

Флуоресцентные характеристики зондов семейства флуоресцина в растворах сывороточного альбумина человека

И. М. Власова^a, А. М. Салецкий^b

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет, кафедра общей физики. Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.

E-mail: ^avlasovairina1979@mail.ru, ^bsam@phys.msu.ru

Статья поступила 27.02.2009, подписана в печать 16.04.2009.

Обнаружены отличия в растворах сывороточного альбумина человека у зондов семейства флуоресцина в молекулярной ассоциации, в характере зависимости флуоресценции от pH и в анизотропии флуоресценции, которые определяются электроотрицательностью атомов боковых радикалов в структурных формулах и значениями рК ионизируемых групп зондов.

Ключевые слова: зонд, флуоресцин, эозин, эритрозин, сывороточный альбумин человека, молекулярная ассоциация.

УДК: 525.235.538.958. PACS: 42.62 Be; 82.53 Kp.

Введение

В работе представлены результаты исследований флуоресцентных характеристик трех молекулярных зондов семейства флуоресцина — исходного соединения флуоресцина и его галогенопроизводных (эозина и эритрозина) — при добавлении к ним в растворы сывороточного альбумина человека (САЧ) при различных значениях pH растворов.

САЧ — глобулярный белок плазмы крови, структурная подвижность его молекулы обеспечивает взаимодействие с различными лигандами. Данное уникальное свойство молекулы САЧ — связывание различных лигандов — определяет основную функцию этого белка — транспорт различных веществ (физиологических метаболитов, лекарственных препаратов) в кровотоке.

Большую роль в изучении физико-химических свойств связывающих центров САЧ играет метод флуоресцентных зондов, являющихся низкомолекулярными лигандами для САЧ [1–5]. В частности, при изучении САЧ (изоэлектрическая точка рI 4.7) применяют анионные при физиологическом значении pH (7.4) молекулярные флуоресцентные зонды, такие, как эозин, эритрозин и флуоресцин, принадлежащие одному гомологичному ряду производных флуоресцина (эозин является бромированной производной флуоресцина, эритрозин является йодированной производной флуоресцина). Исследования связывания флуоресцентных зондов с САЧ позволяют получать информацию о строении и свойствах связывающих центров, в том числе лекарственных сайтов, САЧ, что имеет важный прикладной медицинский и фармакологический аспект в связи с тем, что многие лекарственные препараты переносятся в кровотоке в связанном с САЧ виде.

1. Материалы и методы

1.1. Исследование спектров поглощения зондов в растворах САЧ

Были подготовлены буферные растворы: 0.1 M CH_3COOH — КОН (рН 3.0–5.0) и 0.1 M KH_2PO_4 — 0.1 M NaOH (рН 6.0–8.0). На их основе были приготовлены растворы зонда (флуоресцина, эозина, эритрозина)

концентрации 30 мкM с добавлением или без добавления САЧ (10 мг/мл) при различных pH (3.0–8.0).

Измерения спектров поглощения зондов в исследуемых растворах проводились на спектрофотометре Lambda 35 (Perkin Elmer). Образцы помещались при измерении при комнатной температуре в 1-см кювету. Спектры поглощения зондов в растворах регистрировались в диапазоне 300–700 нм.

1.2. Исследование спектров флуоресценции зондов в растворах САЧ

На основе вышеуказанных буферных растворов были приготовлены растворы зонда (3 мкM флуоресцин; 30 мкM эозин; 30 мкM эритрозин) с добавлением или без добавления САЧ (10 мг/мл) при различных значениях pH (3.5–8.0).

Исследования флуоресцентных характеристик молекулярных зондов проводились на спектрофлуориметре LS 55 (Perkin Elmer) при комнатной температуре. Флуоресценция зондов возбуждалась светом со следующими длинами волн: 1) флуоресцин — $\lambda_{\text{exc}}^{\text{fl}} = 440$ нм; 2) эозин — $\lambda_{\text{exc}}^{\text{eo}} = 520$ нм; 3) эритрозин — $\lambda_{\text{exc}}^{\text{er}} = 530$ нм.

Исследования поляризованной флуоресценции зондов проводились на спектрофлуориметре LS 55 при указанных выше длинах волн возбуждения флуоресценции. В процессе измерений регистрировались I_{\parallel} и I_{\perp} — интенсивности флуоресценции, измеренные через поляризатор, электрическая ось которого направлена параллельно или перпендикулярно поляризации возбуждающего света.

