATION OF HYPOCHLOROUS ACID AND ITS DERIVATIVES IN THE SUSPENSION OF ACTIVATED NEUTROPHILS BY THE CELESTINE BLUE B

Lutsenko V.E.¹, Grigorieva D.V.¹, Kozlov S.O.², Gorudko I.V.¹, Cherenkevich S.N.¹,

Panasenko O.M.^{3,4}, Sokolov A.V.^{2,3,5}

¹Belarusian State University
Ave. Nezavisimosti, 4, Minsk, 220030, Republic of Belarus
e-mail: nika.lutsenko@tut.by

²Research Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia

³Scientific Research Institute of Physical-Chemical Medicine
Moscow, Russia

⁴Pirogov Russian National Research Medical University
Moscow, Russia

⁵Saint Petersburg State University
Saint-Petersburg, Russia

Abstract. Myeloperoxidase (MPO), which catalyzes the formation of hypochlorous acids, being the enzyme of azurophilic granules of neutrophils is involved in the development of many diseases including cardiovascular, neurodegenerative, oncological etc. Therefore, the development of modern methods for detecting the active forms of halogens catalyzed by MPO in various biological fluids is topical. In this work the possibility of using dye celestine blue B for registration of hypochlorous acids and their derivatives during activation of neutrophils by agonists of different nature, such as phorbol-12-myristate-13-acetate, N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, as well as plant lectins of different carbohydrate specificity: wheat germ lectin (*Triticum vulgare* agglutinin), lectin from the bark of the caragana tree (*Caragana arborescens* agglutinin), lectin from the bark of the black elderberry (*Sambucus nigra* agglutinin), soybean lectin (*Glycine hispida* agglutinin), concanavalin A (*Canavalia ensiformis* agglutinin) and lectin from seed beans (*Phaseolus vulgaris* agglutinin) is shown. This technique can be used in the development of approach for monitoring the activity of MPO and study of the functional state of neutrophils.

Key words: celestine blue B, HOCl, myeloperoxidase, NADPH-oxidase, neutrophils, fluorescence.

Нейтрофилы представляют собой самую большую группу циркулирующих лейкоцитов у взрослого человека (60%), что указывает на особую их роль в первой линии защиты врожденного иммунитета от бактериальных и грибковых инфекций, а также стрессовых воздействий [1]. Супероксидный анион-радикал (O_2^-), генерируемый НАДФН-оксидазой нейтрофилов, является предшественником широкого спектра активных форм кислорода (АФК), азота и галогенов (АФГ), в частности, хлорноватистой кислоты (HOCl). Образование HOCl катализируется

миелопероксидазой (МПО), высвобождаемой из азурофильных гранул нейтрофилов во внеклеточное пространство в результате дегрануляции или лизиса клеток [2]. Увеличение активности/концентрации МПО и продуктов взаимодействия биомолекул с НОСI сопровождается различными заболеваниями, например, сердечно-сосудистые, нейродегенеративные, онкологические и др. [3].

Существует множество методов, направленных на обнаружение АФК и АФГ, образующихся в реакциях с участием МПО. Среди них иммуноферментный анализ, масс-спектрометрия, методы электронного парамагнитного и ядерного магнитного резонанса, проточной цитофлуориметрии, конфокальной микроскопии [4]. В большинстве своем эти методы являются дорогостоящими и/или малодоступными, поэтому для быстрой, простой, высокочувствительной и коммерчески доступной диагностики предпочтительным является использование флуоресцентного метода.

Обнаружение НОСI в биологических системах затруднено ввиду ее высокой реакционной способности, поэтому для идентификации НОСI, как правило, регистрируют изменение интенсивности флуоресценции какого-либо красителя при реакции с галогенаминами таурина. Используемый краситель должен обладать следующими свойствами: не являться субстратом пероксидазного цикла МПО; максимум спектра поглощения должен находиться в видимой области спектра и не изменяться в диапазоне pH 5–8; быть устойчивым к миллимолярным концентрациям H_2O_2 [5]. Ранее [6] было показано, что всем этим условиям удовлетворяет целестиновый синий В (СВ), а продукт его реакции с НОСI и ее производными, гликоль СВ, является флуорофором.

