

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова  
физический факультет  
кафедра общей физики

**ДИПЛОМНАЯ РАБОТА**

студентки 605 группы

Кулешовой Анны Александровны

**ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ВРАЩАТЕЛЬНАЯ ДИФФУЗИЯ  
НАНОМАРКЕРОВ СЕМЕЙСТВА ФЛУОРЕСЦЕИНА В РАСТВОРАХ  
АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА**

Научный руководитель:

кандидат физ.-мат. наук, ст. преп. Власова И.М.

Допущена к защите  
«23» «декабря» 2011 года

Зав. каф. общей физики

профессор \_\_\_\_\_ А.М. Салецкий

Москва-2011

## Оглавление

<b>Введение</b> .....	4
<b>Глава 1. Применение флуоресцентных наномаркеров в исследованиях структуры и свойств белков (литературный обзор)</b> .....	6
§1.1. Физические основы флуоресцентной спектроскопии .....	6
§1.2. Тушение флуоресценции. Уравнение Штерна – Фольмера .....	7
§1.3. Теория вращательной деполяризации флуоресценции. Модель Левшина – Перрена.....	8
§1.4. Спектры поглощения и молекулярная ассоциация красителей в растворах.....	10
§1.5. Наномаркеры семейства флуоресцеина.....	12
§1.6. Применение флуоресцентных наномаркеров в исследованиях белковых макромолекул.....	13
<b>Глава 2. Методическая часть экспериментов</b> .....	17
§2.1. Приготовление растворов бенгальского розового для изучения его флуоресцентных характеристик в растворах альбумина человека.....	17
§2.2. Приготовление растворов бенгальского розового для изучения его молекулярной ассоциации в растворах альбумина человека.....	17
§2.3. Приготовление растворов сывороточного альбумина человека и наномаркеров флуоресцеина, эритрозина, эозина и бенгальского розового для определения параметров вращательной диффузии наномаркеров .....	17
§2.4. Методика экспериментов на спектрофлуориметре для изучения флуоресцентных характеристик и констант тушения флуоресценции бенгальского розового в растворах альбумина человека .....	18
§2.5. Методика экспериментов на спектрофотометре для изучения спектров поглощения и для определения молекулярной ассоциации бенгальского розового в растворах альбумина человека .....	18
§2.6. Методика экспериментов для исследования поляризованной флуоресценции наномаркеров флуоресцеина, эритрозина, эозина и бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека .....	18

<b>Глава 3. Исследование процессов молекулярной ассоциации и флуоресцентных характеристик бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека.....</b>	<b>19</b>
§3.1. Исследование флуоресцентных характеристик бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека при различных значениях рН.....	19
§3.2. Определение констант тушения флуоресценции бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека при различных значениях рН ...	22
§3.3. Определение степени молекулярной ассоциации бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека при различных значениях рН....	26
<b>Глава 4. Исследование вращательной диффузии наномаркеров флуоресцеина, эритрозина, эозина и бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека.....</b>	<b>30</b>
§4.1. Определение параметров вращательной диффузии наномаркеров флуоресцеина, эритрозина, эозина и бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека при различных значениях рН .....	30
§4.2. Сравнительный анализ вращательной диффузии исходного соединения флуоресцеина и его производных эритрозина, эозина и бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека при различных значениях рН....	44
<b>Основные результаты и выводы работы .....</b>	<b>46</b>
<b>Список цитируемой литературы.....</b>	<b>47</b>

## Введение

Методы флуоресцентной спектроскопии с применением флуоресцентных наномаркеров (зондов и меток) с каждым годом всё активнее применяются в лабораторных исследованиях и используются в физике, химии, биологии. На основе этих методов можно распознавать молекулы и различные вещества, получать качественные и количественные характеристики, одной из важных составляющих этих методов является получение результатов за минимальные сроки без инвазивного воздействия. В частности, с помощью этих методов исследуется строение сывороточного альбумина человека, как нативных молекул, так и претерпевших химическую модификацию вследствие внешних воздействий. Методы хороши и тем, что позволяют получать точные результаты при небольших количествах биологического объекта.

Белки формируют класс биомолекул, которые играют важную роль в процессах метаболизма и служат индикатором соматических изменений.

Сывороточный альбумин представляет собой глобулярный белок плазмы крови человека, который синтезируется в печени и составляет около 60 % от всех белков, содержащихся в плазме крови. Уникальная способность молекулы сывороточного альбумина человека связывать обширный круг лигандов определяет одну из основных и наиболее важных функций этого белка – транспорт физиологических метаболитов. Механизм связывания лигандов с молекулой сывороточного альбумина определяется наличием на белке специфических участков – связывающих центров.

Выделяют шесть главных связывающих центров сывороточного альбумина человека: центр 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 электростатическим взаимодействием, другие – носят ковалентный характер, вызывая химические модификации боковых цепей аминокислотных остатков. Связывание небольших наномаркеров, таких как наномаркеры семейства флуоресцеина, происходит с центром I альбумина.

К классическим флуоресцентным наномаркерам семейства флуоресцеина относятся – исходное соединение флуоресцеин и его галоген-производные: 4-йод-производная флуоресцеина – эритрозин, 4-бром-производная флуоресцеина – эозин, 4-хлор-4-йод-производная флуоресцеина – бенгальский розовый.

Люминесцентные зонды (наномаркеры) чрезвычайно чувствительны даже к незначительным изменениям окружающей их сложной системы, будь то живая клетка или буферный раствор с белком. Задачей флуоресцентной спектроскопии является анализ

подобных сигналов, изменений и трансформаций. Для исследования структурно – динамического состояния белковых молекул широко используются флуоресцентные наномаркеры.

Наномаркеры семейства флуоресцеина в настоящее время используются для исследования связывающих центров (Центра I) сывороточного альбумина человека, их физико-химических свойств и структурных свойств с целью моделирования с помощью этих наномаркеров связывания с альбумином ряда лекарственных препаратов для анализа их фармакинетики. Поэтому представляет интерес исследовать собственные флуоресцентные характеристики данных наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах альбумина человека и изучить вращательную диффузию молекул этих наномаркеров в растворах этого белка, что и являлось целью настоящей дипломной работы.

# Глава 1. Применение флуоресцентных наномаркеров в исследованиях структуры и свойств белков (литературный обзор)

## §1.1. Физические основы флуоресцентной спектроскопии

Флуоресценция – излучательный переход из возбужденного состояния с синглетного уровня  $S_1$  в основное состояние  $S_0$ :

$$S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{\text{фл.}} \quad (1.1)$$

Такие переходы квантовомеханически “разрешены”, а типичная величина скоростей испускания для них  $\sim 10^8 \text{ с}^{-1}$ . Высокие значения скоростей испускания приводят к временам затухания  $\sim 10^{-11} - 10^{-8}$  сек. Время жизни – это средний период времени, в течение которого флуорофор находится в возбужденном состоянии.

Для явления флуоресценции известно несколько основных характеристик, такие как стоксов сдвиг, квантовый выход, энергетический выход, время затухания [1, 2, 3].

Стоксовым сдвигом называется сдвиг испускания относительно поглощения в сторону больших длин волн, то есть наблюдается потеря энергии (это явление впервые наблюдал Стокс). Вследствие того, что практически всегда при поглощении и испускании света осуществляется один и тот же электронный переход, соблюдение правила Стокса требует выполнение следующего соотношения

$$h\nu_{\text{возб}} - h\nu_{\text{люм}} > 0. \quad (1.2)$$

Впоследствии Ломмель предложил такую формулировку, которая используется в современной науке: спектр излучения в целом и его максимум всегда сдвинуты по сравнению со спектром поглощения и его максимумом в сторону длинных волн. Эта зависимость получила название закона Стокса – Ломмеля, который может быть записан в следующем виде:

$$h\nu_{\text{max}}^{\text{люм}} < h\nu_{\text{max}}^{\text{погл}}. \quad (1.3)$$

Потери энергии между возбуждением и испусканием неизменно наблюдается для флуоресцирующих молекул в растворах. Одной из основных причин возникновения стоксова сдвига является быстрая релаксация на нижний колебательный уровень состояния  $S_1$ . К тому же обычно происходит переход на возбужденные колебательные уровни состояния  $S_0$ , что приводит к дополнительной потере колебательной энергии. Вдобавок к этому стоксов сдвиг может быть ещё более увеличен благодаря влияниям растворителя на флуорофоры и реакциям в возбужденных состояниях.

Часто измеряют времена затухания и квантовые выходы флуоресцирующих соединений.

Квантовый выход флуоресценции – это отношение числа испущенных фотонов к числу поглощенных. Доля молекул флуорофора, которые дезактивируются с испусканием, а, следовательно, и квантовый выход определяются выражением:

$$Q = \Gamma / (\Gamma + \kappa), \quad (1.4)$$

где  $\Gamma$  – константа скорости излучательной дезактивации флуорофора,  $\kappa$  – константа скорости безызлучательной дезактивации. Квантовый выход близок к единице в том случае, если константа скорости безызлучательной дезактивации много меньше константы скорости испускания, то есть  $\kappa \ll \Gamma$ .

Заметим, что энергетический выход флуоресценции (который является отношением энергии, испускаемой в виде люминесценции, к энергии поглощенного возбуждающего света) всегда меньше единицы из-за стоксовых потерь.

Время жизни возбужденного состояния определяется по формуле

$$\tau = 1 / (\Gamma + \kappa). \quad (1.5)$$

Время жизни флуорофора в отсутствие безызлучательных процессов, называемое собственным временем жизни,  $\tau_0$ , равно:

$$\tau_0 = 1 / \Gamma \quad (1.6)$$

Отсюда вытекает обычное соотношение между квантовым выходом и временем жизни:

$$Q_1 = \tau / \tau_0. \quad (1.7)$$

## §1.2. Тушение флуоресценции. Уравнение Штерна – Фольмера

Внутри- и межмолекулярные взаимодействия обычно приводят к уменьшению выхода люминесценции исследуемых веществ, то есть сопровождаются тушением свечения.

Многие посторонние примеси, добавляемые к растворам люминесцирующих соединений, приводят к развитию тушения флуоресценции. Этот вид тушения флуоресценции наблюдается у газов, жидкостей и твердых веществ.

Безызлучательная релаксация состояния  $S_1$  может быть вызвана различными механизмами, приводящими к тушению флуоресценции. Так как различные факторы не одинаково воздействуют на все флуорофоры, то используется большое число специфических тушителей флуоресценции.

Молекулярная флуоресценция обычно тушится молекулярным кислородом, ксеноном, йодидом или атомами тяжелых металлов, так как они индуцируют переход  $S_1 \rightarrow T_1$  в результате спин – орбитального связывания.