2. Обсуждение результатов

В работе по полученным спектрам поглощения зондов определена величина степени молекулярной ассоциации всех трех зондов как в растворах без белка, так и с САЧ при различных значениях pH. Величина степени молекулярной ассоциации ($1 - X$) зонда представляет собой долю ассоциированных (в данном случае, димеров) молекул зонда ($1 - X$) в растворе (где X — доля мономерных молекул) и определяется по стандартной методике [6].

На рис. 1 представлены зависимости степени молекулярной ассоциации (СМА) трех зондов от pH растворов.

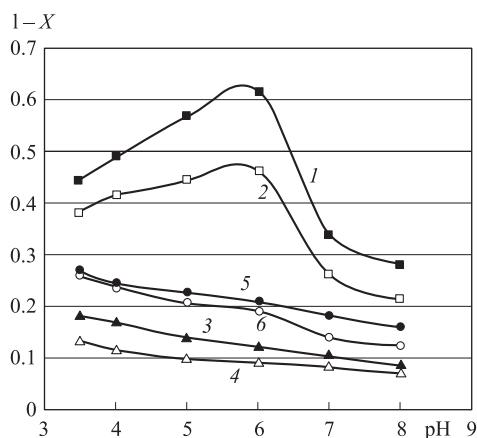


Рис. 1. Степень молекулярной ассоциации зондов: 30 мкМ флуоресцеина (1, 2), 30 мкМ эозина (3, 4), 30 мкМ эритрозина (5, 6), в растворах без белка (1, 3, 5) и в растворах 10 мг/мл САЧ (2, 4, 6)

Зависимости СМА зондов от pH объясняются значениями рK ионизируемых групп (гидроксильной и карбоксильной) зондов и величинами электрических зарядов зондов при различных pH (рис. 2).

Изменения электрического заряда молекул флуоресцеина схематично изображены на рис. 2, а. При значениях pH < 5.5 молекулы флуоресцеина находятся в слабо положительно заряженной форме. При значениях pH 5.5–6.8 молекулы флуоресцеина электрически нейтральны. Значение рK(OH) флуоресцеина — 6.8. В области pH 6.8–8.0 молекулы флуоресцеина слабо отрицательно заряжены и находятся в формеmonoанионов. Значение рK(COOH) флуоресцеина — 8.0. При pH > 8.0

молекулы флуоресцеина сильно отрицательно заряжены (дианионы).

Изменения электрического заряда молекул эозина представлены на рис. 2, б. При значениях pH < 3.0 молекулы эозина электрически нейтральны. Значение рK(OH) эозина примерно 3.0. При 3.0 < pH < 5.0 молекулы эозина слабо отрицательно заряжены (моноанионы). Значение рK(COOH) эозина примерно 5.0. При pH > 5.0 молекулы эозина заряжены сильно отрицательно (дианионы).

Изменения электрического заряда молекул эритрозина изображены на рис. 2, в. У эритрозина следующие значения рK ионизируемых групп: рK(OH) — 3.6 и рK(COOH) — 5.5. В области значений pH < 3.6 молекулы эритрозина электрически нейтральны. В области pH 3.6–5.5 молекулы эритрозина слабо отрицательно заряжены (моноанионы). При pH > 5.5 молекулы эритрозина сильно отрицательно заряжены (дианионы).

Кривые 1 и 2 на рис. 1 представляют зависимости от pH величины СМА флуоресцеина в растворах без белка и с САЧ. Зависимость СМА флуоресцеина от pH имеет нелинейный характер с максимумом при pH 6.0, при котором молекулы флуоресцеина электрически нейтральны и легко образуют ассоциаты.

СМА молекул флуоресцеина в растворах САЧ меньше СМА молекул флуоресцеина в растворах без белка при соответствующих pH, что объясняется связыванием флуоресцеина с САЧ и уменьшением доли несвязанного с белком флуоресцеина, способного к образованию ассоциатов.