Целью данной работы явилось исследование продукции АФГ в суспензии нейтрофилов флуоресцентным методом с использованием целестинового синего В при активации клеток широким спектром агонистов различной природы.

Материалы и методы. В качестве стимуляторов нейтрофилов были выбраны: форбол-12-миристан-13-ацетат (РМА), N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP), а также растительные лектины различной углеводной специфичности: WGA (*Triticum vulgare* агглютинин) – GlcNAc-специфичный лектин зародышей пшеницы, САВА (*Caragana arborescens* агглютинин) – лектин караганы древовидной, специфичный к остаткам GalNAc, Con A (*Canavalia ensiformis* агглютинин) – маннозосвязывающий лектин семян канавалии мечевидной, SNA (*Sambucus nigra* агглютинин) – лектин коры бузины черной, специфичный к остаткам галактозы и сиаловых кислот, галактозо-специфичный лектин сои SBA (*Glycine hispida* агглютинин), а также GalNAc/галактозо-специфичный лектин семян фасоли обыкновенной РНА-L (*Phaseolus vulgaris* агглютинин).

Нейтрофилы выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности гистопака. Венозную кровь здоровых доноров, стабилизированную 109 мМ цитратом натрия (1:9, v/v), смешивали с 6 %-ым раствором декстрана Т70 (5:1, v/v), что приводило к осаждению эритроцитов в течение 40 мин при комнатной температуре. При помощи пластиковых шприцов собирали слой обогащенной лейкоцитами плазмы в пробирки и центрифугировали в течение 7 мин при 400 г. Далее примесь эритроцитов удаляли гипотоническим лизисом, добавляя к осадку клеток сначала 3 мл охлажденного 0,2 %-ого NaCl, а затем восстанавливали изотоничность путем добавления 3 мл 1,6 %-ого NaCl, содержащего 20 мг/мл D-глюкозы. Полученную суспензию центрифугировали в течение 7 мин при 400 г. Если смесь клеток содержала эритроциты, гипотонический лизис проводили повторно. Осадок клеток ресуспендировали в 6 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ), содержащего 10 мМ Na_2HPO_4/KH_2PO_4 , 137 мМ NaCl и 2,7 мМ KCl (pH 7,35), наслаивали по 5–6 мл полученной суспензии на 3 мл гистопака-1077 и центрифугировали в течение 10 мин при 400 г при комнатной температуре. Полученный осадок нейтрофилов отмывали в ФСБ, содержащем 2 мг/мл D-глюкозы и хранили при 4 °С в течение нескольких часов. Содержание нейтрофилов в клеточной суспензии составляло 97–98 %, число жизнеспособных клеток по тесту с трипановым синим – не менее 96 %.

Продукцию H_2O_2 нейтрофилами оценивали флуоресцентным методом на компьютеризированном спектрофлуориметре SM 2203 («СОЛАР», Минск, Беларусь) с использованием скополетина. Скополетин является флуоресцентным субстратом пероксидазы хрена, при окислении которого в присутствии H_2O_2 образуется нефлуоресцирующий продукт. К 1 мл суспензии нейтрофилов (10^6 кл/мл в ФСБ с 1 мМ $CaCl_2$, 0,5 мМ $MgCl_2$, 37 °С), содержащей 1 мкМ скополетина, 20 мкг/мл пероксидазы хрена и 1 мМ NaN_3 , добавляли активатор. Как правило, для стандартизации условий эксперимента предварительно готовили «коктейль» реакционной смеси путем смешивания водных растворов 0,2 мМ скополетина, 2 мг/мл пероксидазы хрена и 0,1 М NaN_3 в соотношении 1:2:2 (v/v/v) и в процессе измерений добавляли 50 мкл этого раствора к 950 мкл суспензии клеток. Кинетику окисления скополетина регистрировали по уменьшению интенсивности флуоресценции (регистрация при длине волны 460 нм, возбуждение – 350 нм). Скорость продукции H_2O_2 клетками определяли как тангенс угла наклона линейного участка кинетической кривой, отражающей убыль интенсивности флуоресценции скополетина в результате его окисления H_2O_2 .

