БИОФИЗИКА И МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

Исследование вращательной диффузии флуоресцентного наномаркера бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека

И. М. Власова[1,a], Д. В. Полянский[1,b], А. А. Власов[2], А. М. Салецкий[1]

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет,
[1] кафедра общей физики; [2] кафедра квантовой теории и физики высоких энергий.
Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.
E-mail: [a] vlasovairina1979@mail.ru, [b] polyan84@mail.ru

Статья поступила 26.06.2012, подписана в печать 07.12.2012.

Проведены исследования поляризованной флуоресценции бенгальского розового и выполнен расчет параметров его вращательной диффузии в растворах САЧ. Обнаружено увеличение степени поляризации флуоресценции, времени вращательной релаксации и эффективного гидродинамического радиуса бенгальского розового, а также уменьшение коэффициента вращательной диффузии в растворах САЧ. При сравнении бенгальского розового с другими наномаркерами данного гомологичного семейства обнаружено влияние величины электроотрицательности атомов в структурной формуле наномаркера на параметры его вращательной диффузии.

Ключевые слова: бенгальский розовый, сывороточный альбумин человека, поляризованная флуоресценция, вращательная диффузия.

УДК: 535.372.3. PACS: 87.15.Mi; 87.15.Vv.

Введение

В работе представлены полученные по анализу поляризованной флуоресценции результаты исследований вращательной диффузии флуоресцентного наномаркера бенгальского розового, принадлежащего к семейству флуоресцеина, в растворах сывороточного альбумина человека (САЧ) при различных значениях pH.

САЧ (66.4 кДа, изоэлектрическая точка pI 4.7) — 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 носят ковалентный характер.

Большую роль в изучении физико-химических свойств связывающих центров САЧ играет метод флуоресцентных наномаркеров, являющихся низкомолекулярными лигандами для САЧ [2–6]. В частности, при изучении САЧ применяют анионные при физиологическом значении pH (7.4) флуоресцентные наномаркеры, такие как бенгальский розовый, являющийся тетрахлор-тетрайодпроизводной флуоресцеина. К флуоресцентным наномаркерам семейства флуоресцеина также относятся исходное соединение флуоресцеин, его тетрайод-производная эритрозин и его тетрабром-производная эозин. Ранее нами изучены процессы молекулярной ассоциации всех четырех наномаркеров семейства флуоресцеина (флуоресцеин, эритрозин, эозин и бенгальский розовый) в растворах САЧ [7–12], проанализированы их флуоресцентные характеристики в растворах САЧ [8–12], исследованы механизмы их связывания с САЧ [10, 12–14], рассчитаны константы тушения флуоресценции этих наномаркеров при взаимодействии их с САЧ [10, 12, 13, 15] и определены параметры вращательной диффузии трех наномаркеров (флуоресцеин, эритрозин и эозин) в растворах САЧ [13, 16].

В настоящей работе представлены исследования поляризованной флуоресценции бенгальского розового в растворах САЧ и определены параметры вращательной диффузии этого наномаркера в растворах САЧ при различных значениях pH.

Исследования вращательной диффузии бенгальского розового в растворах САЧ и, следовательно, взаимодействия бенгальского розового с САЧ при различных значениях pH позволяют получать информацию о свойствах связывающих центров САЧ и о механизмах регуляции связывающих свойств белка посредством вариации pH, 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 M CH_3COOH — KOH (pH 3.5–5.0) и 0.1 M KH_2PO_4 — 0.1 M NaOH (pH 6.0–8.0), все компоненты буферных растворов производства фирмы «Реахим» (Россия). На их основе были приготовлены растворы 3 мкM бенгальского розового (Химбимед, Россия) как без белка, так и со 150 мкM САЧ (НПО «Микро-

ген») с добавлением различных концентраций сахарозы (0–200 мМ) при различных значениях pH (3.5–8.0).

Исследования флуоресценции бенгальского розового в растворах САЧ проводились на спектрофлуориметре LS 55 (Perkin Elmer) при комнатной температуре. Флуоресценция бенгальского розового в исследуемых растворах возбуждалась светом $\lambda_{\text{exc}} = 540$ нм. Степень поляризации P флуоресценции бенгальского розового в исследуемых растворах рассчитывалась по значениям $I_{\parallel}$ и $I_{\perp}$ в максимуме спектра испускания флуоресценции наномаркера, где $I_{\parallel}$ и $I_{\perp}$ — интенсивности свечений, поляризованных по двум взаимоперпендикулярным направлениям. Спектры флуоресценции обрабатывались программой Perkin Elmer FL Winlab.