Кривые 3 и 4 на рис. 1 описывают зависимости от pH раствора величины СМА молекул эозина в растворах без белка и с белком соответственно. При увеличении pH наблюдается линейное уменьшение СМА молекул эозина,

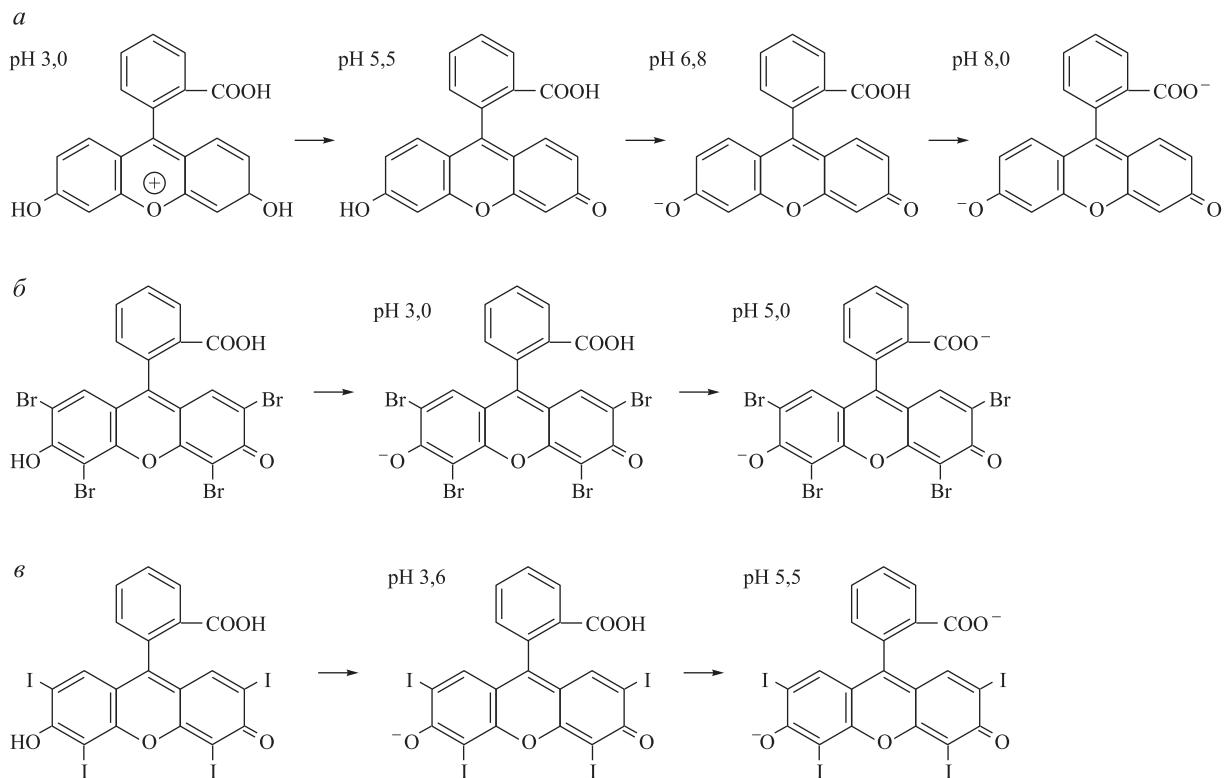


Рис. 2. Структурные формулы трех зондов семейства флуоресцеина и значения рK их ионизируемых групп: флуоресцеин (а), эозин (б), эритрозин (в)

связанное с увеличением отрицательного заряда молекул эозина и с увеличением их взаимного отталкивания.

В растворах САЧ СМА эозина меньше СМА эозина в растворах без белка, что объясняется связыванием эозина с САЧ. Более сильное уменьшение СМА эозина в растворах САЧ по сравнению с растворами без белка имеет место при $\text{pH} < 5.0$, когда происходит эффективное связывание САЧ (положительно заряженного, $\text{pI} 4.7$) и эозина (моноаниона при $\text{pH} 3.0\text{--}5.0$).

Кривые 5 и 6 на рис. 1 представляют зависимости от pH величины СМА эритрозина в растворах без белка и с САЧ. При увеличении pH происходит линейное уменьшение СМА эритрозина, так как зонд становится все более отрицательно заряженным, что уменьшает его способность к образованию ассоциатов.

СМА эритрозина в растворах САЧ меньше СМА эритрозина в растворах без белка, что объясняется связыванием эритрозина с САЧ. Более сильное уменьшение СМА эритрозина в растворах САЧ имеет место при высоких pH , в отличие от эозина.

