

## БИОФИЗИКА И МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

**Определение констант связывания наномаркеров семейства флуоресцеина с сывороточным альбумином человека**И. М. Власова<sup>a</sup>, Ю. А. Гордеева, А. А. Власов, А. М. Салецкий<sup>b</sup>*Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет, кафедра общей физики; кафедра квантовой теории и физики высоких энергий.**Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.**E-mail: <sup>a</sup> vlasovairina1979@mail.ru, <sup>b</sup> sam@phys.msu.ru*

Статья поступила 19.10.2011, подписана в печать 14.12.2011

С целью исследования связывающих центров сывороточного альбумина человека (САЧ), в том числе его лекарственных сайтов, и с целью моделирования связывания с САЧ флуоресцентных наномаркеров семейства флуоресцеина, являющихся простейшими аналогами ряда лекарственных препаратов, проведен анализ связывания данных наномаркеров с САЧ — с помощью трех различных моделей определены константы тушения флуоресценции наномаркеров, являющиеся фактически константами их связывания с САЧ, при различных значениях рН. Показано наличие двух механизмов связывания наномаркеров семейства флуоресцеина с САЧ и явления антикооперативности между ними. Обнаружены зависимости констант тушения флуоресценции наномаркеров (связывания их с белком) от рН: для флуоресцеина — нелинейная, для его галогенпроизводных (эритрозина, эозина, бенгальского розового) — монотонно убывающие с ростом рН. Показано, что электроотрицательность атомов в структурных формулах наномаркеров семейства флуоресцеина оказывает влияние на значения констант их связывания с САЧ.

*Ключевые слова:* флуоресцеин, эозин, эритрозин, бенгальский розовый, сывороточный альбумин человека, константа связывания.

УДК: 535.372.3. PACS: 87.83 A, 87.15 V.

**Введение**

Сывороточный альбумин человека (66.4 кДа, изоэлектрическая точка рI 4.7) представляет собой глобулярный белок плазмы крови. Уникальная способность молекулы сывороточного альбумина человека связывать обширный круг органических и неорганических лигандов определяет одну из основных функций этого белка — транспорт физиологических метаболитов и некоторых лекарственных препаратов. Основой взаимодействий молекулы сывороточного альбумина человека (САЧ) с лигандами является структурная подвижность этой белковой молекулы, обеспеченная уникальной петлевой укладкой единственной полипептидной цепи белка.

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 — носят ковалентный характер, вызывая химические модификации боковых радикалов аминокислотных остатков.

Большую роль в изучении физико-химических свойств связывающих центров САЧ играет метод флуоресцентных наномаркеров [2–5]. Для исследования САЧ непосредственно в плазме крови используют ани-

онные при физиологическом значении рН наномаркеры, например наномаркеры семейства флуоресцеина — исходное соединение флуоресцеин и его галогенпроизводные (тетрахлор-тетрайодпроизводная — бенгальский розовый, тетрабромпроизводная — эозин, тетраiod-производная — эритрозин). Ранее нами изучены процессы их молекулярной ассоциации в растворах САЧ [6–8], их флуоресцентные характеристики в растворах САЧ [6–10], исследованы механизмы их связывания с САЧ [10, 11].

Для практического использования наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах САЧ представляет интерес определение при различных значениях рН констант связывания наномаркеров с макромолекулами белка по спектрам их флуоресценции с использованием различных теоретических моделей, что и является целью настоящей работы.

Исследования связывания флуоресцентных наномаркеров семейства флуоресцеина с САЧ позволяют получать информацию о 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**

Были подготовлены следующие буферные растворы: 0.1 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  —  $\text{KOH}$  (рН 3.5–5.0) и 0.1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0.1 М  $\text{NaOH}$  (рН 6.0–8.0). На их основе были приготовлены растворы соответствующего нано-

маркера (флуоресцеина, бенгальского розового, эозина, эритрозина) с добавлением различных концентраций САЧ (10–150 мкМ) при различных значениях pH (3.5–8.0).