2. Обсуждение результатов

Исследована поляризованная флуоресценция бенгальского розового как в растворах без белка, так и в растворах с САЧ при различных значениях pH.

Определена (рис. 1) степень поляризации P флуоресценции бенгальского розового как в растворах с САЧ, так и в растворах без белка при различных значениях pH. Видно (рис. 1), что при всех значениях pH степень поляризации флуоресценции бенгальского розового в растворах САЧ больше, чем в растворах без белка. Увеличение степени поляризации флуоресценции бенгальского розового в белковых растворах объясняется связыванием данного наномаркера с САЧ [11, 15].

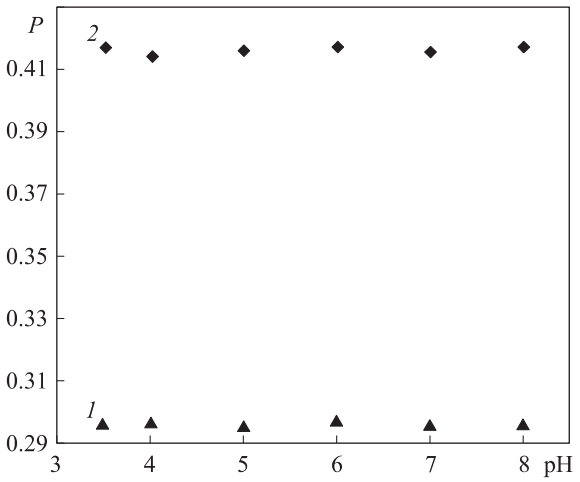

Рис. 1. Зависимость от pH степени поляризации флуоресценции бенгальского розового (3 мкМ) в растворах без белка (*1*) и в растворах с 150 мкМ САЧ (*2*)

Также видно, что степень поляризации флуоресценции бенгальского розового не зависит от pH как в растворах с САЧ, так и в растворах без белка (в диапазоне $3.5 \leqslant \text{pH} \leqslant 8.0$). Данная независимость степени поляризации флуоресценции бенгальского розового от pH аналогична ситуациям с эозином и эритрозином [13, 16], также являющимися галоген-производными флуоресцеина. В этом состоит отличие галоген-производных флуоресцеина от исходного соединения этого семейства наномаркеров — флуоресцеина, у которого зависимость степени поляризации флуоресценции от pH имеет нелинейный вид с максимумом при pH 6.0 [13, 16]. Таким образом, результаты по степени поляризации флуоресценции бенгальского розового, полученные в данной работе, продолжают и подтверждают полученные ранее результаты по другим наномаркерам этого семейства.

Поскольку растворы бенгальского розового данной концентрации являются разбавленными растворами, то в отсутствие безызлучательного переноса энергии между молекулами наномаркера основной причиной деполяризации флуоресценции является вращательная диффузия молекул наномаркера.

Метод поляризованной флуоресценции позволяет оценивать параметры вращательной диффузии флуорофоров [17–19]. Количественная теория вращательной деполяризации была предложена В. Л. Левшиным и Ф. Перреном с использованием модели вращательной диффузии. На основе этой теории было получено выражение для степени поляризации P флуоресценции:

$$\frac{1}{P} = \frac{1}{P_0} + \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3}\right) \cdot \frac{kT\tau_0}{V\eta},$$

где T — абсолютная температура, η — вязкость раствора, V — объем, k — постоянная Больцмана, τ_0 — среднее время жизни возбужденных молекул, P_0 — предельная степень поляризации флуоресценции. Данная зависимость получила название формулы Левшина–Перрена. Таким образом, меняя либо вязкость растворов, либо их температуру и откладывая на оси ординат $1/P$, а по оси абсцисс T/η, получаем прямую линию, которая отсекает на оси ординат отрезок, равный $1/P_0$.

Тангенс угла наклона этой прямой к оси абсцисс

$$\operatorname{tg}\varphi = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3}\right) \cdot \frac{k\tau_0}{V}$$

при известном значении τ_0 позволяет определить величину молекулярного объема

$$V = \frac{(3 - P_0) \cdot k \cdot \tau_0}{3 \cdot P_0 \cdot \operatorname{tg}\varphi}$$

и, следовательно, эффективный гидродинамический радиус Эйнштейна a, связанный с молекулярным объемом соотношением

$$V = \frac{4\pi a^3}{3}.$$

Используя эти данные, можно определить время вращательной релаксации (или разупорядочивания вследствие тепловой диффузии) ξ флуорофора по формуле

$$\xi = \frac{V\eta}{Tk},$$

где V — молекулярный объем.

