

Флуоресцентные характеристики и молекулярная ассоциация наномаркера бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека

И. М. Власова^a, А. А. Кулешова, 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: ^a vlasovairina1979@mail.ru, ^b sam@phys.msu.ru

Статья поступила 04.04.2011, подписана в печать ??2011

Обнаружено уменьшение степени молекулярной ассоциации наномаркера бенгальского розового в растворах при добавлении в них САЧ. Зарегистрировано, что в растворах с САЧ происходят тушение флуоресценции и красный сдвиг максимума спектра флуоресценции наномаркера бенгальского розового. Показано, что зависимость эффективной константы связывания бенгальского розового с САЧ монотонно убывает с ростом рН. Обнаружено, что на значения степени молекулярной ассоциации наномаркера бенгальского розового и на значения эффективных констант связывания его с САЧ оказывает влияние величина электроотрицательности атомов в его структурной формуле и значения рК его ионизируемых групп.

Ключевые слова: бенгальский розовый, сывороточный альбумин человека, флуоресценция, молекулярная ассоциация, наномаркер.

УДК: 535.372.3. PACS: 87.83+a; 87.15-v.

Введение

В работе представлены результаты исследований флуоресцентных характеристик и процессов молекулярной ассоциации наномаркера бенгальского розового, принадлежащего к семейству флуоресцеина, в растворах сывороточного альбумина человека (САЧ) при различных значениях рН.

САЧ — глобулярный белок плазмы крови, структурная подвижность его молекулы обеспечивает его взаимодействие с различными лигандами [1]. Уникальное свойство молекулы САЧ — связывание различных лигандов — определяет основную функцию этого белка — транспорт различных веществ (физиологических метаболитов, лекарственных препаратов) в кровотоке. Механизм связывания лигандов с молекулой САЧ определяется наличием на белке специфических участков — связывающих центров. Выделяют шесть главных связывающих центров САЧ [1]: центры I и II — для связывания малых органических молекул, центры III и IV — для длинноцепочечных жирных кислот, центр V — для лигандов со свободной SH-группой, центр VI — для связывания ионов металлов. Некоторые реакции связывания обеспечиваются электростатическими взаимодействиями, другие имеют ковалентный характер.

Большую роль в изучении физико-химических свойств связывающих центров САЧ играет метод флуоресцентных наномаркеров, являющихся низкомолекулярными лигандами для САЧ [2–5]. В частности, при изучении САЧ (изоэлектрическая точка pI 4.7) применяют анионные при физиологическом значении рН (7.4) флуоресцентные наномаркеры, такие как бенгальский розовый, являющийся тетрахлор-тетрайод-производной флуоресцеина. Также к флуоресцентным наномаркерам семейства флуоресцеина относятся исходное соединение флуоресцеин, его йодированная производная эритрозин и его бромированная производная эозин — ранее нами изучены их процессы молекулярной ассо-

циации в растворах САЧ [6, 7], их флуоресцентные характеристики в растворах САЧ [6, 7], исследованы механизмы их связывания с САЧ [8, 9] и определены константы связывания этих трех наномаркеров с САЧ [10].

В настоящей работе представлены исследования флуоресцентных характеристик и молекулярной ассоциации бенгальского розового в растворах САЧ и сделаны выводы о связывании данного наномаркера с САЧ при различных значениях рН. Исследования связывания флуоресцентных наномаркеров, таких как бенгальский розовый, с САЧ позволяют получать информацию о строении и свойствах связывающих центров САЧ, в том числе его лекарственных сайтов, что имеет важный прикладной медицинский и фармакологический аспект, так как многие лекарственные препараты переносятся в кровотоке в связанном с САЧ виде.

1. Материалы и методы

1.1. Исследование спектров поглощения наномаркера бенгальского розового в растворах САЧ

Были подготовлены буферные растворы: 0.1 М $\text{CH}_3\text{COOH-KOH}$ (рН 3.0–5.0) и 0.1 М $\text{KH}_2\text{PO}_4-0.1$ М NaOH (рН 6.0–8.0). На их основе были приготовлены растворы бенгальского розового (3–50 мкМ) без добавления или с добавлением САЧ (150 мкМ) при различных значениях рН (3.5–8.0).