Исследования флуоресценции наномаркеров в растворах САЧ проводились на спектрофлуориметре LS 55 (Perkin Elmer) при комнатной температуре.

Флуоресценция наномаркеров в исследуемых растворах возбуждалась светом со следующими длинами волн: 1) флуоресцеин —  $\lambda_{ex}^{fl} = 440$  нм; 2) эритрозин —  $\lambda_{ex}^{eryth} = 530$  нм; 3) эозин —  $\lambda_{ex}^{eos} = 520$  нм; 4) бенгальский розовый —  $\lambda_{ex}^{fl} = 540$  нм.

## 2. Обсуждение результатов

Для различных значений pH построены зависимости  $(F_0/F) - 1$  от  $[Q]$ , где  $F_0$  — интенсивность флуоресценции наномаркера (для флуоресцеина — рис. 1, для эритрозина — рис. 2, для эозина — рис. 3, для бенгальского розового — в работе [8]) в отсутствие САЧ,  $F$  — интенсивность флуоресценции наномаркера в присутствии САЧ,  $[Q]$  — концентрация САЧ (приближенно это общая концентрация белка в растворе).

Видно, что полученные зависимости  $(F_0/F) - 1$  от  $[Q]$  имеют нелинейный характер. В растворах флуоресцентных наномаркеров с белком в условиях, описываемых в настоящей работе, определяющую роль в тушении флуоресценции наномаркеров при взаимодействии с белком играет образование комплексов, и тушение флуоресценции статическое. В этом случае отклонения от линейности зависимостей  $(F_0/F) - 1$  от  $[Q]$  объясняются несколькими типами механизмов (предположительно ионного и ковалентного) образования комплексов наномаркеров с белком.

Определенные из тушения флуоресценции наномаркеров добавлением различных концентраций САЧ константы тушения флуоресценции фактически ассоциируются с константами связывания наномаркеров с белком.

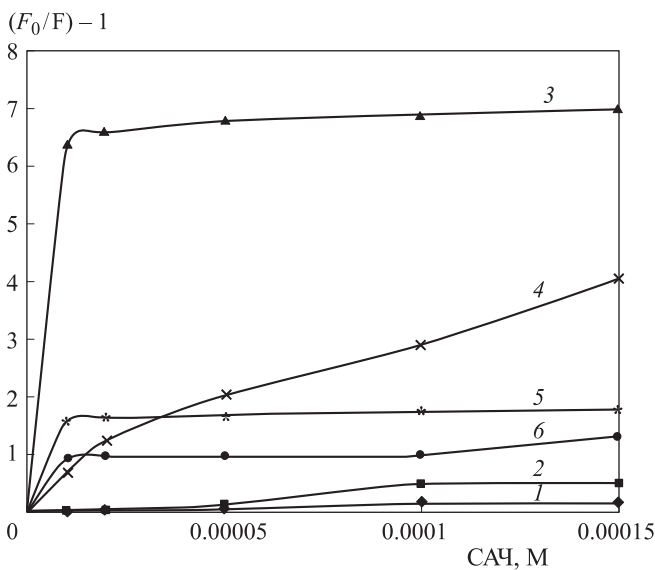


Рис. 1. Графики Штерна-Фольмера тушения флуоресценции флуоресцеина добавлением различных концентраций САЧ при различных значениях pH: 3.5 (1), 4.0 (2), 5.0 (3), 6.0 (4), 7.0 (5), 8.0 (6)