Уравнение (1.7) в присутствии тушителя  $A/[A]$  – концентрация тушителя), который взаимодействует с флуорофором с константой скорости тушения  $\kappa_A$ , было рассмотрено [4, 5] и имеет вид:

$$Q_2 = \Gamma / (\Gamma + \kappa + \kappa_A \cdot [A]). \quad (1.8)$$

Очевидно, что происходит уменьшение квантового выхода. При

$$\tau = 1 / (\Gamma + \kappa) \quad (1.9)$$

отношение уравнений (1.7) и (1.8) будет иметь вид:

$$Q_1 / Q_2 = (\Gamma + \kappa + \kappa_A \cdot [A]) / (\Gamma + \kappa) = 1 + \kappa_A \cdot [A] \cdot \tau. \quad (1.10)$$

Для упрощения квантовый выход не измеряется сам по себе, а сразу измеряется отношением интенсивностей флуоресценции без ( $I_F$ ) и с тушителем ( $I_A$ ). Вводя так называемую динамическую константу тушения флуоресценции:

$$K \cdot [A] = \kappa_A \cdot [A] \cdot \tau, \quad (1.11)$$

получаем уравнение Штерна – Фольмера, описывающее тушение флуоресценции флуорофора добавлением различных концентраций тушителя:

$$I_F / I_A = 1 + K \cdot [A]. \quad (1.12)$$

### §1.3. Теория вращательной деполяризации флуоресценции.

#### Модель Левшина – Перрена

Молекулы флуоресцирующих веществ оптически анизотропны, поэтому флуоресцентное излучение каждой молекулы частично поляризовано. Однако, если анизотропные молекулы ориентированы хаотично, то вещество в целом становится анизотропным, а его флуоресценция – неполяризованной. Таким образом, для возникновения поляризации флуоресценции необходима анизотропия ориентационного распределения излучателей, которая может быть обусловлена как свойствами самой системы, так и свойствами, сообщенными извне.

Для количественной оценки поляризованной флуоресценции вводится понятие степени поляризации флуоресценции:

$$P = (I_{||} - I_{\perp}) / (I_{||} + I_{\perp}),$$

где  $I_{||}$  и  $I_{\perp}$  – соответственно параллельная и перпендикулярная электрическому вектору возбуждающего света составляющие поляризованной флуоресценции. Иная характеристика поляризованной флуоресценции – степень анизотропии излучения:

$$r = (I_{||} - I_{\perp}) / (I_{||} + 2 I_{\perp}).$$

Крупным биохимическим применением метода поляризационной флуоресценции является оценка времен вращательной релаксации белков  $\xi = \frac{V\eta}{Tk}$  и оценка

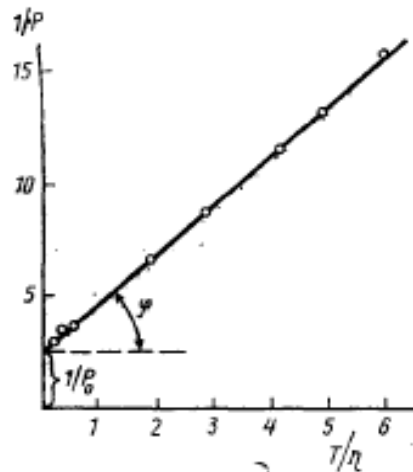


коэффициентов вращательной диффузии  $D_{\text{вращ}}$  по формуле  $\frac{r_0}{r} = 1 + 6D_{\text{вращ}} \cdot \tau$ . Например, в биологии часто таким способом оценивают коэффициенты вращательной диффузии зондов.

Количественная теория вращательной деполяризации была предложена В.Л. Левшиным и Ф. Перреном с использованием модели вращательной диффузии, на основе этой теории была получена следующая формула:

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

где  $T$  – абсолютная температура,  $\eta$  – вязкость раствора,  $V$  – объем раствора,  $k$  – постоянная Больцмана,  $\tau_0$  – среднее время жизни возбужденных молекул,  $P_0$  – предельная степень поляризации люминесценции. Данная зависимость получила название формулы Левшина – Перрена. Откладывая на оси ординат  $1/P$ , а по оси абсцисс  $T/\eta$  получаем прямую линию, которая отсекает на оси ординат отрезок, равный  $1/P_0$ .



Тангенс угла наклона этой прямой к оси абсцисс:

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

этот тангенс при известном значении  $\tau_0$  позволяет определить величину молекулярного объема, и, наоборот, по известному молекулярному объему можно определить значение среднего времени жизни возбужденного состояния исследуемых молекул.

Используя эти данные, можно определить время вращательной релаксации (или разупорядочивания вследствие тепловой диффузии)  $\xi$  флуорофора по формуле:

$$\xi = \frac{4a^3 \pi \eta}{3Tk} = \frac{V\eta}{Tk},$$

где  $a$  – эффективный гидродинамический радиус Эйнштейна ( $V = \frac{4\pi a^3}{3}$ ).

Согласно Левшину, Перрену и Яблонскому, для флуорофоров можно определить коэффициент вращательной диффузии:

$$\frac{r_0}{r} = 1 + 6D_{\text{вращ}} \cdot \tau,$$

где  $r_0$  – анизотропия для неподвижного флуорофора (зонда),  $D_{\text{вращ}}$  – коэффициент вращательной диффузии ( $D_{\text{вращ}} = \frac{kT}{6\eta V}$ ),  $\tau$  – время жизни возбужденного состояния флуорофора.

#### §1.4. Спектры поглощения и молекулярная ассоциация красителей в растворах

Спектром поглощения вещества называется зависимость коэффициента экстинкции  $\varepsilon$  от длины волны  $\lambda$  (или волнового числа  $\nu$ ). Спектры поглощения сложных молекул состоят из нескольких перекрещивающихся широких полос. Разные полосы поглощения относятся к разным электронным переходам внутри молекулы.

Увеличение концентрации раствора люминесцирующего вещества обычно сопровождается развитием молекулярных взаимодействий, часто приводящих к ассоциации его молекул с образованием агрегатов различной сложности. В результате в растворе наряду с мономерными молекулами появляются новые поглощающие, а иногда и излучающие центры. Возникновение ассоциатов существенно изменяет основные оптические свойства раствора (электронные спектры поглощения, люминесценции, квантовый выход свечения и др.). Это связано со сложными межмолекулярными взаимодействиями в растворах органических соединений и различной природой сил, объединяющих молекулы в ассоциаты. Существуют две версии образования ассоциатов, одна из них это их образование за счет сил Ван-дер-Ваальса. В случае вандерваальсовского взаимодействия диполь-дипольное притяжение молекул приводит к их сближению и, как следствие, объединению в димеры или более сложные ассоциаты.

Другая точка зрения заключается в том, что объединение молекул красителя в ассоциаты происходит за счет водородных связей. Это предположение подтверждается резкой зависимостью эффективности ассоционного процесса от природы используемого растворителя и структуры молекул красителей. Изменение спектров красителей, свидетельствующее о процессах их ассоциации, происходит в основном для соединений, имеющих активную *N-H*-группу. Водородные связи при этом могут образовываться как непосредственно между молекулами красителей, так и при помощи молекул воды, выполняющих роль промежуточных мостиков. Образование таких водородных связей в

ассоциатах было подтверждено измерением инфракрасных спектров поглощения растворов красителей [6, 7].

Если исследуемый раствор представляет собой бинарную смесь мономеров и ассоциатов одного вида (в простейшем случае димеров), каждый из которых обладает собственным спектром поглощения, то наблюдается изобестическая точка. Когда исследуемый раствор содержит смесь мономеров и димеров красителя, то его показатель поглощения  $\alpha$  на некоторой длине волны  $\lambda_i$  может быть записан в виде [8]

$$\alpha = \alpha_M X + \alpha_A (1-X) = (\alpha_M - \alpha_A) X + \alpha_A, \quad (1.13)$$

где  $\alpha_M$ ,  $\alpha_A$  и  $\alpha$  – показатели поглощения мономеров, ассоциатов исследуемого раствора на длине волны  $\lambda_i$  соответственно,  $X$  – доля молекул красителя, находящихся в растворе в мономерном состоянии;  $1-X$  – доля его ассоциированных молекул или степень ассоциации раствора.

В тех случаях, когда при достижении некоторой концентрации начинают образовываться более сложные ассоциаты, раствор перестает быть бинарным. В нем появляются несколько поглощающих центров, и соотношение (1.13) перестает выполняться, а изобестическая точка исчезает.

Описанные концентрационные деформации спектров поглощения позволяют определить величину степени ассоциации  $(1-X)$  исследуемых растворов. Для этого используют соотношение (1.13) и так называемый закон разведения Оствальда

$$X^2/(1-X) = M/C \quad (1.14)$$

где  $M$  – константа равновесия,  $C$  – общая концентрация раствора.

Решая совместно уравнения (1.13) и (1.14), получают выражение

$$(\alpha - \alpha_A)^2 / (\alpha_M - \alpha) = M (\alpha_M - \alpha) / C, \quad (1.15)$$

которое содержит два неизвестных  $\alpha_A$ ,  $M$ . Для их определения можно использовать два любых спектра поглощения из семейства исследуемых растворов с концентрациями  $C_1$  и  $C_2$ . Для этих спектров поглощения будут справедливы два уравнения типа (1.15):

$$(\alpha_n - \alpha_A)^2 / (\alpha_M - \alpha_n) = M (\alpha_M - \alpha) / C, \quad (1.16)$$

где  $n=1$  и  $2$ . Решая эту систему из двух уравнений с двумя неизвестными и исключая величину  $M$ , можно получить выражение для показателя поглощения ассоциатов  $\alpha_A$  на выбранной длине волны  $\lambda_i$ :

$$\alpha_A = (\alpha_1 - Q \alpha_2) / (1 - Q), \quad (1.17)$$

где

$$Q = \sqrt{\frac{C_2(\alpha_M - \alpha_1)}{C_1(\alpha_M - \alpha_2)}}. \quad (1.18)$$

Используя полученные значения  $\alpha_M$  и  $\alpha_A$  и определив из опыта для раствора данной концентрации  $C$  значение его показателя поглощения, из уравнения (1.13) можно установить содержащуюся в нем долю мономеров

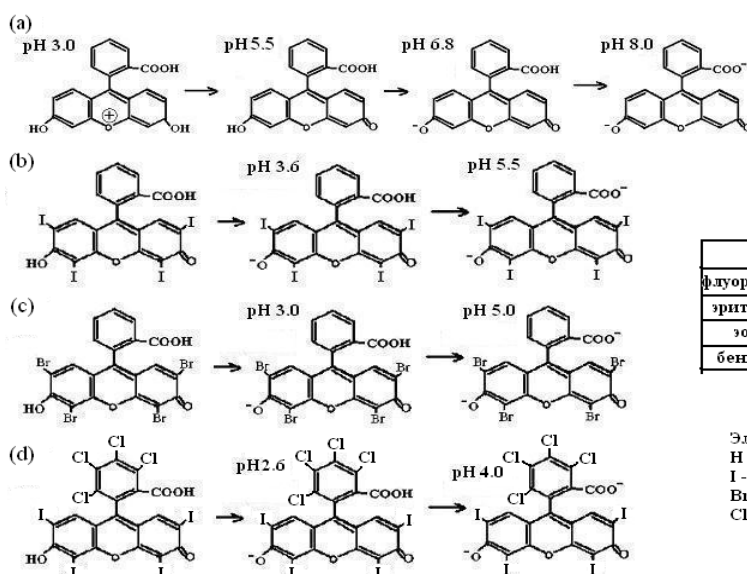
$$X = (\alpha - \alpha_A) / (\alpha_M - \alpha_A), \quad (1.19)$$

а также величину степени ассоциации раствора ( $1-X$ ).