Измерения спектров поглощения бенгальского розового в исследуемых растворах проводились на спектрофотометре Lambda 35 (Perkin Elmer). Образцы помещались при измерении при комнатной температуре в 1-см кювету. Спектры поглощения бенгальского розового регистрировались в диапазоне 400–700 нм.

1.2. Исследование спектров флуоресценции наномаркера бенгальского розового в растворах САЧ

На основе вышеуказанных буферных растворов были приготовлены растворы бенгальского розово-

го (3 мкМ) без добавления и с добавлением САЧ (10–150 мкМ) при различных значениях рН (3.5–8.0).

Исследования флуоресцентных характеристик бенгальского розового проводились на спектрофлуориметре LS 55 (Perkin Elmer) при комнатной температуре. Флуоресценция бенгальского розового возбуждалась светом $\lambda_{exc} = 540$ нм.

2. Обсуждение результатов

2.1. Молекулярная ассоциация бенгальского розового в растворах САЧ

В полученных спектрах поглощения бенгальского розового в растворах как без белка, так и с САЧ, наблюдается наличие двух максимумов поглощения — длинноволнового максимума мономеров бенгальского розового и коротковолнового максимума ассоциатов бенгальского розового. По полученным спектрам поглощения бенгальского розового определена величина степени его молекулярной ассоциации как в растворах без белка, так и с САЧ при различных значениях рН. Величина степени молекулярной ассоциации ($1 - X$) наномаркера представляет собой долю ассоциированных (в данном случае, димеров) молекул наномаркера ($1 - X$) в растворе (где X — доля мономерных молекул) и определяется по стандартной методике [11].

На рис. 1 представлены зависимости степени молекулярной ассоциации ($1 - X$) бенгальского розового от рН растворов без белка (а) и с САЧ (б). Видно, что при увеличении значения рН в рамках каждой концентрации бенгальского розового наблюдается уменьшение степени ассоциации его молекул как в растворах с САЧ, так и в растворах без белка. Данный эффект объясняется электростатическими причинами: при увеличении рН возрастает отрицательный заряд молекул бенгальского розового.

Для бенгальского розового значения рН его ионизируемых групп следующие: $pK(OH) = 2.6$ и $pK(COOH) = 4.0$. При значениях рН, меньших 2.6, бенгальский розовый находится в электрически нейтральной форме. При значениях $2.6 \leq pH \leq 4.0$ бенгальский розовый находится в форме моноаниона. При

значениях рН, больших 4.0, бенгальский розовый находится в форме дианиона.

С увеличением рН возрастает отрицательный заряд бенгальского розового, и усиливающееся взаимное отталкивание его молекул мешает образованию ассоциатов, причем чем больше величина рН, тем больше отрицательный заряд молекул и тем сильнее их отталкивание друг от друга.

При значениях рН, меньших 4.0, но больших 3.5, молекулы бенгальского розового сохраняют отрицательный заряд только на гидроксильной группе, и процессы их ассоциации происходят интенсивнее, чем на высоких значениях рН, больших 4.0.

Также видно (рис. 1), что степень ассоциации бенгальского розового, как в растворах без белка, так и в растворах с САЧ, возрастает с увеличением концентрации бенгальского розового.

Видно (рис. 1), что степень ассоциации молекул бенгальского розового в растворах САЧ меньше степени ассоциации молекул бенгальского розового в растворах без белка при соответствующих значениях рН и соответствующих концентрациях бенгальского розового, что объясняется связыванием бенгальского розового с молекулами САЧ и соответственно уменьшением доли несвязанных с белком молекул бенгальского розового, способных к образованию ассоциатов.

Обнаруженное в данной работе уменьшение степени молекулярной ассоциации бенгальского розового в растворах САЧ аналогично уменьшению в растворах САЧ степени молекулярной ассоциации трех других наномаркеров семейства флуоресцеина — флуоресцеина, эритрозина и эозина [6, 7].