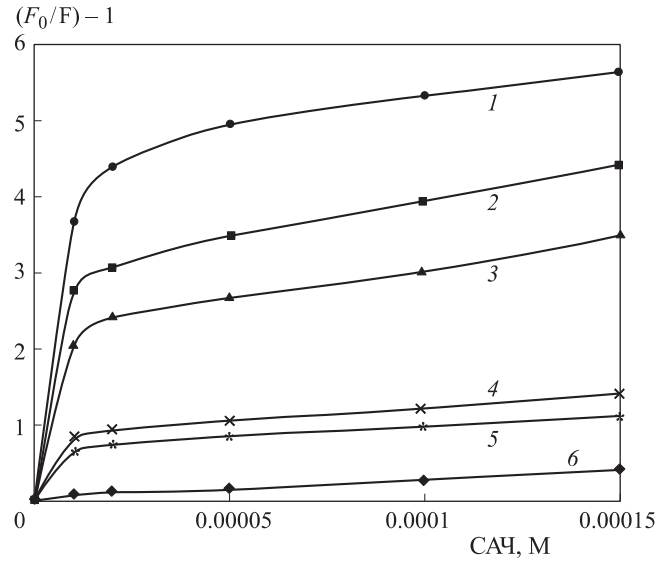


Рис. 2. Графики Штерна-Фольмера тушения флуоресценции эритрозина добавлением различных концентраций САЧ при различных значениях pH: 3.5 (1), 4.0 (2), 5.0 (3), 6.0 (4), 7.0 (5), 8.0 (6)

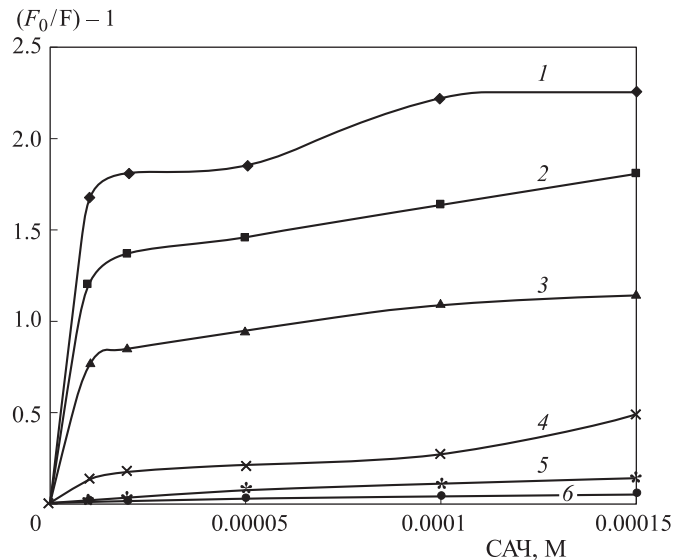


Рис. 3. Графики Штерна-Фольмера тушения флуоресценции эозина добавлением различных концентраций САЧ при различных значениях pH: 3.5 (1), 4.0 (2), 5.0 (3), 6.0 (4), 7.0 (5), 8.0 (6)

В работе рассмотрены три различные модели определения констант тушения флуоресценции наномаркеров при их взаимодействии с САЧ.

### 2.1. Первая модель. Простая модель Штерна-Фольмера

При тушении флуоресценции наномаркеров в растворах добавлением различных концентраций тушителя — САЧ можно, согласно теории Штерна-Фольмера [12], записать уравнение

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

где  $K$  — константа тушения флуоресценции наномаркера, определяющая связывание наномаркера с белком ( $M^{-1}$ ).

Данная модель описывает линейную зависимость  $(F_0/F) - 1$  от  $[Q]$ , поэтому для сложных нелинейных случаев можно говорить только о линии тренда данных зависимостей и соответственно о неких эффективных [8, 12] константах тушения флуоресценции (константах тренда  $K_{\text{eff}}$ ) наномаркеров в растворах САЧ, отражающих связывание наномаркеров с белком, при различных значениях рН (табл. 1). Определенные по линии тренда зависимостей  $(F_0/F) - 1$  от  $[Q]$  константы  $K_{\text{eff}}$  усреднено учитывают все механизмы взаимодействий наномаркеров с белком.