По полученным спектрам флуоресценции зондов проведен сравнительный анализ значений интенсивности в максимуме спектра флуоресценции зонда (I_{\parallel}^{\max}) при различных pH в растворах как без белка, так и с САЧ (рис. 3).

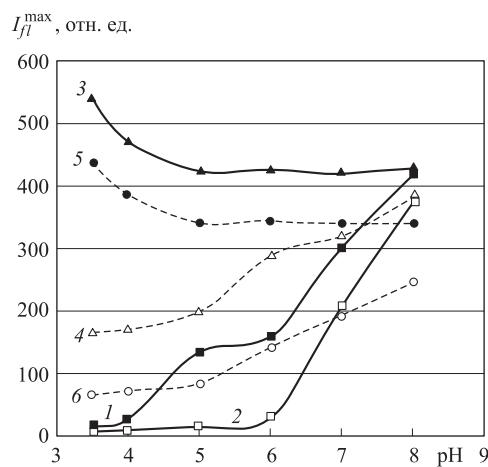


Рис. 3. Интенсивность в максимуме спектров флуоресценции зондов: 3 мкМ флуоресцеина (1, 2) при $\lambda_{\text{exc}}^{\parallel} = 440$ нм, 30 мкМ эозина (3, 4) при $\lambda_{\text{exc}}^{\text{eo}} = 520$ нм, 30 мкМ эритрозина (5, 6) при $\lambda_{\text{exc}}^{\text{er}} = 530$ нм, в растворах без белка (1, 3, 5) и в растворах 10 мг/мл САЧ (2, 4, 6)

Зависимости 1 и 2 (рис. 3) отражают поведение I_{\parallel}^{\max} флуоресцеина в растворах без белка и в растворах с САЧ. В растворах с САЧ максимум спектра флуоресценции ($\lambda_{\parallel}^{\max}$) флуоресцеина смещается в красную область по сравнению с растворами без белка, например при $\text{pH} 5.0$ в растворах без белка $\lambda_{\parallel}^{\max} = 510$ нм, а в растворах с САЧ $\lambda_{\parallel}^{\max} = 515$ нм. В растворах без белка при увеличении pH наблюдается увеличение I_{\parallel}^{\max} флуоресцеина, отрицательно заряженные формы флуоресцеина (в отличие от его галоген-производных) обладают большей интенсивностью флуоресценции. В растворах с САЧ флуоресценция зонда тушится, что объясняется его связыванием с белком. Наибольшее связывание флуоресцеина с САЧ происходит при $\text{pH} 5.0\text{--}6.0$.

Зависимости 3 и 4 (рис. 3) отражают поведение I_{\parallel}^{\max} эозина в растворах без белка и в растворах с САЧ. В растворах с САЧ $\lambda_{\parallel}^{\max}$ смещается в красную область

по сравнению с растворами без САЧ. Например, при $\text{pH} 5.0$ в растворах без белка $\lambda_{\parallel}^{\max} = 544$ нм, в растворах с белком $\lambda_{\parallel}^{\max} = 560$ нм. В растворах без белка I_{\parallel}^{\max} эозина уменьшается, а затем выходит на постоянное значение с увеличением pH раствора: при $3.0 \leq \text{pH} \leq 5.0$ молекулы эозина являются моноанионами и слабо экранируются дипольными молекулами воды, а при $\text{pH} > 5.0$ эозин находится в форме дианиона, что вызывает его сильную экранировку молекулами воды и уменьшение I_{\parallel}^{\max} . В растворах САЧ наблюдается тушение флуоресценции эозина. Низкая интенсивность флуоресценции эозина в растворах белка при $\text{pH} < 5.0$ обусловлена интенсивным связыванием эозина с белком при этих значениях pH .

Зависимости 5 и 6 (рис. 3) отражают поведение I_{\parallel}^{\max} эритрозина в растворах без белка и в растворах с САЧ. В растворах с САЧ происходит смещение $\lambda_{\parallel}^{\max}$ эритрозина в красную область по сравнению с растворами без белка. Например, при $\text{pH} 5.0$ в растворах без САЧ $\lambda_{\parallel}^{\max} = 550$ нм, в растворах с САЧ $\lambda_{\parallel}^{\max} = 566$ нм. В растворах без белка при увеличении pH от 3.5 до 5.5 наблюдается уменьшение I_{\parallel}^{\max} эритрозина, связанное с увеличением отрицательного заряда эритрозина и увеличением дипольной экранировки молекулами воды, а при увеличении pH от 5.5 и выше I_{\parallel}^{\max} не меняется, так как заряд молекул эритрозина практически не меняется. При связывании эритрозина с САЧ флуоресценция эритрозина тушится, наибольшее связывание эритрозина с белком происходит в области $\text{pH} < 5.0$.