### §1.5. Наномаркеры семейства флуоресцеина

Флуоресцирующие красители (наномаркеры) широко используются в биологии и медицине, также в биофизике и химии. Флуоресцентным зондом можно назвать любое флуоресцирующее вещество, если при добавлении к мембранам, белкам, липопротеинам, клеткам его молекулы связываются с ними, а из параметров флуоресценции можно извлечь определенную информацию о структуре или функции биологических объектов [9].

Флуоресцентные характеристики наномаркеров семейства флуоресцеина, а именно флуоресцеина, эозина, эритрозина и бенгальского розового рассматриваются в работах [10-16]. Механизм связывания лигандов с молекулой сывороточного альбумина определяется наличием на белке специфических участков – связывающих центров. Наномаркеры семейства флуоресцеина присоединяются к первому связывающему центру. Для исследования связывающего центра I сывороточного альбумина человека используются анионные при физиологическом рН 7,4 наномаркеры семейства флуоресцеина, такие как флуоресцеин, эозин, эритрозин, бенгальский розовый, структурные формулы которых представлены ниже:



В табл. электроотрицательность относительно флуоресцеина

	Электроотриц.	pK(OH)	pK(COOH)
флуоресцеин	0	6,8	8,0
эритрозин	0,44	3,6	5,5
эозин	2,56	3,0	5,0
бенгалроз	4,68	2,6	4,0

Электроотрицательность атомов:  
 Н - 2,1  
 I - 2,21  
 Br - 2,74  
 Cl - 3,16

Структурные формулы наномаркеров семейства флуоресцеина и значения pK неонизированных групп: флуоресцеин (а); эритрозин (б); эозин (с); бенгальский розовый (д).

Популярность флуоресцеина объясняется тем, что квантовый выход флуоресценции дианионной формы молекулы близок к единице. Другими словами безызлучательные переходы с  $S_1$  на  $S_0$  и T почти не переходят.

Отличия флуоресцентно – спектральных характеристик и параметров молекулярной ассоциации этих четырех зондов (наномаркеров) определяются величиной электроотрицательности атомов боковых радикалов зондов: водорода (у флуоресцеина), йода (у эритрозина), брома (у эозина), хлора и йода (у бенгальского розового). Электроотрицательность атомов боковых радикалов зондов оказывает влияние на рК их ионизируемых групп (COOH и OH). Наличие более электроотрицательного атома приводит к сильному уменьшению значений рК(COOH) и рК(OH) этих зондов.

Для флуоресцеина рК(OH) = 6,8; рК(COOH) = 8,0. При значениях рН до 5, флуоресцеин находится в слабо положительно заряженной форме. При значениях рН 5,5 – 6,8 флуоресцеин электрически нейтрален. В области рН 6,8 – 8,0 флуоресцеин слабо отрицательно заряжен и находится в форме моноаниона. При рН больше 8,0 флуоресцеин сильно отрицательно заряжен и находится в форме дианиона.

Для эозина рК(OH) = 3,0; рК(COOH) = 5,0. При рН < 3,0 эозин электрически нейтрален, при 3,0 < рН < 5,0 эозин слабо отрицательно заряжен (моноанион). При рН > 5,0 эозин заряжен сильно отрицательно (дианион).

Для эритрозина рК(OH) = 3,6; рК(COOH) = 5,5. В области рН < 3,6 эритрозин электрически нейтрален. В области рН 3,6 – 5,5 эритрозин слабо отрицательно заряжен (моноанион). При рН > 5,5 эритрозин сильно отрицательно заряжен (дианион).

Для бенгальского розового рК(OH) = 2,6, рК(COOH) = 4,0. В области рН < 2,6 бенгальский розовый электрически нейтрален, при 2,6 < рН < 4,0 бенгальский розовый слабо отрицательно заряжен (моноанион), при рН выше 4,0 бенгальский розовый сильно отрицательно заряжен и находится в форме дианиона.

## **§1.6. Применение флуоресцентных наномаркеров в исследованиях белковых макромолекул**

Анализ механизма связывания биологических объектов с различными лигандами, флуоресцентными наномаркерами чрезвычайно интересен с точки зрения биомедицины, фармацевтики: при создании лекарственных препаратов, при изучении свойств белков, выявлении возникших дефектов в человеческом организме, к примеру – доброкачественных или злокачественных опухолей, получении информации о различных пептидах.

В работе [17] описывается исследование механизма связывания бенгальского розового с бычьим сывороточным альбумином. Анализ данных выявил наличие обоих типов тушения флуоресценции при связывании, как динамического, так и статического. Измерены различные флуоресцентные характеристики наномаркера в растворе бычьего сывороточного альбумина и без него, одной из них являлась зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны при различных концентрациях красителя и при постоянной концентрации белка. Спектральные данные показали, что при добавлении нанозонда в буферный раствор с бычьим сывороточным альбумином, у белка наблюдаются конформационные изменения.

В работе [18] в качестве модели белково-пептидной связи использовалось взаимодействие лей-энкефалина, и его производной, тирозин-глицин-глицина (ТГГ), с бычьим сывороточным альбумином. ТГГ и лей-энкефалин тушили флуоресценцию триптофана сывороточного альбумина.

В работах [19, 20] с помощью эозина изучена динамика вращения белка.

В работах [21, 22] проведен анализ спектрально – люминесцентных характеристик и процессов молекулярной ассоциации в растворах сывороточного альбумина человека (САЧ) при различных рН трех флуоресцентных зондов, принадлежащих к одному гомологическому ряду (эозина, эритрозина и флуоресцеина). Из полученных результатов следует, что флуоресценция всех трех зондов изменялась в зависимости от рН растворов (это объясняется значениями рК их ионизируемых групп (COOH и OH)). В растворах с САЧ у этих зондов наблюдается тушение флуоресценции и красный сдвиг максимума спектра флуоресценции. Причем у галогенпроизводных флуоресцеина (эозин, эритрозин) происходят более яркие изменения флуоресценции в растворах с САЧ, чем у исходного красителя флуоресцеина. Обнаружены различия спектрально – люминесцентных характеристик и процессов молекулярной ассоциации этих трех зондов, которые определяются величиной электроотрицательности атомов боковых радикалов.

В работе [23] описывается взаимодействие альбумина с флуоресцинизотиоцианатом, 2,7-дихлорофлуоресцеином, 4,5-дибромо-флуоресцеином, ди-ойдо-флуоресцеином и родамином В, изучаются критерии, благодаря которым можно судить о стабильности данных красителей и анализируются спектры флуоресценции нанозондов в растворах с сывороточным альбумином и с глицерином.

В работе [24, 25] изучают свойства розового бенгальского, который служит для выявления поврежденных клеток эпителия глазной поверхности при болезни глаз, для выявления микротравм наружного слоя, и реакцию этого наномаркера на муцин.

В работе [26] с помощью флуоресцентной спектроскопии проводились анализы тканей живых объектов, в качестве которых использовались мыши, а наномаркером служил IR-820. У объектов окрашивались травмированные ткани, опухоли, и получали данные о структуре изменения их по сравнению с нативными тканями.

В работах [27, 28] изучается взаимодействие бычьего сывороточного альбумина (БСА) с нильским синим и взаимодействие нильского красного с белками клетки. В результате получили рост интенсивности флуоресценции нильского синего при добавлении раствора бычьего сывороточного альбумина (для pH 2,0-10,0), так как БСА блокирует процесс вращательной релаксации наномаркера и увеличивает квантовый выход его флуоресценции. Анализ данных показал, что при добавлении к буферному раствору с нильским красным белка наблюдается сдвиг спектра флуоресценции красителя в синюю область.

В работе [29] изучается флуоресценция триптофана при взаимодействии различных белков с нанозондом кинуренином. В качестве белков используются бычий сывороточный альбумин, химотрипсин и субтилизин Карлсберга.

В работе [30] исследуется взаимодействие феназинового нанозонда с белками, отвечающими за транспорт питательных веществ, применяется как метод флуоресцентной спектроскопии, так и метод кругового дихроизма. В качестве наномаркера использовался фенозафранин (катионный феназиновый краситель), применялся человеческий и бычий сывороточный альбумин. Анализ флуоресцентных характеристик нанозонда в растворах нативных и денатурированных белков, данные о времени жизни их флуоресценции и измерения с помощью кругового дихроизма показали, что механизмы связывания нанозонда как с сывороточным альбумином человека, так и с бычьим белком имеют одинаковую природу.

В работе [31] изучаются характеристики белка, базируясь на механизме связывания наномаркера, в качестве которого используется комплекс тербиум(III)-эпинефрин с бычьим сывороточным альбумином.

В работе [32] анализируют механизм связывания флуоресцентного наномаркера тиофлавина Т с различными видами сывороточных альбуминов (человека, быка, свиньи и кролика). Получают константу связывания нанозонда с белком и число связывающих центров на белке с зондом.

В работе [33] изучается тушение флуоресценции эритрозина при связывании с бычьим сывороточным альбумином. При добавлении в раствор бычьего сывороточного альбумина наблюдаются тушение флуоресценции эритрозина и линейная зависимость между величиной тушения флуоресценции и концентрацией белка.

В работе [34] изучается механизм связывания сывороточных альбуминов быка, собаки, лошади, человека, свиньи, кролика и овцы с двухцветным флуоресцентным красителем FA, принадлежащему к классу 3-гидроксихромоновых красителей.

Процесс связывания сывороточного альбумина человека с одной из производных флуоресцеина, а именно с флуоресцеиновым моноглюкуроидом был описан в работе [35], где использовался метод поляризованной флуоресценции.