Для флуорофоров можно определить коэффициент вращательной диффузии D_{rot}:

$$D_{\text{rot}} = \frac{kT}{6\eta V}.$$

В настоящей работе путем варьирования вязкости растворов добавлением различных концентраций сахарозы определены время вращательной релаксации, коэффициент вращательной диффузии и эффективный гидродинамический радиус Эйнштейна бенгальского розового как в растворах с САЧ, так и в растворах без белка, при различных значениях pH.

На рис. 2 представлены зависимости коэффициента вращательной диффузии D_{rot} бенгальского розового от значения pH как в растворах без белка, так и в растворах с САЧ. При всех значениях pH в растворах с САЧ коэффициент вращательной диффузии бенгальского розового меньше, чем в растворах без белка (рис. 2), что объясняется связыванием наномаркера с белком.

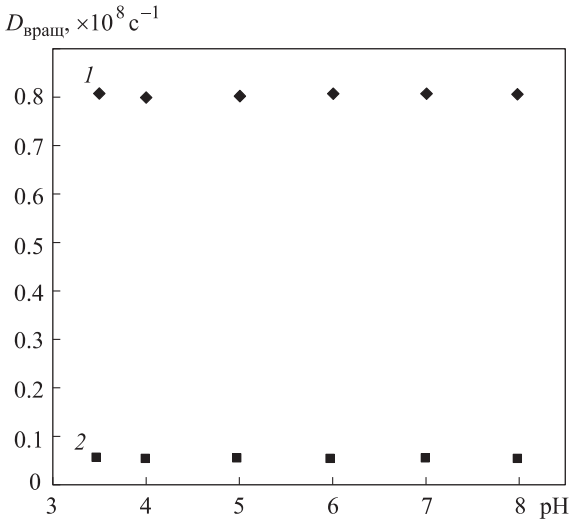

Рис. 2. Зависимость от pH коэффициента вращательной диффузии бенгальского розового (3 мкМ) в растворах без белка (*1*) и в растворах с 150 мкМ САЧ (*2*)

Как в растворах САЧ, так и в растворах без белка коэффициент вращательной диффузии бенгальского розового не зависит от pH (при $3.5 \leqslant pH \leqslant 8.0$). Аналогичный результат для эозина и эритрозина, также являющихся галоген-производными флуоресцеина, был получен в работах [13, 16]. Тогда как у самого флуоресцеина [13, 16] зависимость коэффициента вращательной диффузии от pH нелинейна с минимумом при pH 6.0.

Наблюдаемый факт можно объяснить следующим образом. При наличии слабо электроотрицательных атомов (водород) в структурной формуле наномаркера (флуоресцеин) воздействие полярной окружающей среды на вращательную диффузию флуоресцеина слабое, и поэтому основное влияние на вращательную диффузию оказывает молекулярная ассоциация наномаркера и степень эффективности его связывания с белком, зависящие от pH. Это приводит в свою очередь к зависимости вращательной диффузии наномаркера от pH.

Тогда как при наличии сильно электроотрицательных атомов (бром, йод, хлор) в структурных формулах наномаркеров (эозин, эритрозин и бенгальский розовый) имеет место очень сильное взаимодействие наномаркеров с полярной окружающей средой, что приводит к независимости вращательной диффузии наномаркеров от их молекулярной ассоциации и от степени эффективности их связывания с белком, зависящих от pH, и, следовательно, к независимости вращательной диффузии наномаркеров от pH.

В таблице представлены значения времени вращательной релаксации ξ бенгальского розового в растворах без белка и в растворах с САЧ при различных значениях pH. В растворах без белка время вращательной релаксации бенгальского розового существенно меньше, чем в растворах с САЧ, при всех исследованных значениях pH (3.5–8.0).

Время вращательной релаксации (нс) молекул бенгальского розового (3 мкМ) в растворах без белка и с САЧ (150 мкМ) при различных значениях pH

pH	Без белка	САЧ
3.5	2.07	33.0
4.0	2.08	33.7
5.0	2.09	33.6
6.0	2.07	33.5
7.0	2.08	33.4
8.0	2.07	33.2

В растворах без белка бенгальский розовый имеет небольшое время вращательной релаксации, меньшее времени жизни его флуоресценции, что приводит к слабой поляризации его флуоресценции в растворах без белка. В растворах с САЧ по причине связывания с белком бенгальский розовый имеет время вращательной релаксации, большее времени жизни его флуоресценции, что дает увеличение поляризации его флуоресценции в растворах с САЧ по сравнению с растворами без белка.