Для оценки влияния САЧ на поляризацию флуоресценции трех зондов проведен сравнительный анализ степени анизотропии флуоресценции (r) зондов при различных значениях pH , как в растворах без белка, так и в растворах с САЧ (рис. 4). Степень анизотропии флуоресценции зондов рассчитывалась по значениям I_{\parallel} и I_{\perp} в максимуме спектра испускания флуоресценции зонда.

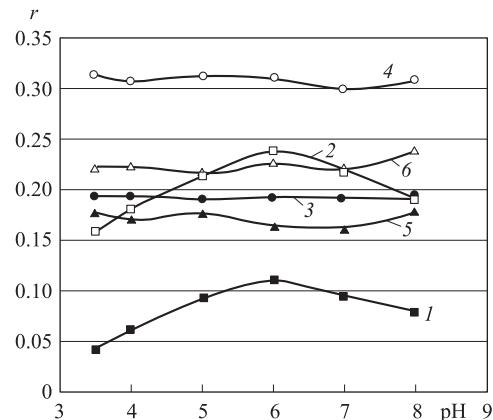


Рис. 4. Степень анизотропии флуоресценции зондов: 3 мкМ флуоресцеина (1, 2), 30 мкМ эозина (3, 4), 30 мкМ эритрозина (5, 6), в растворах без белка (1, 3, 5) и в растворах 10 мг/мл САЧ (2, 4, 6)

На рис. 4 (кривые 1 и 2) представлены зависимости r флуоресцеина от pH растворов как без белка, так и с САЧ. Видно, что r флуоресцеина в растворах САЧ больше, чем в растворах без белка. Поскольку растворы флуоресцеина данной концентрации являются разбавленными растворами, то в отсутствие безызлучательного переноса энергии между молекулами флуоресцеина ос-

новной причиной деполяризации флуоресценции является вращательная диффузия молекул зонда. В растворах с САЧ вращательная диффузия флуоресцина уменьшается вследствие его связывания с белком, что и приводит к увеличению значений r .

Как в растворах без белка, так и в растворах САЧ, r флуоресцина нелинейно зависит от pH с максимумом при pH 6.0. Зависимость r флуоресцина от pH объясняется изменениями вращательной диффузии молекул флуоресцина при вариации значений pH. При наличии слабо электроотрицательных атомов водорода в структурной формуле зонда флуоресцина основное влияние на вращательную диффузию зонда оказывают процессы его молекулярной ассоциации и эффективность его связывания с белком, зависящие от pH, что приводит в свою очередь к зависимости поляризации флуоресценции зонда от pH.

Зависимости r эозина от pH в растворах как без белка, так и с САЧ представлены на рис. 4 (кривые 3 и 4). Видно, что r эозина в растворах САЧ больше, чем в растворах без белка. При связывании эозина с САЧ коэффициент вращательной диффузии эозина уменьшается по сравнению с аналогичным коэффициентом несвязанного с белком эозина, что и приводит к увеличению r эозина.

Видно, что r эозина не зависит от pH растворов (в диапазоне $3.5 \leq pH \leq 8.0$) как в растворах САЧ, так и в растворах без белка, что объясняется наличием в молекулах эозина сильно электроотрицательных атомов брома, затрудняющих изменения вращательной диффузии эозина при вариации значений pH. При наличии сильно электроотрицательных атомов брома в структурной формуле эозина имеет место сильное взаимодействие зонда с полярной окружающей средой, что приводит к независимости вращательной диффузии зонда от его молекулярной ассоциации и эффективности его связывания с белком и, следовательно, к независимости поляризации флуоресценции зонда от pH.

На рис. 4 (кривые 5 и 6) представлены зависимости r эритрозина от pH растворов как без белка, так и с САЧ. Видно, что r эритрозина в растворах САЧ больше, чем в растворах без белка, что связано с уменьшением вращательной диффузии эритрозина вследствие связывания его с молекулами белка.