Продукцию НОСI и ее производных оценивали флуоресцентным методом с использованием СВ. К 1 мл суспензии нейтрофилов (10^6 кл/мл в ФСБ, содержащем 1 мМ $CaCl_2$, 0,5 мМ $MgCl_2$, 20 мМ таурина и 20 мкМ СВ) добавляли активатор в отсутствие или в присутствии цитохалазина b (cyth b) (5 мкг/мл). Кинетику окисления СВ регистрировали по увеличению интенсивности флуоресценции (регистрация при длине волны 590 нм, возбуждение – 460 нм) на спектрофлуориметре SM 2203 («СОЛАР», Минск, Беларусь) при 37 °С и постоянном перемешивании. В качестве параметров, характеризующих продукцию нейтрофилами НОСI и ее производных, были выбраны: скорость окисления СВ (v), определяемая как тангенс угла наклона линейного участка кинетической кривой изменения интенсивности флуоресценции гликоля СВ в присутствии агониста, и лаг-период (t) – промежуток времени от момента добавления стимулятора до возникновения флуоресценции.

Результаты и их обсуждение. Хемотаксический пептид fMLP, действуя по рецептор-зависимому механизму (связываясь с рецепторами, ассоциированными с G-белками, и активируя множественные сигнальные пути, включающие, в том числе, митоген-активируемые протеинкиназы, фосфолипазы, протеинкиназу C и др.), инициирует

сборку и активацию НАДФН-оксидазы, но не вызывает экзоцитоз МПО (содержащейся в азурофильных гранулах) и, следовательно, не инициирует продукцию АФГ [7]. Флуоресцентным методом с использованием скополетина в качестве субстрата пероксидазой реакции показано, что fMLP вызывает дозозависимое увеличение продукции H_2O_2 клетками (рисунок 1 а), что свидетельствует о респираторном взрыве нейтрофилов.

Известно, что для экзоцитоза содержимого азурофильных гранул, а, следовательно, и продукции АФГ нейтрофилами, при действии на клетки fMLP необходима предварительная инкубация нейтрофилов с cyth b, препятствующим полимеризации фибриллярного актина цитоскелета [7]. На рисунке 1 б представлены типичные кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции гликоля СВ в суспензии нейтрофилов (в отсутствие (кривая 1) и в присутствии (кривые 2–5) cyth b), активированных fMLP в различных концентрациях. Видно, что в отсутствие cyth b флуоресценция, свидетельствующая о продукции клетками НОС1 и ее производных, отсутствовала (см. рис. 1(б), кривая 1). После предварительной инкубации клеток с cyth b нами было зарегистрировано увеличение интенсивности флуоресценции гликоля СВ (см. рис. 1(б), кривые 2–5), что свидетельствует об образовании в суспензии активированных нейтрофилов АФГ, для чего, как упоминалось выше, необходима как продукция H_2O_2 , так и экзоцитоз МПО.

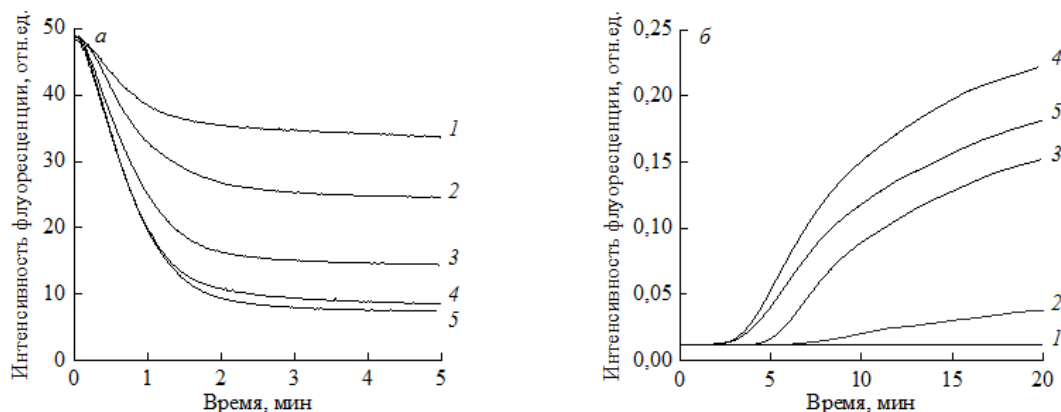


Рисунок 1 – а – Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции скополетина (1 мкМ) в суспензии нейтрофилов (10^6 кл/мл), активированных fMLP в различных концентрациях:

1 – 0,5 мкМ, 2 – 1 мкМ, 3 – 2,5 мкМ, 4 – 5 мкМ, 5 – 10 мкМ;

длина волны возбуждения флуоресценции – 350 нм, регистрации – 460 нм;

б – Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции гликоля СВ, образующегося в суспензии нейтрофилов (10^6 кл/мл) в присутствии 20 мкМ СВ при активации клеток fMLP в различных концентрациях:

2 – 0,25 мкМ, 3 – 0,5 мкМ, 4 – 1 мкМ, 5 – 2 мкМ, в отсутствие (1) и в присутствии (2–5) cyth b (5 мкг/мл);

длина волны возбуждения флуоресценции – 460 нм, регистрации – 590 нм

Форболовый эфир (РМА) является липофильным соединением, легко проникающим в клетки. РМА, структурный аналог диацилглицерола, взаимодействует с его участком связывания на молекуле протеинкиназы С, инициируя респираторный взрыв [8] и дегрануляцию азурофильных гранул нейтрофилов [9]. Как и ожидалось, добавление РМА к суспензии нейтрофилов вызывало увеличение интенсивности флуоресценции (см. рис. 2, кривая 2), свидетельствуя о продукции активированными клетками НОС1 и ее производных.

Кроме того, полученные нами с использованием СВ результаты согласуются со следующими литературными данными: активация НАДФН-оксидазы при связывании гидрофильных лигандов (т.е. fMLP) с поверхностными рецепторами нейтрофилов обычно приводит к продукции $\cdot O_2^-$ и последующему спонтанному (или с участием супероксиддисмутазы) образованию H_2O_2 , которое длится менее 5 мин (рисунок 1 а, выход кривой на «плато» в течение 5 мин от начала регистрации флуоресценции), тогда как независимая от рецептора активация нейтрофилов гидрофобным стимулятором (т.е. РМА) вызывает длительное образование $\cdot O_2^-$ до истощения необходимых субстратов и кофакторов [7] («загиб» кривой начинается лишь после 20 мин регистрации флуоресценции (см. рис. 2). Таким образом, можно сделать вывод о том, что краситель СВ может быть использован для регистрации продукции клетками НОС1 и ее производных при активации нейтрофилов широким спектром (как проникающих в клетку, так и связывающихся с рецепторами на ее поверхности) агонистов.

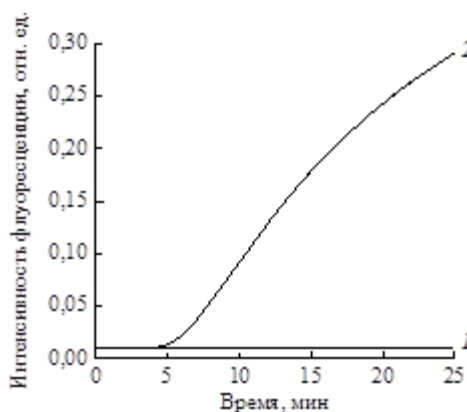


Рисунок 2 – Типичная кинетическая кривая изменения интенсивности флуоресценции гликоля СВ, образующегося в суспензии активированных РМА (50 нМ) нейтрофилов (10^6 кл/мл) в присутствии 20 мкМ СВ: 1 – в отсутствие РМА, 2 – в присутствии 50 нМ РМА. Длина волны возбуждения флуоресценции – 460 нм, регистрации – 590 нм