Из сравнения степени молекулярной ассоциации бенгальского розового, полученной в данной работе, и степени молекулярной ассоциации других трех наномаркеров семейства флуоресцеина [6, 7] видно, что значения степени молекулярной ассоциации уменьшаются при увеличении электроотрицательности атомов, входящих в структурные формулы наномаркеров. Электроотрицательность атомов в структурных формулах наномаркеров семейства флуоресцеина возрастает

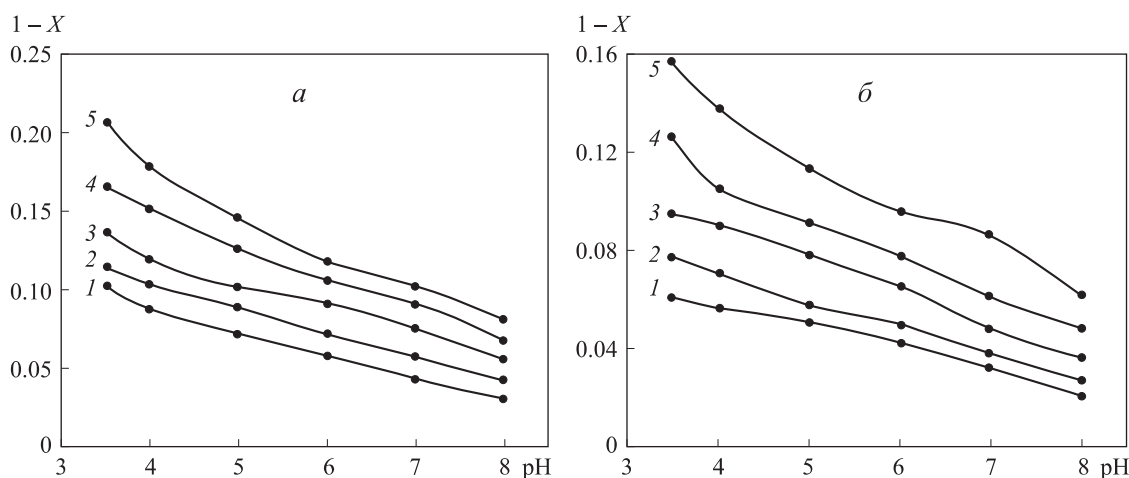


Рис. 1. Зависимость степени молекулярной ассоциации бенгальского розового от рН в растворах без белка (а) и с 150 мкМ САЧ (б) при различных концентрациях бенгальского розового: 3 мкМ (1), 10 мкМ (2), 20 мкМ (3), 30 мкМ (4), 50 мкМ (5)

в следующем направлении: флуоресцеин, эритрозин, эозин, бенгальский розовый.

2.2. Флуоресцентные характеристики наномаркера бенгальского розового в растворах САЧ

В ходе работы исследованы флуоресцентные характеристики наномаркера бенгальского розового в растворах САЧ при различных значениях рН.

Обнаружено, что максимумы спектров флуоресценции бенгальского розового в растворах с САЧ смещены в красную область по сравнению с максимумами спектров флуоресценции бенгальского розового в растворах без белка: например, при рН 3.5 максимум спектра флуоресценции бенгальского розового в растворах без белка находится на 563 нм, а в растворах с САЧ — на 572 нм.

На рис. 2 представлены зависимости интенсивности в максимуме спектра флуоресценции бенгальского розового от рН в растворах без белка и в растворах с САЧ. Видно, что в растворах без белка интенсивность в максимуме спектра флуоресценции бенгальского розового уменьшается, а затем выходит на постоянное значение с увеличением рН. При рН, больших 4.0 (рК СООН-группы бенгальского розового), молекулы бенгальского розового в среднем заряжены сильно отрицательно (дианионы), что вызывает их экранировку дипольными молекулами воды. При рН, меньших 4.0, но больших 3.5 (рК ОН-группы бенгальского розового 2.6), молекулы бенгальского розового в среднем слабо отрицательно заряжены (моноанионы), поэтому экранировка дипольными молекулами воды практически отсутствует.