При исследовании поверхностных характеристик микросфер из бычьего и яичного альбумина в работе [36] использовались анионные наномаркеры – флуоресцеин, эозин, эритрозин, бенгальский розовый, и катионный краситель родамин В. Исследована адсорбционная способность микросфер и определены константы связывания при связывании белков с наномаркерами.

В работе [37] изучался механизм связывания флуоресцеина с бычьим альбумином при различных концентрациях, формах и гомогенности белка. Также проводились исследования с крысиными тканями, кожей и сосудами. Рассматривались механизмы связывания белков плазмы крысы с флуоресцеином.

В работе [38] исследуются механизмы взаимодействия сывороточного альбумина человека с красителем CI желтый 9 (или Клайтоновский желтый) с помощью спектров флуоресценции в видимых и ультрафиолетовых областях, инфракрасной спектроскопии на основе преобразования Фурье и кругового дихроизма.

Был рассмотрен механизм связывания флуоресцеина с альбумином в работе [39], при этом использовалась поляризованная флуоресценция.

В работе [40] с помощью аргонового лазера был возбужден флуоресцентный наномаркер, который представлял собой 5-аминофлуоресцеин-альбумин и который использовался для исследования злокачественной глиомы, то есть опухоли центральной нервной системы. В данной работе исследовали образцы глиом различных типов.

Интерес к применению наномаркеров неслучаен. Флуоресценция зондов (наномаркеров) в клетках и тканях чувствительна к изменениям, происходящим при развитии патологического процесса. Достаточно использования небольшого количества образца биологического объекта или введения наномаркеров прямо в определенные области человеческого организма, чтобы получить данные по изменениям в человеческом организме, зафиксировать отклонения от нормы или повреждения биологических объектов, будь то доброкачественные, злокачественные опухоли или деформации в органах, например, в глазах. Всё это заставляет внимательно исследовать возможные пути применения флуоресцентных наномаркеров (зондов) в клинической диагностике.



## **Глава 2. Методическая часть экспериментов**

### **§2.1. Приготовление растворов бенгальского розового для изучения его флуоресцентных характеристик в растворах альбумина человека**

Были подготовлены следующие буферные растворы: 1) 0,1 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  – КОН (рН 3,5-5,0); 2) 0,1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,1 М NaOH (рН 6,0-8,0).

Для изучения флуоресцентных характеристик бенгальского розового приготовлены следующие растворы с различными значениями рН (3,5 – 8,0):

- 1) раствор бенгальского розового (3 мкМ);
- 2) раствор сывороточного альбумина человека (150 мкМ) и бенгальского розового (3 мкМ).

Для определения констант тушения флуоресценции наномаркера белком приготовлены растворы бенгальского розового (3 мкМ), содержащие различные концентрации сывороточного альбумина человека (10 – 150 мкМ), при различных значениях рН (3,5 – 8,0).

### **§2.2. Приготовление растворов бенгальского розового для изучения его молекулярной ассоциации в растворах альбумина человека**

Для изучения молекулярной ассоциации бенгальского розового в растворах без белка и в растворах сывороточного альбумина человека были подготовлены следующие растворы для каждого значения рН (3,5 – 8,0): 1) раствор бенгальского розового (3 – 50 мкМ); 2) раствор сывороточного альбумина человека (150 мкМ) и бенгальского розового (3 – 50 мкМ).

### **§2.3. Приготовление растворов сывороточного альбумина человека и наномаркеров флуоресцеина, эритрозина, эозина и бенгальского розового для определения параметров вращательной диффузии наномаркеров**

Для исследования методами флуоресцентного анализа параметров вращательной диффузии наномаркеров приготовлены следующие растворы:

а) растворы наномаркера (3 мкМ флуоресцеин, 30 мкМ эозин, 30 мкМ эритрозин, 3 мкМ бенгальский розовый), содержащие различные концентрации сахарозы (0 – 200 мМ), при различных значениях рН (3,5 – 8,0).

б) растворы наномаркера (3 мкМ флуоресцеин, 30 мкМ эозин, 30 мкМ эритрозин, 3 мкМ бенгальский розовый), содержащие сывороточный альбумин человека (150 мкМ) и различные концентрации сахарозы (0 – 200 мМ), при различных значениях рН (3,5 – 8,0).

#### **§2.4. Методика экспериментов на спектрофлуориметре для изучения флуоресцентных характеристик и констант тушения флуоресценции бенгальского розового в растворах альбумина человека**

Исследования флуоресцентных характеристик бенгальского розового, как в растворах с сывороточным альбумином человека, так и в растворах без белка проведены с помощью спектрофлуориметра PerkinElmer LS 55 при комнатной температуре. Флуоресценция бенгальского розового возбуждалась светом с длиной волны  $\lambda_{возб} = 530$  нм. Область сканирования 540 – 700 нм. Полученные спектры обработаны программой FL WINLAB (Perkin Elmer).

#### **§2.5. Методика экспериментов на спектрофотометре для изучения спектров поглощения и для определения молекулярной ассоциации бенгальского розового в растворах альбумина человека**

Исследования спектров поглощения бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека и в растворах, не содержащих белка, проводились на спектрофотометре PerkinElmer Lambda 35 при комнатной температуре. Область сканирования 400 – 700 нм. Полученные спектры обработаны программой UV WINLAB (Perkin Elmer).

#### **§2.6. Методика экспериментов для исследования поляризованной флуоресценции наномаркеров флуоресцеина, эритрозина, эозина и бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека**

Флуоресценция наномаркеров, как в растворах с сывороточным альбумином человека, так и в растворах без белка возбуждалась светом с длинами волн: 1) эозин:  $\lambda_{возб} = 520$  нм, флуоресценция регистрировалась в диапазоне 530 – 700 нм; 2) флуоресцеин:  $\lambda_{возб} = 440$  нм, флуоресценция регистрировалась в диапазоне 450 – 700 нм; 3) эритрозин:  $\lambda_{возб} = 530$  нм, флуоресценция регистрировалась в диапазоне 540 – 700 нм; 4) бенгальский розовый:  $\lambda_{возб} = 540$  нм, флуоресценция регистрировалась в диапазоне 550 – 750 нм.

При исследовании поляризованной флуоресценции регистрировались  $I_{||}$  и  $I_{\perp}$  – интенсивности флуоресценции, измеренные через поляризатор, электрическая ось которого направлена параллельно или перпендикулярно поляризации возбуждающего света. Степень поляризации и анизотропии флуоресценции наномаркеров рассчитывалась по значениям  $I_{||}$  и  $I_{\perp}$  в максимуме спектра испускания флуоресценции.

### **Глава 3. Исследование процессов молекулярной ассоциации и флуоресцентных характеристик бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека (собственные результаты и их обсуждение)**

#### **§3.1. Исследование флуоресцентных характеристик бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека при различных значениях рН**

В ходе работы исследованы флуоресцентно – спектральные характеристики бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека при различных значениях рН. Получены спектры флуоресценции бенгальского розового, как в растворах без белка, так и в растворах с белком, при различных значениях рН. На рис. 3.1.1, в качестве примера, представлены спектры флуоресценции бенгальского розового, как в растворах без белка, так и в растворах с альбумином, при рН 3,5.

Из сравнения спектров флуоресценции бенгальского розового в растворах без белка и в растворах с сывороточным альбумином человека обнаружено, что максимумы спектров флуоресценции бенгальского розового в растворах с сывороточным альбумином человека 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 сывороточным альбумином человека – на 572 нм.

На рис. 3.1.2 представлены зависимости интенсивности в максимуме спектра флуоресценции бенгальского розового от рН в растворах без белка и в растворах с сывороточным альбумином человека. В растворах альбумина человека наблюдается тушение флуоресценции бенгальского розового, т.е. интенсивность в максимуме спектров флуоресценции бенгальского розового в растворах без белка больше интенсивности в максимуме спектров флуоресценции бенгальского розового в растворах с белком.

Видно (рис. 3.1.2), 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  $\text{COOH}$ -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  $\text{OH}$ -группы бенгальского розового 2,6), молекулы бенгальского розового в среднем слабо отрицательно заряжены (моноанионы), поэтому экранировка дипольными молекулами воды практически отсутствует.

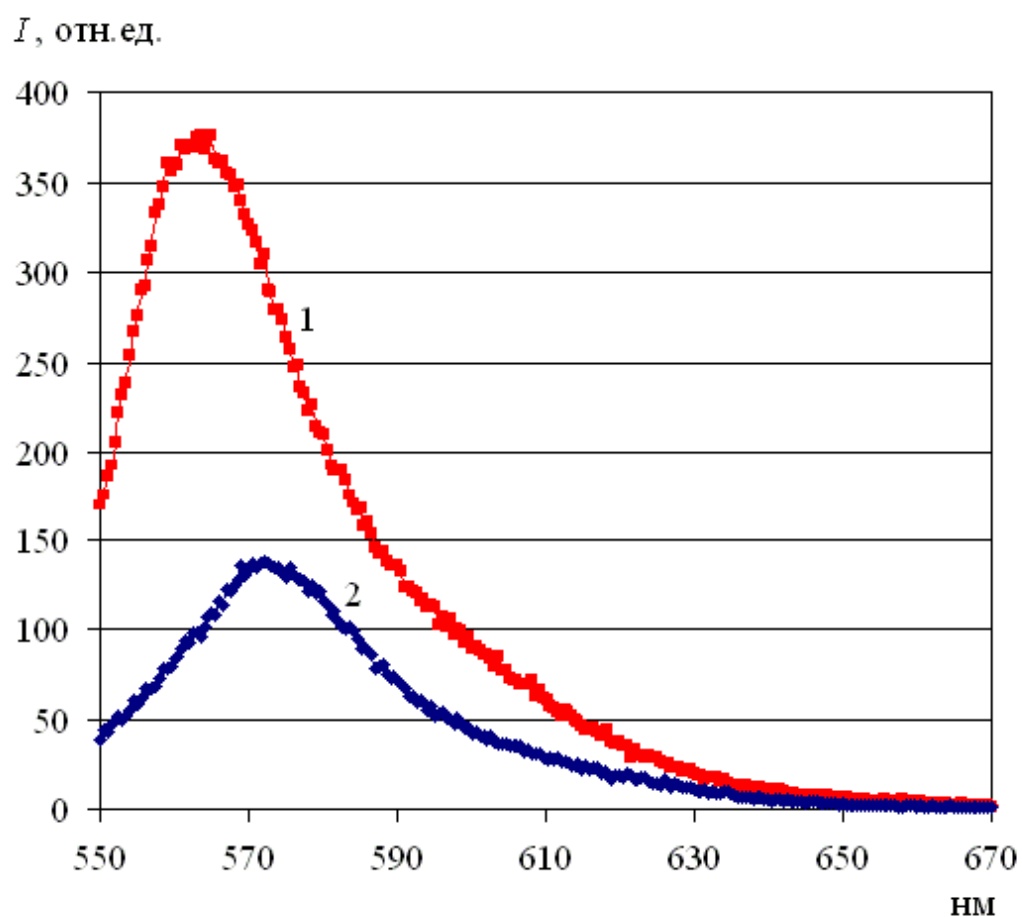


Рис. 3.1.1. Спектры флуоресценции (возбуждение 540 нм) бенгальского розового (3 мкМ) в растворах (рН 3,5): 1 - без белка, 2 - с сывороточным альбумином человека (150 мкМ).