В работе также определены значения эффективного гидродинамического радиуса Эйнштейна *a* бенгальского розового (рис. 3) как в растворах САЧ, так и в растворах без белка при различных значениях pH. В растворах без белка эффективный радиус бенгальского розового практически соответствует реальному размеру молекулы наномаркера, а в растворах с САЧ эффективный радиус бенгальского розового является не реальным размером, а представляет собой эффективный размер, связанный с процентным содержанием связанного с белком наномаркера от его общего количества в растворе.

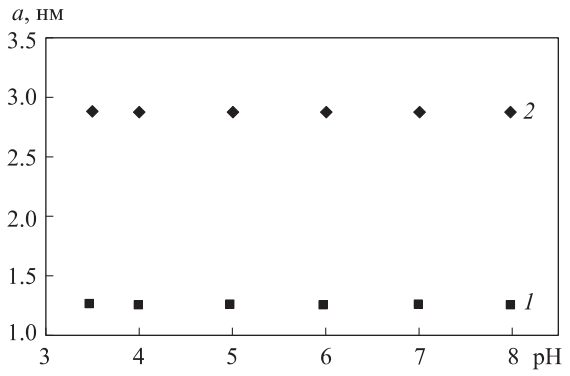

Рис. 3. Зависимость от pH эффективного гидродинамического радиуса бенгальского розового (3 мкМ) в растворах без белка (*1*) и в растворах с 150 мкМ САЧ (*2*)

Видно (рис. 3), что, как в растворах без белка, так и в растворах с САЧ, эффективный радиус молекул бенгальского розового практически не зависит

от pH, аналогичная ситуация была зарегистрирована для эозина и эритрозина в [13, 16]. В растворах без белка эффективный радиус бенгальского розового в среднем при различных значениях pH равен 1.28 нм, а в растворах с белком возрастает примерно до 2.87 нм, следовательно, в растворах с САЧ далеко не весь бенгальский розовый связывается с белком.

Заключение

Проведенные в настоящей работе исследования поляризованной флуоресценции бенгальского розового и выполненный расчет параметров вращательной диффузии (коэффициент вращательной диффузии, время вращательной релаксации, гидродинамический эффективный радиус) бенгальского розового указывают на существенное изменение характеристик этого наномаркера в растворах САЧ по сравнению с растворами без белка: в растворах с САЧ увеличиваются степень поляризации флуоресценции, время вращательной релаксации и эффективный гидродинамический радиус бенгальского розового, при этом его коэффициент вращательной диффузии уменьшается. Столь заметное изменение характеристик бенгальского розового при связывании его с САЧ дает широкие возможности для использования его в качестве маркера для САЧ, в частности для исследования лекарственных сайтов САЧ посредством связывания с ними данного наномаркера.

При этом видно, что поляризованная флуоресценция и определенные из теории вращательной деполяризации параметры вращательной диффузии регистрируют факт связывания бенгальского розового с САЧ при всех исследованных значениях pH, но при этом не отражают эффективность связывания бенгальского розового с САЧ в зависимости от pH, обнаруженную по неполяризованной флуоресценции в работах [11, 12]. Данный наблюдаемый факт для поляризованной флуоресценции бенгальского розового в растворах САЧ объясняется наличием сильно электроотрицательных атомов хлора и йода в его структурной формуле этих наномаркеров и влиянием их на его вращательную диффузию.

Следовательно, для регистрации факта связывания бенгальского розового с САЧ подходят как неполяризованная, так и поляризованная флуоресценция бенгальского розового, но для исследования связывающих свойств САЧ при вариации параметров значения pH больше подходит анализ неполяризованной флуоресценции этого наномаркера.

При сравнении наномаркеров семейства флуоресцеина (флуоресцеина по [13, 16], эритрозина по [13, 16], эозина по [13, 16] и бенгальского розового по данным, полученным в этой работе) между собой были обнаружены отличия в параметрах их вращательной диффузии, которые определяются величиной электроотрицательности атомов боковых радикалов в их структурных формулах. При сравнении поляризованной флуоресценции наномаркеров между собой обнаружено, что увеличение электроотрицательности радикалов боковых групп в структурных формулах наномаркеров (водород — йод — бром — хлор) приводит к увеличению степени поляризации их флуоресценции, к уменьшению коэффициента их вращательной диффузии, к увеличению времени их вращательной релаксации, к увеличению эффективного радиуса Эйнштейна.