Лектины – белки, обладающие свойствами обратимо и избирательно связывать углеводы и углеводные компоненты гликоконъюгатов различной природы. Присутствие различных типов углевод-связывающих белков к настоящему времени идентифицировано в тканях, биологических жидкостях и на поверхности клеток человека и животных. Роль эндогенных лектинов и углевод-связывающих белков в организме в настоящее время связывают с функционированием иммунной системы и регуляцией процессов биоузнавания в различных биохимических системах, которые могут запускать эффекторные функции клеток [10]. Ранее нами [11] и другими авторами [12] было показано, что многие растительные лектины, а также лектины млекопитающих способны активировать продукцию O_2^- и H_2O_2 , а также экзоцитоз содержимого гранул нейтрофилов [13]. В данной работе мы исследовали влияние WGA, САВА, Con A, SNA, SBA и РНА-L на продукцию АФГ нейтрофилами с использованием СВ. Данные по влиянию лектинов на скорость окисления СВ и лаг-период продукции НОС1 и ее производных нейтрофилами приведены в таблице 1. Как видно из приведенных данных, наиболее активными стимуляторами продукции НОС1 нейтрофилами явились WGA и САВА, в то время как SNA и SBA были неактивны в этом отношении. Необходимо отметить, что используемые лектины вызывали флуоресценцию лишь в присутствии cyth b, что согласуется с данными литературы о том, что блокировка микрофиламентной системы клеток способствует высвобождению содержимого азурофильных гранул при активации лектинами [13].

Таблица 1 – Влияние агонистов различной природы на продукцию НОС1 и ее производных нейтрофилами, регистрируемую флуоресцентным методом с использованием СВ. * $P < 0,05$ по сравнению с контролем

активатор	концентрация активатора	ν , отн. ед.	t , мин
контроль	–	0	–
РМА	50 нМ	$0,021 \pm 0,004^*$	$5,8 \pm 0,9$
fMLP	1 мкМ	$0,029 \pm 0,004^*$	$3,2 \pm 0,7$
WGA	50 мкг/мл	$0,016 \pm 0,003^*$	$6,4 \pm 1,1$
САВА	75 мкг/мл	$0,024 \pm 0,009^*$	$8,9 \pm 1,3$
РНА-L	100 мкг/мл	$0,014 \pm 0,001^*$	$4,9 \pm 1,0$
Con A	100 мкг/мл	$0,014 \pm 0,005^*$	$5,2 \pm 0,9$
SNA	75 мкг/мл	0	–
SBA	100 мкг/мл	0	–

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных можно заключить, что флуоресцентный метод регистрации продукции АФГ нейтрофилами и их производных с использованием СВ может быть применен для оценки функционального состояния нейтрофилов, отражающего активность НАДФН-оксидазы, экзоцитоз МПО и продукцию АФГ.

Работа поддержана грантами РФФИ 17-04-00530, БРФФИ № Б16Р-015.

Список литературы / References:

1. Зак К.П. Роль нейтрофильных лейкоцитов в патогенезе сахарного диабета 1-го типа у человека (аналитический обзор с включением собственных данных). *Международный эндокринологический журнал*, 2016, № 2, вып. 74, с. 130-139. [Zak K.P. The role of neutrophilic leukocytes in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus in humans (an analytical review with the inclusion of own data). *Mezhdunarodnyi endokrinologicheskii zhurnal*, 2016, no. 2, vol. 74, pp. 130-139. (In Russ.)]
2. Мальцева В.Н., Сафронова В.Г. Неоднозначность роли нейтрофила в генезе опухоли. *Цитология*, 2009, т. 51, № 6, с. 467-474. [Maltseva V.N., Safronova V.G. Ambiguity of the role of neutrophil in tumor genesis. *Tsitologiya*, 2009, vol. 51, no. 6, pp. 467-474. (In Russ.)]