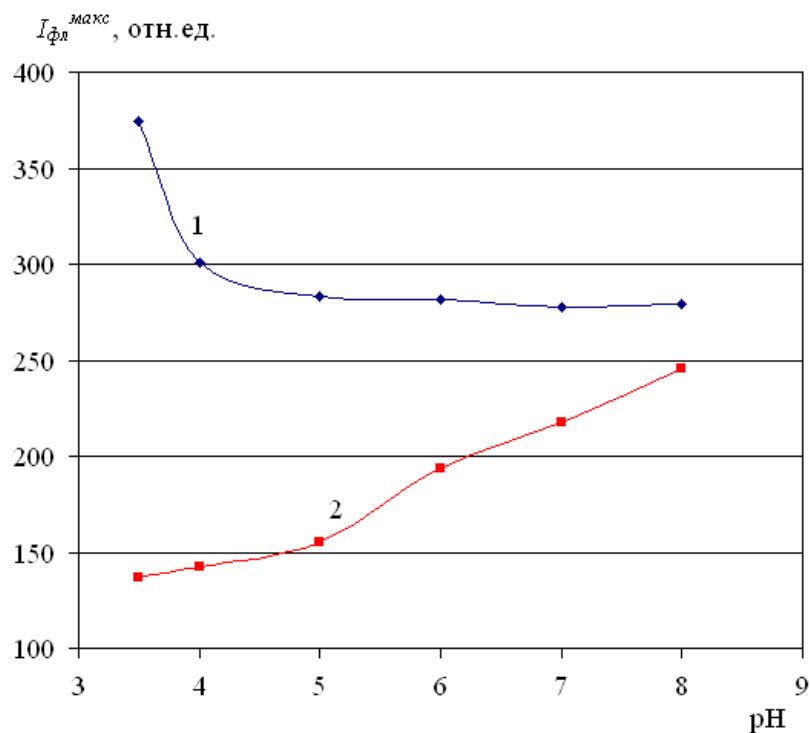


Рис. 3.1.2. Зависимость интенсивности в максимуме спектра флуоресценции (возбуждение 540 нм) бенгальского розового (3 мкМ) от рН: 1 - растворы без белка, 2 - растворы с сывороточным альбумином человека (150 мкМ).

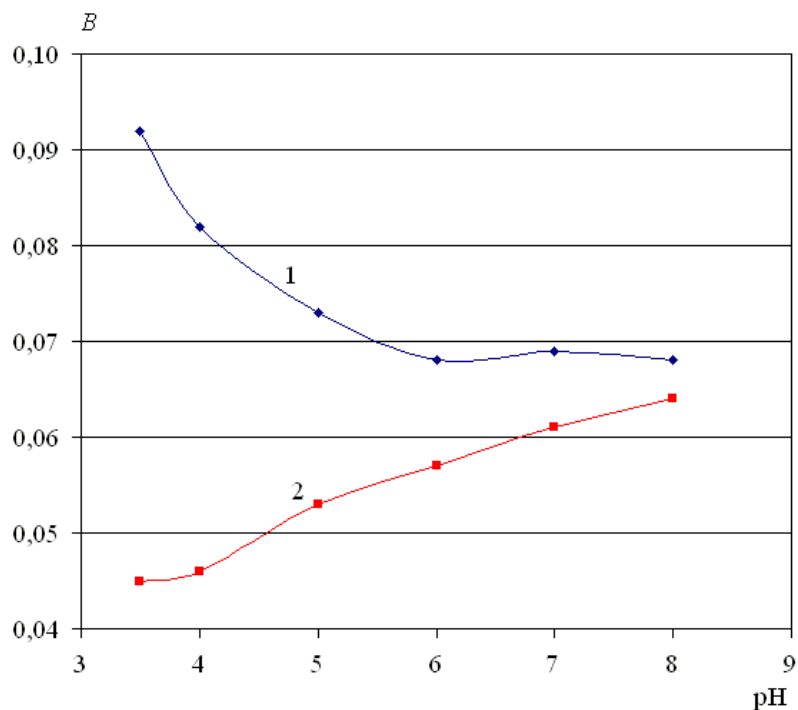


Рис. 3.1.3. Зависимость квантового выхода флуоресценции (возбуждение 540 нм) бенгальского розового (3 мкМ) от рН растворов: 1 - без белка, 2 - с сывороточным альбумином человека (150 мкМ).

Низкая интенсивность флуоресценции бенгальского розового в растворах альбумина человека при значениях рН, меньших примерно 5,0, обусловлена интенсивным связыванием бенгальского розового с белком.

Увеличение интенсивности флуоресценции бенгальского розового в растворах белка при увеличении рН больше 5,0 обусловлено тем, что при рН, больших 5,0, отрицательно заряженные молекулы белка и дианионы бенгальского розового плохо связываются, и это приводит к большому количеству несвязанного с белком бенгальского розового.

На рис. 3.1.3 представлены зависимости квантового выхода флуоресценции бенгальского розового от рН. Характер зависимости квантового выхода флуоресценции бенгальского розового от рН повторяет характер зависимости интенсивности в максимуме спектра флуоресценции бенгальского розового от рН.

### **§3.2. Определение констант тушения флуоресценции бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека при различных значениях рН**

Количественно связывание наномаркера в качестве низкомолекулярного лиганда с макромолекулами белка описывается в терминах химической кинетики и химической физики.

Исследовано тушение флуоресценции бенгальского розового добавлением различных концентраций сывороточного альбумина человека при различных значениях рН. На рис. 3.2.1 в качестве примера представлено тушение флуоресценции бенгальского розового добавлением различных концентраций сывороточного альбумина человека при рН 3,5.

Для различных значений рН построены (рис. 3.2.2) зависимости  $(F_0/F) - I$  от  $[Q]$ , где  $F_0$  – интенсивность флуоресценции бенгальского розового в отсутствие белка,  $F$  – интенсивность флуоресценции бенгальского розового в присутствии сывороточного альбумина человека,  $[Q]$  – концентрация сывороточного альбумина человека (приблизительно это общая концентрация белка в растворе). Видно (рис. 3.2.2), что полученные зависимости  $(F_0/F) - I$  от  $[Q]$  имеют нелинейный характер.

В растворах флуоресцентного наномаркера с белком в условиях, описываемых в данной работе, определяющую роль в тушении флуоресценции наномаркера при взаимодействии с белком играет образование комплексов, и тушение флуоресценции статическое. В этом случае отклонения от линейности зависимостей  $(F_0/F) - I$  от  $[Q]$  объясняются несколькими типами механизмов (предположительно, ионного и ковалентного) образования комплексов наномаркера с белком.

Определенные из тушения флуоресценции бенгальского розового добавлением различных концентраций альбумина человека константы тушения флуоресценции фактически ассоциируются с константами связывания наномаркера с белком. В работе рассмотрены три различные модели определения констант тушения флуоресценции бенгальского розового при его взаимодействии с сывороточным альбумином человека.

1) Первая модель. Простая модель Штерна – Фольмера.

При тушении флуоресценции наномаркера бенгальского розового в растворах добавлением различных концентраций тушителя – сывороточного альбумина человека можно согласно теории Штерна – Фольмера записать уравнение:

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

$K$  – эффективная константа тушения флуоресценции бенгальского розового или, в случае одного сайта связывания на альбумине человека для одной молекулы бенгальского розового ( $N=1$ ), эффективная константа связывания бенгальского розового 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.

В рамках данной первой модели можно определить некие эффективные константы тушения флуоресценции (константы тренда,  $K_{эфф}$ ) бенгальского розового в растворах альбумина, отражающие связывание наномаркера с белком, при различных значениях рН (табл. 1). Определенные по линии тренда зависимостей  $(F_0/F) - 1$  от  $[Q]$  константы  $K_{эфф}$  усреднено учитывают все механизмы взаимодействий наномаркера с белком.

**Таблица 1.** Эффективные константы тушения флуоресценции бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека, отражающие связывание бенгальского розового с альбумином человека (модель 1).

рН	3,5	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0
$K_{эфф}, M^{-1}$	$9,25 \times 10^3$	$6,67 \times 10^3$	$4,82 \times 10^3$	$2,31 \times 10^3$	$0,81 \times 10^3$	$0,32 \times 10^3$

Как видно из табл. 1, для бенгальского розового характерна монотонно убывающая зависимость эффективной константы связывания его с сывороточным альбумином человека с ростом рН, что объясняется соотношением электрических зарядов бенгальского розового и альбумина человека: по мере увеличения рН белок становится отрицательно заряженным и все хуже связывается с бенгальским розовым.

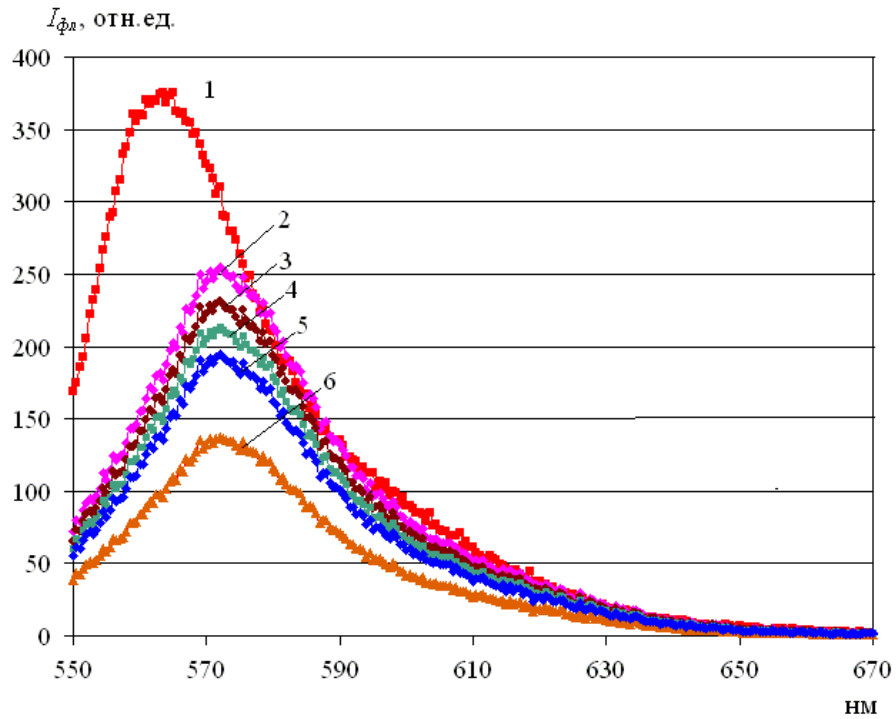


Рис.3.2.1.Спектры флуоресценции (возбуждение 540 нм) бенгальского розового в растворах (рН 3,5) с различными концентрациями сывороточного альбумина человека: 0 мкМ (1), 10 мкМ (2), 20 мкМ (3), 50 мкМ (4), 100 мкМ (5), 150 мкМ (6).