Таблица 1

**Эффективные константы (в рамках модели 1) тушения флуоресценции ( $K_{\text{eff}}$ ,  $M^{-1}$ ) наномаркеров в растворах САЧ, отражающие связывание наномаркеров с белком**

рН	Флуоресцеин	Эритрозин	Эозин	Бенгал. роз.
3.5	$0.85 \cdot 10^3$	$24.95 \cdot 10^3$	$9.58 \cdot 10^3$	$9.25 \cdot 10^3$
4.0	$3.61 \cdot 10^3$	$20.00 \cdot 10^3$	$7.85 \cdot 10^3$	$6.67 \cdot 10^3$
5.0	$24.39 \cdot 10^3$	$16.14 \cdot 10^3$	$5.18 \cdot 10^3$	$4.82 \cdot 10^3$
6.0	$24.79 \cdot 10^3$	$6.51 \cdot 10^3$	$2.57 \cdot 10^3$	$2.31 \cdot 10^3$
7.0	$6.17 \cdot 10^3$	$5.21 \cdot 10^3$	$0.84 \cdot 10^3$	$0.81 \cdot 10^3$
8.0	$4.97 \cdot 10^3$	$2.52 \cdot 10^3$	$0.34 \cdot 10^3$	$0.32 \cdot 10^3$

Из анализа данных, приведенных в табл. 1, следует, что максимально эффективное связывание флуоресцеина с САЧ имеет место при рН 5.0–6.0, т.е. когда молекулы флуоресцеина (рис. 4) либо слабо положительно заряжены, либо электрически нейтральны, а молекулы САЧ слабо отрицательно заряжены (рН 4.7). Максимально эффективное связывание эритрозина с САЧ имеет место при рН, меньших 5.0, т.е. когда белок в целом положительно заряжен, а эритрозин (рис. 4) или находится в нейтральной форме или находится в отрицательно заряженной форме моноаниона. Максимально эффективное связывание эозина с САЧ имеет место при рН, меньших 5.0, когда молекулы белка в целом положительно заряжены, а эозин (рис. 4) находится в отрицательно заряженной форме моноаниона. Максимально эффективное связывание бенгальского розового с САЧ имеет место при значениях рН, меньших 5.0, когда молекулы САЧ в целом положительно заряжены, а бенгальский розовый (рис. 4) находится

в отрицательно заряженных формах моноаниона или дианиона.

Из анализа данных, приведенных в табл. 1, следует, что характер зависимости эффективной константы связывания наномаркера с САЧ различается между флуоресцеином и его галогенпроизводными. Для флуоресцеина характерна нелинейная зависимость эффективной константы связывания его с белком от рН с максимумом примерно при рН 6.0. Галогенпроизводные флуоресцеина характеризуются монотонно убывающей зависимостью эффективной константы связывания их с САЧ от рН.

Из сравнения значений эффективных констант (модель 1, табл. 1) связывания наномаркеров семейства флуоресцеина с САЧ обнаружено, что наличие в молекуле наномаркера более электроотрицательного атома приводит к уменьшению значений эффективных констант связывания наномаркера с САЧ в области от рН САЧ (4.7) до физиологического значения рН 7.4. Увеличение электроотрицательности происходит в направлении флуоресцеин — эритрозин — эозин — бенгальский розовый.

### 3.2. Вторая модель. Разбиение зависимостей $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$ на два линейных случая

Для более точного описания полученных зависимостей  $(F_0/F) - 1$  от  $[Q]$  их можно разложить в рамках модели 2 на две составляющие — в области концентраций САЧ до 20 мкМ и в области концентраций САЧ больше 20 мкМ, — каждую из которых можно линейно аппроксимировать и получить соответственно две константы (табл. 2) тушения флуоресценции наномаркеров, отражающие различные виды взаимодействий наномаркеров с САЧ.