Показано, что r эритрозина не зависит от значения pH (в диапазоне $3.5 \leq pH \leq 8.0$) как в растворах с САЧ, так и в растворах без белка, что, как и для эозина, объясняется наличием в молекулах эритрозина сильно электроотрицательных атомов йода, затрудняющих изменения вращательной диффузии эритрозина при вариации pH в связи с сильным взаимодействием эритрозина с полярной окружающей средой, т. е. качественно поведение r эритрозина повторяет поведение r эозина, а количественно r эритрозина занимает промежуточное положение между r флуоресцина и эозина.

Заключение

В работе проведен анализ флуоресцентных характеристик в растворах САЧ при различных pH трех флуоресцентных зондов (эозина, эритрозина и флуоресцина), принадлежащих к одному семейству флуоресцина.

Зарегистрированы отличия в поведении СМА зондов: у флуоресцина обнаружен нелинейный вид зависимости СМА от pH с максимумом при pH 6.0, а у галоген-производных флуоресцина зависимость СМА от pH имеет линейно убывающий характер при увеличении pH. Общей чертой для всех трех зондов является уменьшение СМА в растворах с САЧ по сравнению с растворами без белка.

В растворах с САЧ у всех трех зондов происходит тушение флуоресценции и красный сдвиг максимума спектра флуоресценции.

В растворах САЧ для всех трех зондов r зонда больше, чем в растворах без белка. Зависимости r зонда от pH растворов различаются для флуоресцина и его галоген-производных: у флуоресцина зависимости r от pH имеют нелинейный вид с максимумом при pH 6.0, а у эозина и эритрозина r от pH не зависит (в исследованном диапазоне значений pH).

Обнаруженные отличия во флуоресцентных характеристиках этих трех зондов определяются величиной электроотрицательности атомов боковых радикалов в структурных формулах зондов. Электроотрицательность атомов боковых радикалов в структурных формулах этих зондов оказывает влияние на pH их ионизируемых групп (COOH и OH). Увеличение электроотрицательности наблюдается в следующем направлении: водород (у флуоресцина) — йод (у эритрозина) — бром (у эозина). Наличие в молекуле зонда более электроотрицательного атома приводит к сильному уменьшению значений pH(COOH) и pH(OH), что сказывается на флуоресцентных характеристиках. Наличие более электроотрицательного атома в молекуле зонда приводит к уменьшению значений СМА зонда и к увеличению r . Введение галогенов в молекулу зонда меняет характер зависимости флуоресценции зонда от pH.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 07-02-00459).

Список литературы

1. Pelet S., Gratzel M., Moser J.-E. // J. Phys. Chem. B. 2003. **107**. C. 3215.
2. Waheed A.A., Sridhar Rao K., Gupta P.D. // Anal. Biochem. 2000. **287**. C. 73.
3. Власова И.М., Землянский А.Ю., Салецкий А.М. // Журн. прикл. спектр. 2006. **73**, № 5. С. 661.
4. Gao D., Tian Y., Liang F. et al. // J. Luminesc. 2007. **127**. C. 515.
5. Bhawmik B.B., Ganguly P. // Spectrochim. Acta. A. 2005. **61**. C. 1997.
6. Левшин Л.В., Салецкий А.М. Оптические методы исследования молекулярных систем. М., 1994.

Fluorescent characteristics of probes of fluorescein family in human serum albumin solutions**I. M. Vlasova^a, A. M. Saletsky^b***Department of General Physics, Faculty of Physics, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia.**E-mail: ^avlasovairina1979@mail.ru, ^bsam@phys.msu.ru.*

Differences in molecular association, in dependence of fluorescence on pH, and in anisotropy of fluorescence for probes of fluorescein family in human serum albumin solutions are discovered. They are due to the electronegativity of atoms of lateral radicals in structural formula and the values of pK of ionized groups of probes.

Keywords: probe, fluorescein, eosin, erythrosin, human serum albumin, molecular association.

PACS: PACS: 42.62 Be; 82.53 Kp.

Received 27 February 2009.

English version: *Moscow University Physics Bulletin* 4(2009).

Сведения об авторах

1. Власова Ирина Михайловна — канд. физ.-мат. наук, ассистент; тел.: 939-14-89, e-mail: vlasovairina1979@mail.ru.

2. Салецкий Александр Михайлович — докт. физ.-мат. наук, профессор, зав. кафедрой; тел.: 939-14-89, e-mail: sam@phys.msu.ru.