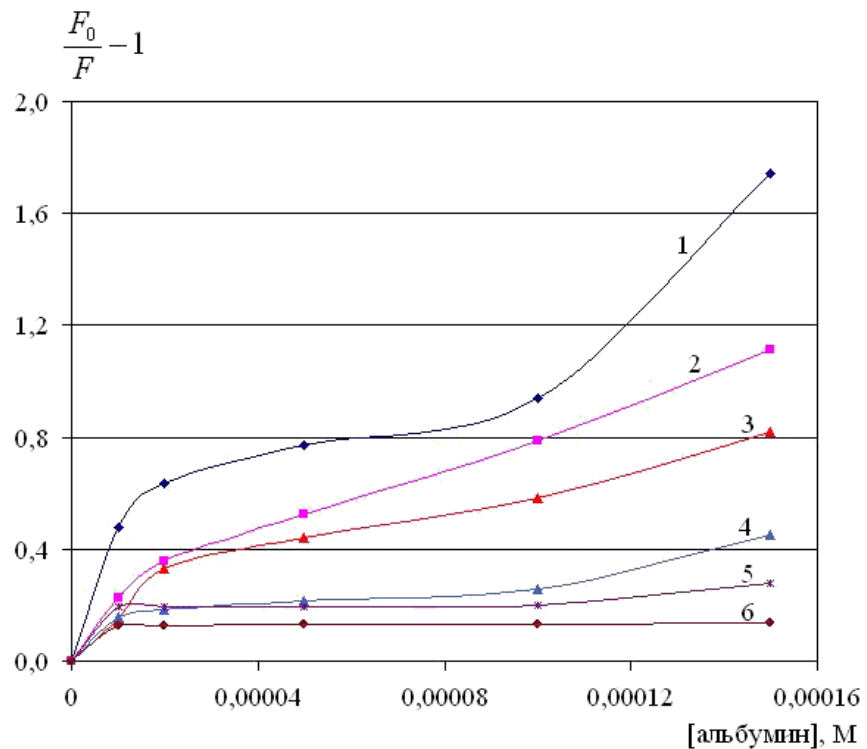


Рис. 3.2.2. Графики Штерна-Фольмера тушения флуоресценции бенгальского розового добавлением различных концентраций сывороточного альбумина человека при различных значениях рН: 3,5 (1), 4,0 (2), 5,0 (3), 6,0 (4), 7,0 (5), 8,0 (6).



2) Вторая модель. Разбивание зависимостей  $(F_0/F) - I$  от  $[Q]$  на два линейных случая.

Для более точного описания полученных зависимостей  $(F_0/F) - I$  от  $[Q]$  их можно разложить в рамках второй модели на две составляющие – в области концентраций альбумина до 20 мкМ и в области концентраций альбумина больше 20 мкМ – каждую из которых можно линейно аппроксимировать и получить, соответственно, две константы (табл. 2) тушения флуоресценции бенгальского розового, отражающие различные виды взаимодействий наномаркера с сывороточным альбумином человека.

**Таблица 2.** Константы (в рамках модели 2) тушения флуоресценции ( $K_1$  – в области концентраций альбумина до 20 мкМ,  $K_2$  – в области концентраций альбумина больше 20 мкМ) бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека, отражающие связывание наномаркера с белком.

рН	3,5	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0
$K_1, M^{-1}$	$4,80 \times 10^4$	$2,24 \times 10^4$	$1,53 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$	$0,15 \times 10^4$	$0,03 \times 10^4$
$K_2, M^{-1}$	$3,64 \times 10^3$	$3,04 \times 10^3$	$2,18 \times 10^3$	$1,99 \times 10^3$	$0,54 \times 10^3$	$0,15 \times 10^3$

Из данных табл. 2 видно, что обе константы тушения флуоресценции ( $K_1$  и  $K_2$ ) бенгальского розового, полученные в данной модели, имеют монотонно убывающий с ростом рН характер, что повторяет характер зависимости эффективной константы ( $K_{эфф}$ ) тушения флуоресценции бенгальского розового, полученной в первой модели.

3) Третья модель. Описание зависимостей  $(F_0/F) - I$  сигмоидальной функцией.

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

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

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

В рамках данной модели, основанной на использовании сигмоидальной (при  $n < 1$ ) функции описания тушения флуоресценции, определены константы тушения флуоресценции бенгальского розового (табл. 3), отражающие связывание наномаркера с белком, и коэффициенты кооперативности.

**Таблица 3.** Константы (в рамках модели 3) тушения флуоресценции ( $K_{сизм}$ ) бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека, отражающие связывание наномаркера с белком, где  $n$  – кооперативность.

pH	3,5	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0
$K_{сизм}, M^{-1}$	$1,43 \times 10^4$	$0,72 \times 10^4$	$0,44 \times 10^4$	$0,11 \times 10^4$	$0,04 \times 10^4$	$0,01 \times 10^4$
$n$	0,51	0,62	0,64	0,64	0,65	0,86

Из данных табл. 3 видно, как и в предыдущих моделях, константа тушения флуоресценции бенгальского розового имеет убывающий характер с ростом pH.

Из табл. 3 видно, что существует явление антикооперативности между двумя механизмами связывания бенгальского розового с альбумином.

### **§3.3. Определение степени молекулярной ассоциации бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека при различных значениях pH**

В данном параграфе представлены результаты исследований процессов молекулярной ассоциации наномаркера бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека при различных значениях pH.

В ходе исследований получены спектры поглощения бенгальского розового в растворах, как содержащих сывороточный альбумин человека, так и не содержащих белок, при различных значениях pH и при различных концентрациях бенгальского розового.

В качестве примеров, на рис. 3.3.1 (а) и (б) представлены спектры поглощения бенгальского розового (50 мкМ) при pH 3,5 в растворах без белка и в растворах 150 мкМ сывороточного альбумина человека соответственно.

В полученных спектрах поглощения бенгальского розового в растворах, как содержащих альбумин, так и не содержащих альбумин, наблюдается наличие двух максимумов поглощения – длинноволнового максимума мономеров бенгальского розового и коротковолнового максимума ассоциатов бенгальского розового.

По полученным спектрам поглощения рассчитана степень ассоциации ( $I-X$ ) молекул бенгальского розового в растворах, как не содержащих сывороточный альбумин человека (рис. 3.3.2. (а)), так и содержащих сывороточный альбумин человека (рис. 3.3.2. (б)), при различных значениях концентрации бенгальского розового и при различных значениях pH.

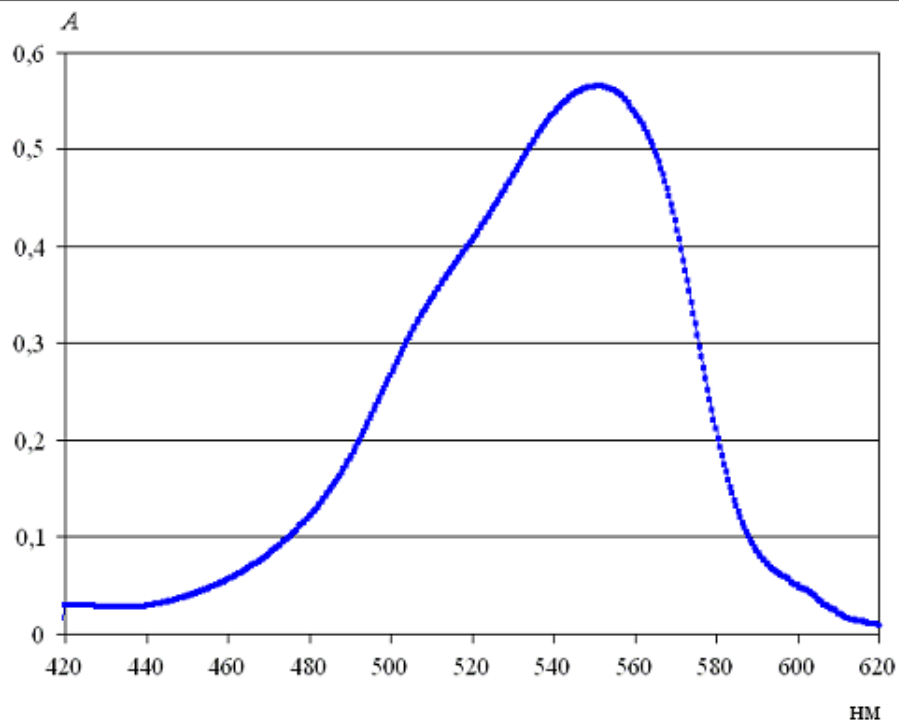


Рис. 3.3.1. (а) Спектр поглощения бенгальского розового (50 мкМ) в растворе (рН 3,5).

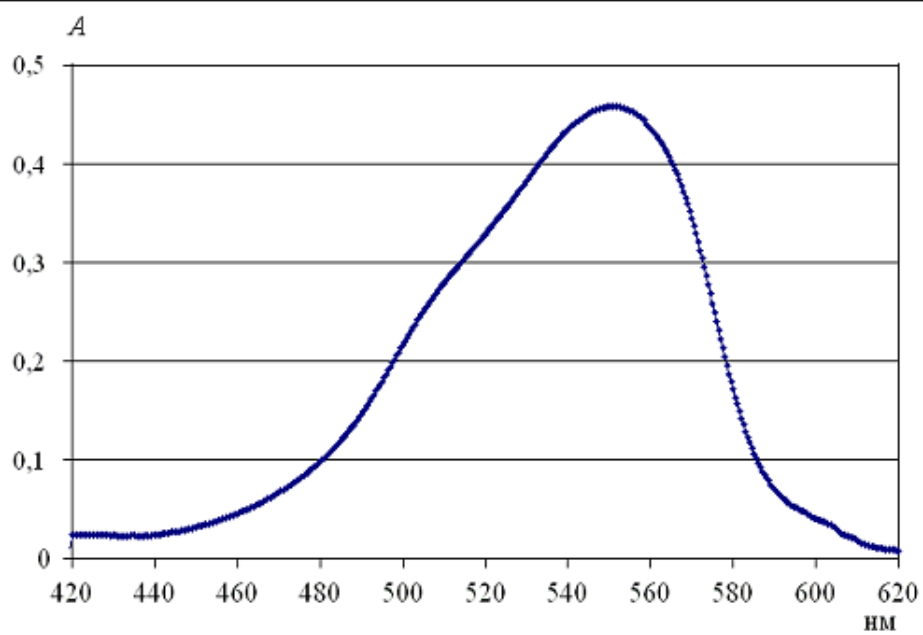


Рис. 3.3.1. (б) Спектр поглощения бенгальского розового (50 мкМ) в растворе (рН 3,5) сывороточного альбумина человека (150 мкМ).