Из данных табл. 2 видно, что обе константы тушения флуоресценции  $K_1$  и  $K_2$  галогенпроизводных флуоресцеина, полученные в данной модели 2, имеют монотонно убывающий с ростом рН характер, что повторяет характер зависимости эффективной константы  $K_{\text{eff}}$  тушения их флуоресценции, полученной в модели 1. Также видно, что обе константы тушения флуоресценции  $K_1$  и  $K_2$  флуоресцеина, полученные в данной модели 2, имеют нелинейный характер —  $K_1$  с максимумом при рН 5.0 и  $K_2$  с максимумом при рН 6.0, что повторяет нелинейный характер зависимости эффективной кон-

Таблица 2

**Константы (в рамках модели 2) тушения флуоресценции ( $K_1$  — в области концентраций САЧ до 20 мкМ,  $K_2$  — в области концентраций САЧ больше 20 мкМ) наномаркеров в растворах САЧ, отражающие связывание наномаркеров с белком**

рН	Флуоресцеин		Эритрозин		Эозин		Бенгал. роз.	
	$K_1, M^{-1}$	$K_2, M^{-1}$	$K_1, M^{-1}$	$K_2, M^{-1}$	$K_1, M^{-1}$	$K_2, M^{-1}$	$K_1, M^{-1}$	$K_2, M^{-1}$
3.5	$0.02 \cdot 10^4$	$0.96 \cdot 10^3$	$37.11 \cdot 10^4$	$9.23 \cdot 10^3$	$16.74 \cdot 10^4$	$3.87 \cdot 10^3$	$4.80 \cdot 10^4$	$3.64 \cdot 10^3$
4.0	$0.20 \cdot 10^4$	$3.81 \cdot 10^3$	$27.91 \cdot 10^4$	$8.95 \cdot 10^3$	$12.03 \cdot 10^4$	$3.34 \cdot 10^3$	$2.24 \cdot 10^4$	$3.04 \cdot 10^3$
5.0	$63.82 \cdot 10^4$	$3.05 \cdot 10^3$	$20.50 \cdot 10^4$	$8.41 \cdot 10^3$	$7.67 \cdot 10^4$	$2.45 \cdot 10^3$	$1.53 \cdot 10^4$	$2.18 \cdot 10^3$
6.0	$6.66 \cdot 10^4$	$21.20 \cdot 10^3$	$8.36 \cdot 10^4$	$3.70 \cdot 10^3$	$1.28 \cdot 10^4$	$2.30 \cdot 10^3$	$1.10 \cdot 10^4$	$1.99 \cdot 10^3$
7.0	$15.52 \cdot 10^4$	$1.02 \cdot 10^3$	$6.34 \cdot 10^4$	$2.93 \cdot 10^3$	$0.18 \cdot 10^4$	$0.70 \cdot 10^3$	$0.15 \cdot 10^4$	$0.54 \cdot 10^3$
8.0	$9.11 \cdot 10^4$	$2.41 \cdot 10^3$	$0.58 \cdot 10^4$	$2.43 \cdot 10^3$	$0.03 \cdot 10^4$	$0.29 \cdot 10^3$	$0.03 \cdot 10^4$	$0.15 \cdot 10^3$