3. Lau D., Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology Therapeutics*, 2006, vol. 111, no. 1, pp. 16-26.
4. Huang J., Milton A., Arnold R.D., Huang H., Smith F., Panizzi J.R., Panizzi P. Methods for measuring myeloperoxidase activity toward assessing inhibitor efficacy in living systems. *Journal of leukocyte biology*, 2016, vol. 99, no. 4, pp. 541-548.
5. Соколов А.В., Костевич В.А., Васильев В.Б., Панасенко О.М. Кинетический метод определения галогенирующей активности миелопероксидазы. *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Тез. докл. Междунар. науч. конф., сб. ст.: в 2 ч. Ч. 2*, Минск, 2012, с. 272-274. [Sokolov A.V., Kostevich V.A., Vasilyev V.B., Panasenko O.M. Kinetic method for determining the halogenating activity of myeloperoxidase *Molekulyarnyye, membrannyye i kletochnyye osnovy funktsionirovaniya biosistem: Tез. dokl. Mezhdunar. nauch. konf., sb. st.: v 2 ch. Part 2*, Minsk, 2012, pp. 272-274. (In Russ.)]
6. Sokolov A.V., Kostevich V.A., Kozlov S.O., Donskyi I.S., Vlasova I.I., Rudenko A.O., Zakharova E.T., Vasilyev V.B., Panasenko O.M. Kinetic method for assaying the halogenating activity of myeloperoxidase based on reaction of celestine blue B with taurine halogenamines. *Free Radical Research*, 2015, vol. 49, no. 6, pp. 777-789.
7. Sheppard F.R., Kelher M.R., Moore E.E., McLaughlin N.J., Banerjee A., Silliman C.C. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *Journal of leukocyte biology*, 2005, vol. 78, no. 5, pp. 1025-1042.
8. Nagaji J. The role of protein kinase C and $[Ca^{2+}]_i$ in superoxide anion synthesis and myeloperoxidase degranulation of human neutrophils. *The Kurume medical journal*, 1999, vol. 46, no. 3-4, pp. 157-162.
9. Abdel-Latif D., Steward M., Macdonald D.L., Francis G.A., Dinauer M.C., Lacy P. Rac2 is critical for neutrophil primary granule exocytosis. *Blood*, 2004, vol. 104, no 3, pp. 832-839.
10. Тимошенко А.В. Применение эндогенных лектинов в клинической диагностике. *Медицинские новости*, 1997, № 4, с. 16-20. [Timoshenko A.V. The use of endogenous lectins in clinical diagnostics. *Meditinskiye novosti*, 1997, no. 4, pp. 16-20. (In Russ.)]
11. Gorudko I.V., Mukhortava A.V., Caraher B., Ren M., Cherenkevich S.N., Kelly G.M., Timoshenko A.V. Lectin-induced activation of plasma membrane NADPH oxidase in cholesterol-depleted human neutrophils. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2011, vol. 516, no. 2, pp. 173-181.
12. Pereira-da-Silva G., Caroline Carvalho F., Cristina Roque-Barreira M. Neutrophil activation induced by plant lectines: modulation of inflammatory processes. *Inflammation & Allergy-Drug Targets*, 2012, vol. 11, no. 6, pp. 433-441.
13. Timoshenko A.V., Kayser K., Gabius H.J. Lectin-triggered superoxide/H₂O₂ and granule enzyme release from cells. *Methods in Molecular Medicine*, 1998, no. 9, pp. 441-445.

КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ИОНОВ ЖЕЛЕЗА С РАСТИТЕЛЬНЫМИ МЕЛАНИНАМИ

¹Багиров Р.М., ¹Багирова О.Ш., ¹Турабова Г.А., ²Аббасов И.И.

¹Бакинский Государственный Университет
ул. З.Халилова, 23, г.Баку, AZ1148, Азербайджан

²Азербайджанский Государственный Нефтяной и Индустриальный Университет
пр. Азадлыг, 20, г.Баку, AZ1010, Азербайджан
e-mail: rafiqbagirov@list.ru

Аннотация. Методом гамма-резонансной спектроскопии (ГРС) исследовано комплексообразование ионов железа с синтетическим L-ДОФА-меланином и меланинами, выделенными из кожуры бобов *Vicia faba*, черного винограда и семян гречихи. Установлено, что меланины эффективно хелатируют ионы железа как в его двух, так и в трехвалентном состоянии. Основная часть координированных ионов Fe³⁺ входит в состав полиядерных (n≥2) кластеров и благодаря быстрой релаксации вследствие спин-спинового взаимодействия дает парамагнитные дублетные ГР-спектры. Наличие магнитных релаксационных спектров показывает, что часть координационных центров в меланине обособлено. Величины параметров ГР-спектров изученных образцов характерны для высокоспиновых (ВС) комплексов ионов Fe²⁺ и Fe³⁺ с октаэдрическим лигандным окружением. Предполагается, что способность растительных меланинов эффективно связывать прооксидантные ионы Fe²⁺ может являться одним из возможных механизмов их антиоксидантных и протекторных свойств.

Ключевые слова: меланин, гамма-резонансная спектроскопия, комплексообразование, ионы железа.