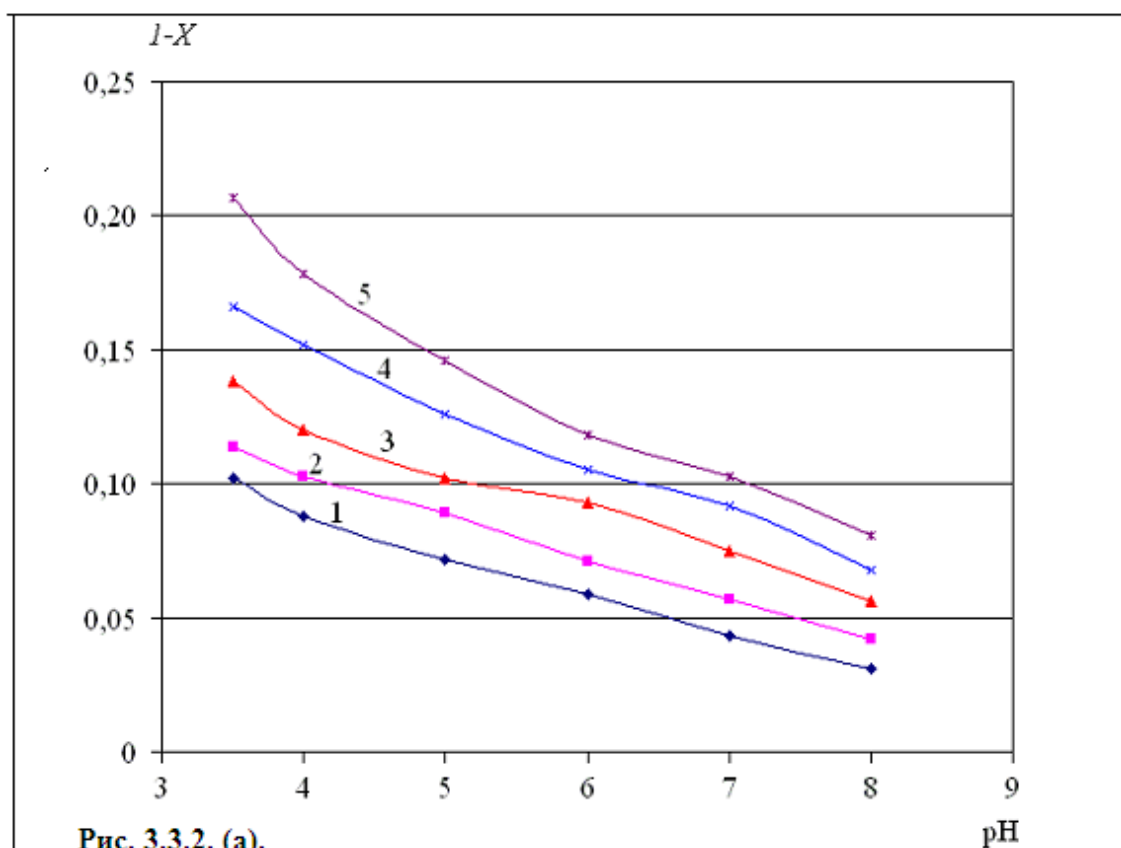


Рис. 3.3.2. (а).

Зависимость степени ассоциации бенгальского розового от рН растворов, не содержащих белка, при различных концентрациях бенгальского розового: 3 мкМ (1), 10 мкМ (2), 20 мкМ (3), 30 мкМ (4), 50 мкМ (5).

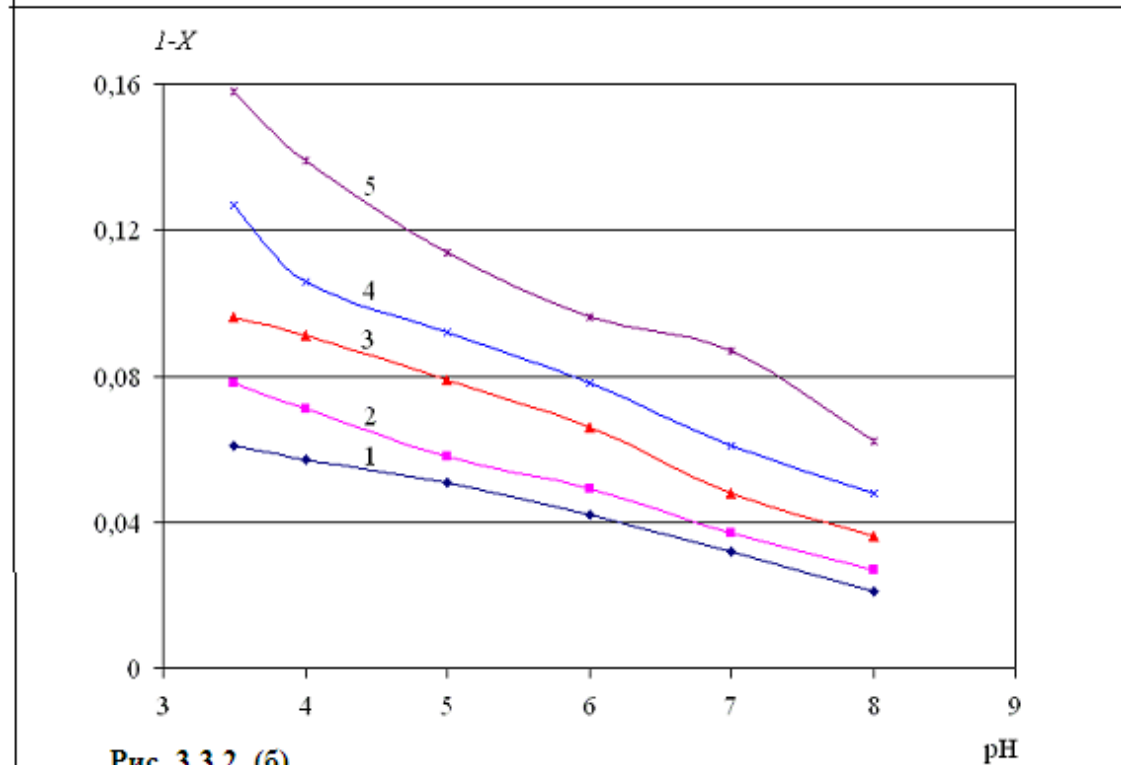


Рис. 3.3.2. (б).

Зависимость степени ассоциации бенгальского розового от рН в растворах с сывороточным альбумином человека (150 мкМ) при различных концентрациях бенгальского розового: 3 мкМ (1), 10 мкМ (2), 20 мкМ (3), 30 мкМ (4), 50 мкМ (5).

Видно (рис. 3.3.2), что при увеличении значения рН в рамках каждой концентрации бенгальского розового наблюдается уменьшение степени ассоциации молекул бенгальского розового, как в растворах с белком, так и в растворах без белка. Данный эффект объясняется электростатическими причинами: при увеличении рН возрастает отрицательный заряд молекул бенгальского розового.

Для бенгальского розового значения  $pK(OH) = 2,6$  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 значений рН возрастает отрицательный заряд бенгальского розового, и его усиливающееся взаимное отталкивание мешает образованию ассоциатов.

При значениях рН, меньших 4,0, но больших 3,5, бенгальский розовый сохраняет отрицательный заряд только на гидроксильной группе, и процессы его ассоциации происходят интенсивнее, чем на высоких значениях рН, больших 4,0.

Также видно, что степень ассоциации бенгальского розового, как в растворах без белка, так и в растворах с сывороточным альбумином человека, возрастает с увеличением концентрации бенгальского розового.

Из сравнения рис. 3.3.2 (а) и рис. 3.3.2 (б) видно, что степень ассоциации молекул бенгальского розового в растворах альбумина человека 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 сывороточного альбумина человека и, соответственно, уменьшением доли несвязанных с белком молекул бенгальского розового, способных к образованию ассоциатов.

## Глава 4. Исследование вращательной диффузии наномаркеров флуоресцеина, эритрозина, эозина и бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека (собственные результаты и их обсуждение)

### §4.1. Определение параметров вращательной диффузии наномаркеров флуоресцеина, эритрозина, эозина и бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека при различных значениях рН

В данном параграфе представлены результаты исследований флуоресцентных характеристик и параметров вращательной диффузии наномаркеров семейства флуоресцеина (флуоресцеина, эритрозина, эозина и бенгальского розового) в растворах сывороточного альбумина человека при различных значениях рН.

Вначале рассмотрим исходное соединение этого гомологичного ряда – флуоресцеин.

В ходе исследований были получены спектры флуоресценции ( $\lambda_{возб} = 440$  нм) флуоресцеина в растворах без белка и в растворах, содержащих сывороточный альбумин человека, при различных значениях рН. В растворах с сывороточным альбумином человека происходит красное смещение максимумов спектров флуоресценции флуоресцеина по сравнению с растворами без белка.

На рис. 4.1.1 представлены зависимости интенсивности в максимуме спектра флуоресценции флуоресцеина от рН в растворах без белка и в растворах с сывороточным альбумином человека. При связывании флуоресцеина с молекулами сывороточного альбумина человека флуоресценция флуоресцеина тушится (рис. 4.1.1). По тушению флуоресценции флуоресцеина видно, что наибольшее связывание флуоресцеина с сывороточным альбумином человека происходит при рН 5,0 – 6,0, т.е. в той области, где молекулы флуоресцеина электрически нейтральны, а белок слабо отрицательно заряжен.

В работе проведена количественная оценка степени поляризации ( $P$ ) и анизотропии ( $r$ ) поляризованной флуоресценции флуоресцеина в растворах, как не содержащих белок, так и содержащих сывороточный альбумин человека, при различных значениях рН. Степень поляризации и анизотропии флуоресценции флуоресцеина рассчитывалась по значениям  $I_{||}$  и  $I_{\perp}$  в максимуме спектра испускания его флуоресценции.