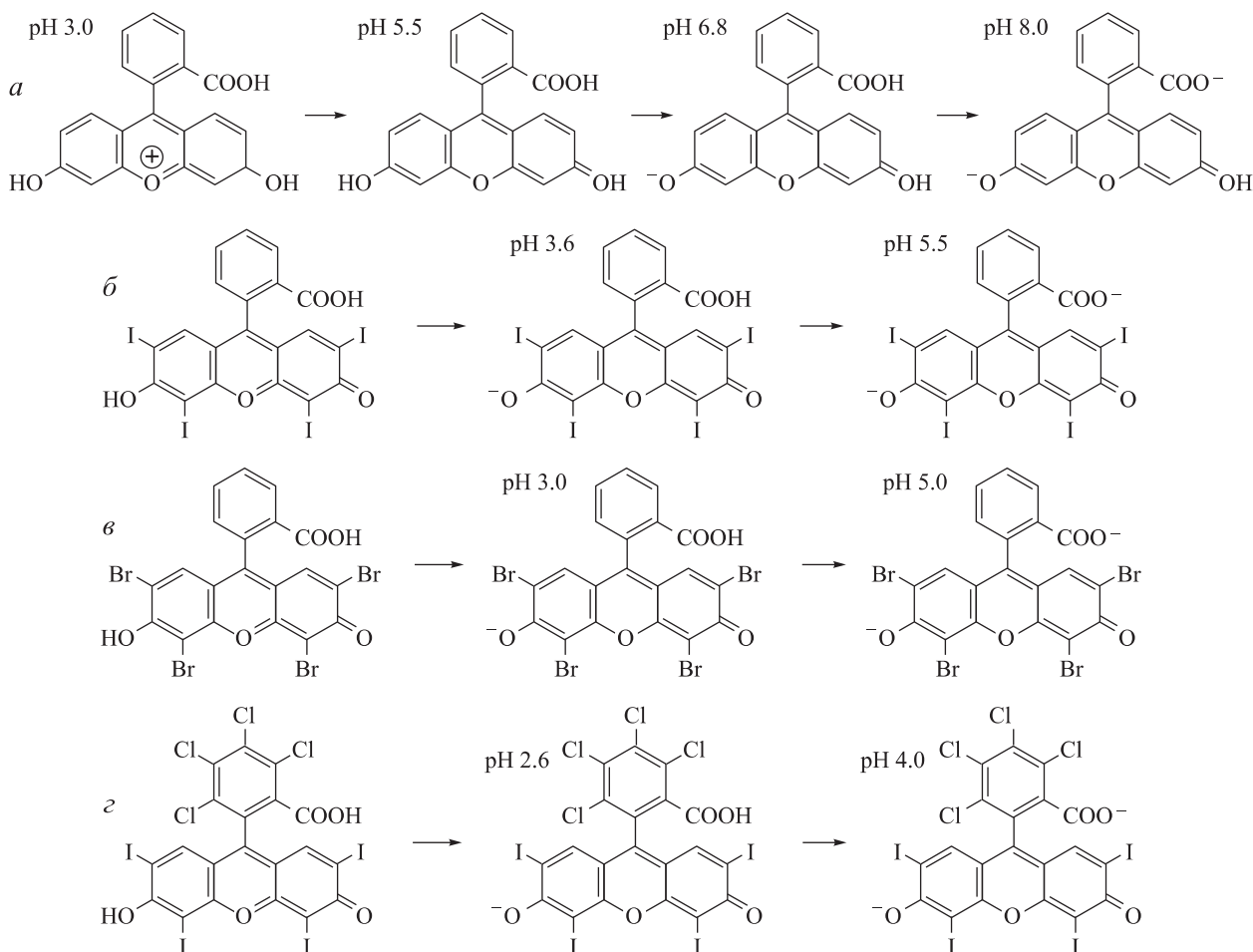


Рис. 4. Структурные формулы наномаркеров семейства флуоресцеина и значения рК их ионизируемых групп: а — флуоресцеин, б — эритрозин, в — эозин, г — бенгальский розовый

Таблица 3

Константы (в рамках модели 3) тушения флуоресценции ( $K_{sigm}$ ) наномаркеров в растворах САЧ, отражающие связывание наномаркеров с белком, где  $n$  — кооперативность