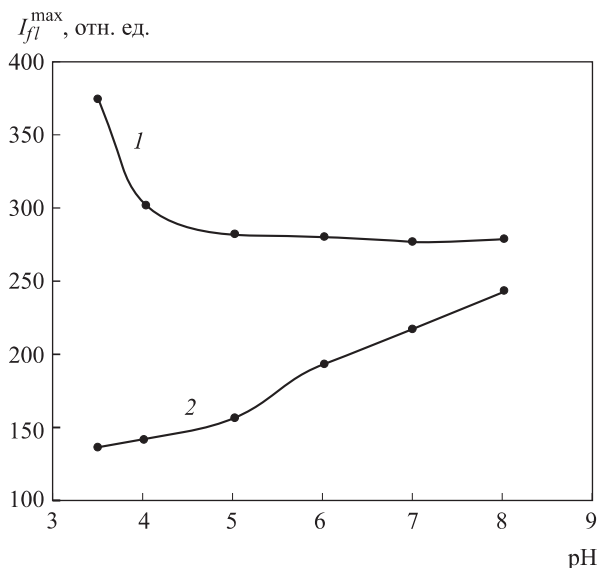


Рис. 2. Зависимость интенсивности в максимуме спектра флуоресценции бенгальского розового (3 мкМ) при $\lambda_{exc} = 540$ нм от рН в растворах без белка (1) и в растворах 150 мкМ САЧ (2)

В растворах САЧ происходит (рис. 2) тушение флуоресценции бенгальского розового. Низкая интенсивность флуоресценции бенгальского розового в растворах САЧ при значениях рН, меньших примерно 5.0, обусловлена интенсивным связыванием бенгальского

розового с белком: при значениях рН, меньших примерно 5.0, молекулы САЧ заряжены положительно (р1 4.7), а бенгальский розовый либо находится в форме моноаниона при $3.5 < \text{pH} < 4.0$, либо находится в форме дианиона при $4.0 < \text{pH} < 5.0$.

Увеличение интенсивности флуоресценции бенгальского розового в растворах САЧ при увеличении рН больше 5.0 обусловлено тем, что отрицательно заряженные молекулы САЧ и дианионы бенгальского розового плохо связываются, и это приводит к большому количеству несвязанного с белком бенгальского розового.

Обнаруженные в настоящей работе красный сдвиг спектров флуоресценции и тушение флуоресценции бенгальского розового в растворах САЧ аналогичны красному смещению спектров флуоресценции и тушению флуоресценции трех других наномаркеров семейства флуоресцеина — флуоресцеина, эритрозина и эозина — в растворах САЧ [6, 7, 9].

2.3. Константы тушения флуоресценции наномаркера бенгальского розового в растворах САЧ

В работе определены константы тушения флуоресценции бенгальского розового в растворах с САЧ (в случае одного сайта связывания на САЧ для одной молекулы бенгальского розового ($N = 1$) это эффективная константа связывания бенгальского розового с белком) при различных значениях рН.

При тушении флуоресценции наномаркера бенгальского розового в растворах добавлением различных концентраций тушителя — САЧ [12] можно согласно теории Штерна–Фольмера записать уравнение

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K \cdot [Q],$$

где F_0 — интенсивность флуоресценции бенгальского розового в отсутствие тушителя (САЧ), F — интенсивность флуоресценции бенгальского розового в присутствии тушителя (САЧ), $[Q]$ — концентрация тушителя — САЧ (приблизительно это общая концентрация белка в растворе), K — константа тушения флуоресценции бенгальского розового, или в случае одного сайта связывания на САЧ для одной молекулы бенгальского розового ($N = 1$) эффективная константа связывания бенгальского розового с белком (M^{-1}). Как показано [8], наномаркеры семейства флуоресцеина, к которому принадлежит бенгальский розовый, связываются с центром I САЧ и $N = 1$, поэтому по модели Штерна — Фольмера в данном случае определяются эффективные константы связывания бенгальского розового с САЧ.

График зависимости $F_0/F - 1$ от $[Q]$ представляет собой прямую линию с наклоном K в случае одного механизма связывания наномаркера с белком, а при наличии нескольких механизмов связывания наномаркера с белком наблюдаются отклонения от линейности. Из полученных экспериментальных данных по тушению флуоресценции бенгальского розового различными концентрациями САЧ (рис. 3) показано, что при всех значениях рН наблюдаются отклонения от линейности зависимости $F_0/F - 1$ от $[Q]$, что указывает на наличие одновременно нескольких механизмов связывания (ковалентного и ионного) бенгальского розового с САЧ.