Спектроскопия флуоресцентных наномаркеров в настоящее время открывает широкие перспективы в исследованиях строения и свойств белков плазмы крови. Полученные результаты могут быть полезны при внедрении флуоресцентной спектроскопии в исследования регуляции связывающих свойств САЧ и в исследования влияния различных факторов на состояние связывающих (в том числе лекарственных) сайтов САЧ, что имеет важный прикладной аспект в медицинских разработках по связыванию лекарственных препаратов с сывороточными альбуминами не только *in vitro*, но и *in vivo*.

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. *Pelet S., Gratzel M., Moser J.-E.* // J. Phys. Chem. B. 2003. **107**. С. 3215.
4. *Birla L., Prieto B., Noguel T.* et al. // Revue Roumaine Chimie. 2007. **52**, N 7. С. 639.
5. *Gao D., Tian Y., Liang F.* et al. // J. Luminesc. 2007. **127**. С. 515.
6. *Bhowmik B.B., Ganguly P.* // Spectrochim. Acta. Pt A. 2005. **61**. С. 1997.
7. *Бухарова Е.М., Власова И.М., Салецкий А.М.* // Журн. прикл. спектроскопии. 2008. **75**, № 6. С. 782.
8. *Vlasova I.M., Saletsky A.M.* // Curr. Appl. Phys. 2009. **9**, N 5. С. 1027.
9. *Власова И.М., Салецкий А.М.* // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 2009. № 4. С. 52.
10. *Vlasova I.M., Saletsky A.M.* // J. Mol. Struct. 2009. **936**. С. 220.
11. *Власова И.М., Кулешова А.А., Салецкий А.М.* // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 2011. № 5. С. 44.
12. *Vlasova I.M., Kuleshova A.A., Panchishin A.I., Vlasov A.A.* // J. Mol. Struct. 2012. **1016**. С. 1.
13. *Vlasova I.M., Bukharova E.M., Kuleshova A.A., Saletsky A.M.* // Curr. Appl. Phys. 2011. **11**, N 5. С. 1126.
14. textitVlasova I.M., Saletsky A.M. // Laser Phys. Lett. 2008. **5**, N 11. С. 834.
15. *Власова И.М., Гордеева Ю.А., Власов А.А., Салецкий А.М.* // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 2012. № 2. С. 60.
16. *Власова И.М., Бухарова Е.М., Салецкий А.М.* // Журн. физ. химии. 2011. **85**, № 5. С. 964.
17. *Тиноко И., Зауэр К., Вэнг Дж., Паглиси Дж.* Физическая химия. Принципы и применение в биологических науках. М., 2005.
18. *Шмидт В.* Оптическая спектроскопия для химиков и биологов. М., 2007.
19. *Лакович Дж.* Основы флуоресцентной спектроскопии. М., 1986.

Investigation of rotational diffusion of fluorescent nanomarker Bengal Rose in human serum albumin solutions

I. M. Vlasova[1,a], **D. V. Polyansky**[2,b], **A. A. Vlasov**[2], **A. M. Saletsky**[1]

[1] *Department of General Physics;* [2] *Department of Quantum Theory and High Energy Physics, Faculty of Physics, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia.*
E-mail: [a] *vlasovairina1979@mail.ru,* [b] *polyan84@mail.ru.*

The investigations of polarized fluorescence of Bengal Rose were carried out and the calculation of parameters of rotational diffusion of Bengal Rose in human serum albumin (HSA) solutions was done. The increase of degree of fluorescence polarization, increase of time of rotational relaxation, increase of effective hydrodynamic radius of Bengal Rose and decrease of coefficient of rotational diffusion of Bengal Rose in HSA solutions were found out. At comparison of Bengal Rose with other nanomarkers of this homologous family the influence of electronegativity of atoms in nanomarker structural formulae on parameters of its rotational diffusion was found out.

Keywords: Bengal Rose, human serum albumin, polarized fluorescence, rotational diffusion.
PACS: 87.15.Mi; 87.15.Vv.
Received 26 June 2012.

English version: *Moscow University Physics Bulletin* 3(2013).

Сведения об авторах

1. Власова Ирина Михайловна — канд. физ.-мат. наук, ст. преподаватель: тел.: (495) 939-14-89; e-mail: vlasovairina1979@mail.ru.
2. Полянский Дмитрий Валерьевич — мл. науч. сотрудник; тел.: (495) 939-14-89; e-mail: polyan84@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; тел.: (495) 939-14-89; e-mail: sam@phys.msu.ru.