pH	Флуоресцеин		Эритрозин		Эозин		Бенгал. роз.	
	$K_{sigm}, M^{-1}$	$n$	$K_{sigm}, M^{-1}$	$n$	$K_{sigm}, M^{-1}$	$n$	$K_{sigm}, M^{-1}$	$n$
3.5	$0.08 \cdot 10^4$	0.98	$68.00 \cdot 10^4$	0.15	$45.70 \cdot 10^4$	0.13	$1.43 \cdot 10^4$	0.51
4.0	$0.35 \cdot 10^4$	0.97	$34.00 \cdot 10^4$	0.17	$6.00 \cdot 10^4$	0.13	$0.72 \cdot 10^4$	0.62
5.0	$54.00 \cdot 10^4$	0.13	$21.00 \cdot 10^4$	0.19	$1.79 \cdot 10^4$	0.13	$0.44 \cdot 10^4$	0.64
6.0	$5.42 \cdot 10^4$	0.65	$2.95 \cdot 10^4$	0.20	$0.11 \cdot 10^4$	0.50	$0.11 \cdot 10^4$	0.64
7.0	$37.00 \cdot 10^4$	0.13	$0.87 \cdot 10^4$	0.21	$0.04 \cdot 10^4$	0.70	$0.04 \cdot 10^4$	0.65
8.0	$2.17 \cdot 10^4$	0.11	$0.23 \cdot 10^4$	0.91	$0.02 \cdot 10^4$	0.80	$0.01 \cdot 10^4$	0.86

станты ( $K_{eff}$ ) тушения флуоресценции флуоресцеина, полученной в модели 1.

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

**2.3. Третья модель. Описание зависимостей ( $F_0/F$ ) – 1 сигмоидальной функцией**

При нелинейном характере зависимости ( $F_0/F$ ) – 1 от  $[Q]$  тушение флуоресценции наномаркеров в растворах добавлением различных концентраций белка можно записать следующим образом:

где  $n$  — коэффициент Хилла или коэффициент кооперативности,  $K_{sigm}$  — константа тушения флуоресценции наномаркеров, фактически константа связывания наномаркеров с белком ( $M^{-1}$ ),  $K_{sigm} = \sqrt[n]{K}$ .

В рамках данной модели 3, основанной на использовании сигмоидальной (при  $n < 1$ ) функции описания тушения флуоресценции, определены константы тушения флуоресценции наномаркеров (табл. 3), от-

ражающие их связывание с белком, и коэффициенты кооперативности.

Из данных табл. 3 видно, как и в предыдущих моделях, константы тушения флуоресценции галогенпроизводных флуоресцеина имеют монотонно убывающий характер с ростом pH, что указывает на сильное взаимодействие данных наномаркеров с белком при низких значениях pH. Из данных табл. 3 видно, что зависимость константы тушения флуоресценции флуоресцеина от pH имеет нелинейный характер с максимумом при pH 5.0.

Из данных табл. 3 видно, что в связывании наномаркеров семейства флуоресцеина с САЧ имеет место явление антикооперативности, которое связано с конкуренцией двух механизмов взаимодействия (предположительно ионного и ковалентного) наномаркеров с белком.

### Заключение

В работе с помощью трех различных моделей определены константы тушения флуоресценции наномаркеров семейства флуоресцеина, являющиеся фактически константами их связывания с САЧ при различных значениях pH. Полученные значения констант тушения флуоресценции наномаркеров, отражающих их связывание с белком, и значения коэффициентов кооперативности, естественно, не должны рассматриваться в смысле их абсолютных значений, они должны рассматриваться только для сравнения этих величин в зависимости от pH и типа наномаркера в рамках отдельной модели.

С помощью модели 2 показано наличие двух механизмов связывания наномаркеров семейства флуоресцеина с САЧ — предположительно ионного и ковалентного. С помощью модели 3 показано наличие явления антикооперативности между двумя механизмами связывания наномаркеров семейства флуоресцеина с САЧ.

Определены различия в зависимостях констант тушения флуоресценции наномаркеров (связывания их

с белком) от pH: для флуоресцеина зависимость нелинейная, а у галогенпроизводных флуоресцеина зависимость монотонно убывающая с ростом pH.