Определенные по линейному тренду графиков Штерна–Фольмера константы связывания представляют

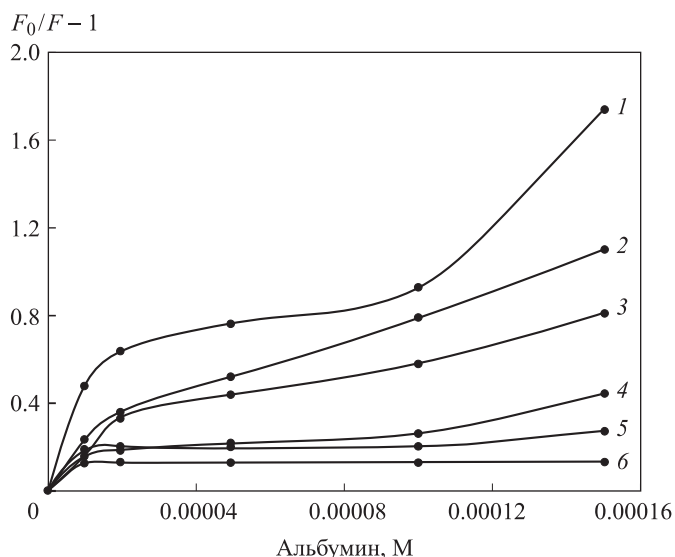


Рис. 3. Графики Штерна-Фольмера тушения флуоресценции бенгальского розового (3 мкМ) добавлением различных концентраций САЧ при различных значениях pH: 3.5 (1), 4.0 (2), 5.0 (3), 6.0 (4), 7.0 (5), 8.0 (6)

собой эффективные константы связывания бенгальского розового с САЧ при различных значениях pH, усреднено учитывающие все механизмы взаимодействия (и ковалентный, и ионный) наномаркера с белком. Введение эффективных констант (без разбивания графиков Штерна-Фольмера на несколько интервалов с различными константами) позволяет провести сравнение связывания бенгальского розового с САЧ со связыванием других наномаркеров семейства флуоресцеина с САЧ в исследуемом диапазоне pH.

В таблице представлены значения эффективных констант связывания бенгальского розового с САЧ при различных значениях pH. Видно, что максимально эффективное связывание бенгальского розового с САЧ имеет место при pH, меньших 5.0, что объясняется взаимным соотношением электрических зарядов САЧ и бенгальского розового: САЧ заряжен положительно, а бенгальский розовый либо в форме моноаниона при $3.5 < \text{pH} < 4.0$, либо в форме дианиона при $4.0 < \text{pH} < 5.0$.

Эффективные константы связывания бенгальского розового с САЧ

pH	3.5	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
K, M^{-1}	9250	6670	4820	2310	810	320

Как видно из таблицы, для бенгальского розового характерна монотонно убывающая зависимость эффективной константы связывания его с САЧ с ростом pH, что объясняется соотношением электрических зарядов бенгальского розового и САЧ: по мере увеличения pH белок становится отрицательно заряженным и все хуже связывается с бенгальским розовым.

Из сравнения значений эффективных констант связывания бенгальского розового с САЧ, определенных в данной работе, и эффективных констант связывания трех других наномаркеров семейства флуоресцеина с САЧ, определенных в [10], обнаружено, что наличие в молекуле наномаркера более электроотрицательного

атома приводит к уменьшению значений $\text{pK}(\text{COOH})$ и $\text{pK}(\text{OH})$ этих наномаркеров, что сказывается на взаимодействии их с САЧ — а именно наличие более электроотрицательного атома в молекуле наномаркера приводит к уменьшению значений эффективных констант связывания наномаркера с САЧ в области от pI САЧ (4.7) до физиологического значения pH (7.4). Как указывалось ранее, электроотрицательность атомов в структурных формулах наномаркеров семейства флуоресцеина возрастает в следующем направлении: флуоресцеин, эритрозин, эозин, бенгальский розовый.

Заключение

В работе проведен анализ флуоресцентных характеристик и молекулярной ассоциации наномаркера бенгальского розового, принадлежащего к семейству флуоресцеина, в растворах САЧ при различных значениях pH.

Определены значения степени молекулярной ассоциации бенгальского розового при различных значениях pH в растворах без белка и в растворах САЧ. Обнаружено уменьшение степени ассоциации бенгальского розового в растворах при добавлении в них САЧ. Показано, что степень молекулярной ассоциации бенгальского розового монотонно убывает с ростом значений pH как в растворах с САЧ, так и в растворах без белка. Обнаружено, что на значения степени молекулярной ассоциации наномаркеров семейства флуоресцеина, в частности бенгальского розового, оказывает влияние величина электроотрицательности атомов, входящих в структурные формулы наномаркеров, и значения pK их ионизируемых групп.

В настоящей работе зарегистрировано, что в растворах с САЧ происходят тушение флуоресценции и красный сдвиг максимума спектра флуоресценции бенгальского розового. Аналогичные закономерности характерны и для других наномаркеров семейства флуоресцеина, что обнаружено ранее нами [6, 7, 9].

По тушению флуоресценции бенгальского розового добавлением различных концентраций САЧ определены в рамках модели Штерна — Фольмера эффективные константы связывания наномаркера с молекулами САЧ при различных значениях pH. Показано, что зависимость эффективной константы связывания бенгальского розового с САЧ монотонно убывает с ростом pH, что объясняется взаимным соотношением электрических зарядов молекул САЧ и бенгальского розового. Обнаружено, что на значения эффективных констант связывания бенгальского розового с САЧ, как и на константы связывания всех наномаркеров семейства флуоресцеина с САЧ, оказывает влияние величина электроотрицательности атомов в структурных формулах наномаркеров и значения pK их ионизируемых групп.

Список литературы

1. Грызунов Ю.А., Добрецов Г.Е. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине. М., 1994.
2. Pelet S., Gratzel M., Moser J.-E. // J. Phys. Chem. B. 2003. **107**. С. 3215.
3. Waheed A.A., Sridhar Rao K., Gupta P.D. // Analyt. Biochem. 2000. **287**. С. 73.

4. Gao D., Tian Y., Liang F. et al. // J. Luminescence. 2007. **127**. С. 515.
5. Bhowmik B.B., Ganguly P. // Spectrochim. Acta. A. 2005. **61**. С. 1997.
6. Власова И.М., Салецкий А.М. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 2009. № 4. С. 52.
7. Vlasova I.M., Saletsky A.M. // Current Appl. Phys. 2009. **9**, N 5. С. 1027.
8. Vlasova I.M., Saletsky A.M. // Laser Phys. Lett. 2008. **5**, N 11. С. 834.
9. Vlasova I.M., Saletsky A.M. // J. Mol. Struct. 2009. **936**. С. 220.
10. Власова И.М., Салецкий А.М. // Журн. физической химии. 2010. **84**, № 6. С. 1181.
11. Левшин Л.В., Салецкий А.М. Оптические методы исследования молекулярных систем. М., 1994.
12. Тиноко И., Зауэр К., Вэнг Дж., Паггиси Дж. Физическая химия. Принципы и применение в биологических науках. М., 2005.

Fluorescent characteristics and molecular association of nanomarker Bengal Rose in human serum albumin solutions

I. M. Vlasova^a, A. A. Kuleshova, A. M. Saletsky^b

Department of General Physics, Faculty of Physics, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia.

E-mail: ^a vlasovairina1979@mail.ru, ^b sam@phys.msu.ru.

The decrease of degree of molecular association of Bengal Rose in solutions at addition of human serum albumin (HSA) is registered. There are red a shift of maximum of fluorescence spectrum and a quenching of fluorescence of Bengal Rose in HSA solutions. It is shown that the dependence of effective constant of binding of Bengal Rose to HSA on pH has decreasing character with increase of pH. It is registered, that the value of electronegativity of atoms in structural formulae of Bengal Rose and values of pK of its ionized groups have influence on values of degree of molecular association of Bengal Rose and on values of effective constants of binding of nanomarker to HSA.

Keywords: Bengal Rose, human serum albumin, fluorescence, molecular association, probe.

PACS: 87.83+a; 87.15-v.

Received 4 April 2011.

English version: *Moscow University Physics Bulletin* 5(2011).

Сведения об авторах

1. Власова Ирина Михайловна — канд. физ.-мат. наук, ст. преподаватель; тел.: (495) 939-14-89, e-mail: vlasovairina1979@mail.ru.
2. Кулешова Анна Александровна — студентка, e-mail: ak2210first@yandex.ru.
3. Салецкий Александр Михайлович — докт. физ.-мат. наук, профессор, зав. кафедрой; тел.: (495) 939-14-89, e-mail: sam@phys.msu.ru.