Показано, что электроотрицательность атомов в структурных формулах наномаркеров семейства флуоресцеина оказывает влияние на значения констант тушения флуоресценции наномаркеров или констант связывания наномаркеров с САЧ. В рамках модели 1 обнаружено, что наличие в молекуле наномаркера более электроотрицательного атома приводит к уменьшению значений эффективных констант связывания наномаркера с САЧ в области от pH САЧ 4.7 до физиологического значения pH 7.4.

### Список литературы

1. Грызунов Ю.А., Добрецов Г.Е. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине. М., 1994.
2. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. М., 1989.
3. Левшин Л.В., Салецкий А.М. Оптические методы исследования молекулярных систем. М., 1994.
4. Pelet S., Gratzel M., Moser J.-E. // J. Phys. Chem. B. 2003. **107**. P. 3215.
5. Birla L., Prieto B., Noguel T. et al. // Rev. Roumaine Chimie. 2007. **52**, N 7. P. 639.
6. Власова И.М., Салецкий А.М. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 2009. № 4. С. 52.
7. Vlasova I.M., Saletsky A.M. // Curr. Appl. Phys. 2009. **9**, N 5. P. 1027.
8. Власова И.М., Кулешова А.А., Салецкий А.М. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 2011. № 5. С. 44.
9. Vlasova I.M., Bukharova E.M., Kuleshova A.A., Saletsky A.M. // Curr. Appl. Phys. 2011. **11**, N 5. P. 1126.
10. Vlasova I.M., Saletsky A.M. // J. Mol. Struct. 2009. **936**. P. 220.
11. Vlasova I.M., Saletsky A.M. // Laser Phys. Lett. 2008. **5**, N 11. P. 834.
12. Тиноко И., Зауэр К., Вэнг Дж., Паггиси Дж. Физическая химия. Принципы и применение в биологических науках. М., 2005.

### Determination of constants of binding of nanomarkers of fluorescein family to human serum albumin

I. M. Vlasova<sup>a</sup>, Ju. A. Gordeeva, A. A. Vlasov\*, A. M. Saletsky<sup>b</sup>

Department of General Physics; \* Department of Quantum Theory and High Energy Physics, Faculty of Physics, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia.

E-mail: <sup>a</sup> vlasovairina1979@mail.ru, <sup>b</sup> sam@phys.msu.ru.

With the help of three various models the constant of quenching of fluorescence of nanomarkers of fluorescein family, actually constants of its binding to human serum albumin (HSA), at different values of pH are determined. The presence of two mechanisms of binding of nanomarkers of fluorescein family to HSA and anti-cooperativity are shown. The dependences of constants of quenching fluorescence of nanomarkers on pH were found out: for fluorescein — non-linear, for its halogen-derivatives (erythrosin, eosin, Bengal rose) — monotone decreasing with increase of pH. It is shown, that electronegativity of atoms in structural formulas of nanomarkers of fluorescein family influences on values of constants of binding of nanomarkers to HSA.

*Key words:* fluorescein, eosin, erythrosin, Bengal rose, human serum albumin, binding constant.

PACS: 87.83 A, 87.15 V.

Received 19 October 2011.

English version: *Moscow University Physics Bulletin* 2(2012).

### Сведения об авторах

1. Власова Ирина Михайловна — канд. физ.-мат. наук, ст. преподаватель; тел. (495) 939-14-89, e-mail: vlasovairina1979@mail.ru.

2. Гордеева Юлия Анатольевна — канд. физ.-мат. наук, мл. науч. сотрудник; тел. (495) 939-14-89, e-mail: julian@mail.ru.

3. Власов Александр Анатольевич — докт. физ.-мат. наук, профессор; тел. (495) 939-16-47, e-mail: aav1956@mail.ru.

4. Салецкий Александр Михайлович — докт. физ.-мат. наук, профессор, зав. кафедрой; тел. (495) 939-14-89, e-mail: sam@phys.msu.ru.