На рис. 4.1.2 представлены зависимости степени поляризации и анизотропии флуоресценции флуоресцеина от рН растворов, как не содержащих белка, так и содержащих сывороточный альбумин человека.

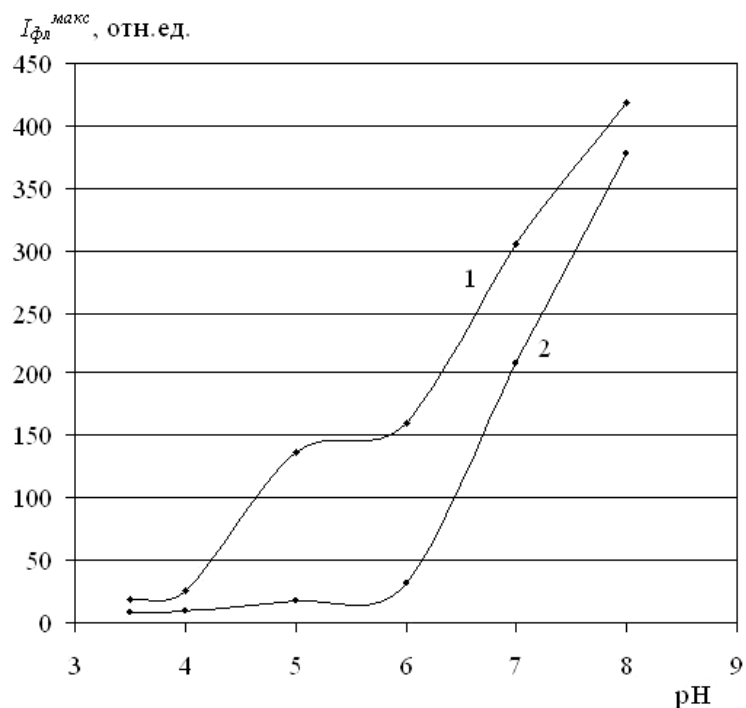


Рис. 4.1.1. Зависимость интенсивности в максимуме спектра флуоресценции (длина волны возбуждения = 440 нм) флуоресцеина (3 мкМ) от рН в растворах без белка (1) и в растворах с сывороточным альбумином человека (150 мкМ) (2).

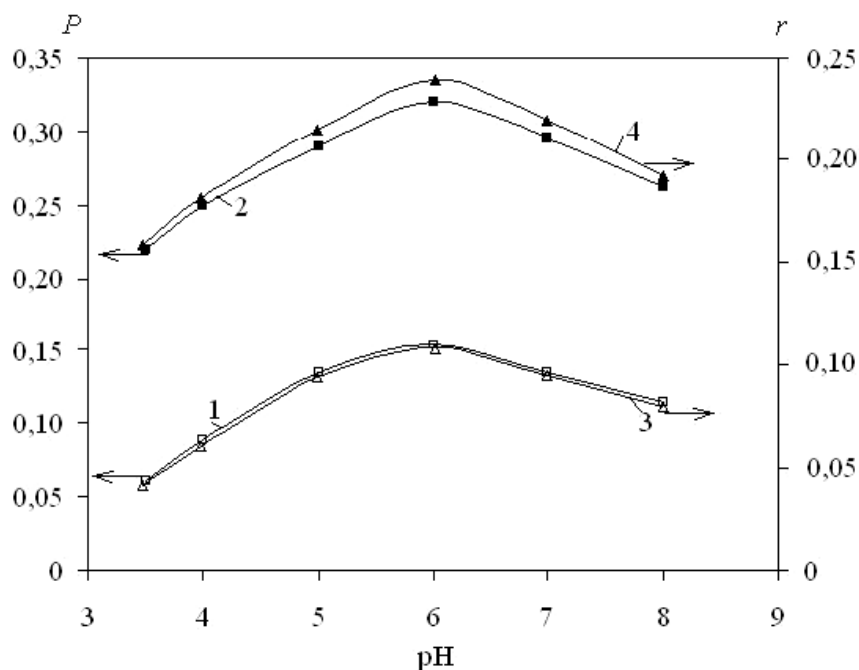


Рис. 4.1.2. Зависимости степени поляризации (1, 2) и анизотропии (3, 4) флуоресценции флуоресцеина (3 мкМ) в растворах, не содержащих белка (1, 3), и в растворах 150 мкМ сывороточного альбумина человека (2, 4) от величины рН.

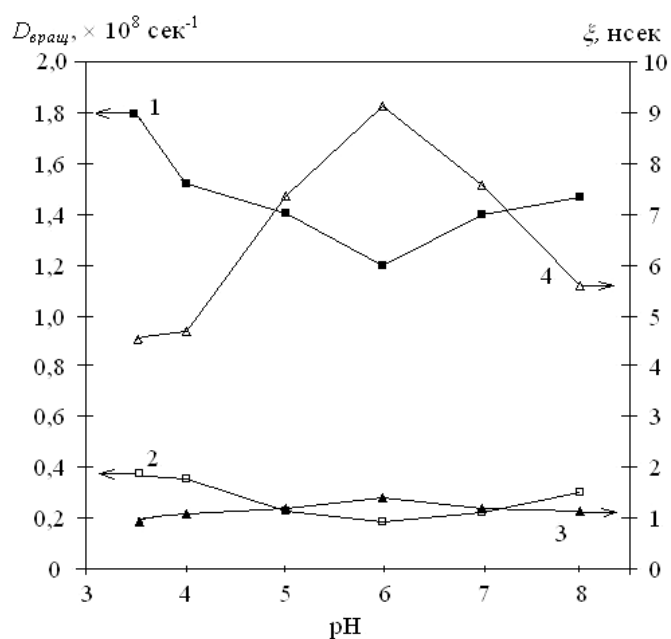


Рис. 4.1.3. Зависимости коэффициента вращательной диффузии (1, 2) и времени релаксации (3, 4) флуоресцеина (3 мкМ) в растворах, не содержащих белка (1, 3), и в растворах 150 мкМ сывороточного альбумина человека (2, 4) от величины рН.

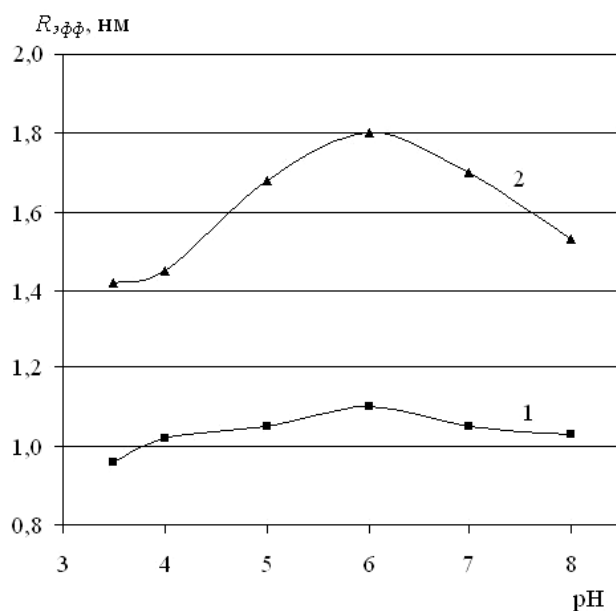


Рис. 4.1.4. Зависимости эффективного радиуса Эйнштейна молекул флуоресцеина (3 мкМ) в растворах без белка (1) и в растворах 150 мкМ сывороточного альбумина человека (2) от величины рН.



Видно (рис. 4.1.2), что поляризация флуоресценции флуоресцеина в растворах альбумина человека больше, чем в растворах без белка: поскольку растворы флуоресцеина данной концентрации (3 мкМ) являются разбавленными растворами, то в отсутствие безызлучательного переноса энергии между молекулами флуоресцеина основной причиной деполяризации флуоресценции является вращательная диффузия молекул наномаркера. Как в растворах без белка, так и в растворах сывороточного альбумина человека, поляризация флуоресценции флуоресцеина нелинейно зависит от рН с максимумом при рН 6,0.

В работе определены значения коэффициента вращательной диффузии флуоресцеина, как в растворах без белка, так и в растворах сывороточного альбумина человека, при различных значениях рН (рис. 4.1.3). В растворах с белком коэффициент вращательной диффузии флуоресцеина меньше, чем в растворах без белка, что объясняется связыванием наномаркера с белком.

Как в растворах без белка, так и в растворах с белком, коэффициент вращательной диффузии флуоресцеина нелинейно зависит от рН с минимумом при рН 6,0. Зависимость вращательной диффузии флуоресцеина от рН объясняется сильным влиянием на нее процессов молекулярной ассоциации флуоресцеина и эффективности его связывания с белком, зависящих от рН, что связано с наличием слабо электроотрицательных атомов водорода в формуле флуоресцеина.

В работе определено при различных значениях рН время вращательной релаксации флуоресцеина (рис. 4.1.3). Видно, что в растворах без белка время релаксации флуоресцеина существенно меньше, чем в растворах альбумина. Несвязанный с белком флуоресцеин имеет небольшое время релаксации, меньшее времени жизни его флуоресценции (3,5 нсек), что приводит к слабой поляризации флуоресценции флуоресцеина в растворах без белка.

В работе рассчитан эффективный радиус Эйнштейна молекул флуоресцеина (рис. 4.1.4) при различных значениях рН. В растворах без белка эффективный радиус наномаркера практически соответствует реальному размеру молекулы наномаркера, а в растворах с альбумином человека эффективный радиус является не реальным размером, а представляет собой эффективный размер, связанный с процентным содержанием связанного с белком наномаркера от его общего количества в растворе.

Эффективный радиус молекул флуоресцеина нелинейно зависит от рН с максимумом при рН 6,0. В растворах без белка эффективный радиус флуоресцеина в среднем при различных рН равен 1,0 нм, а в растворах с белком возрастает примерно до 1,4 – 1,8 нм, что отражает его связывание с альбумином, а также указывает на то, что

далеко не весь наномаркер связывается с белком (эффективный размер альбумина порядка 9 нм).

Рассмотрим 4-йод-производную флуоресцеина – эритрозин.

В ходе исследований были получены спектры флуоресценции ( $\lambda_{возб} = 530$  нм) эритрозина в растворах без белка и в растворах, содержащих сывороточный альбумин человека, при различных значениях рН. В растворах с сывороточным альбумином человека происходит красное смещение максимума спектра флуоресценции эритрозина по сравнению с растворами без белка. На рис. 4.1.5 представлены зависимости интенсивности в максимуме спектра флуоресценции эритрозина от рН в растворах без белка и в растворах с сывороточным альбумином человека.

В растворах без белка при увеличении рН от 3,5 до 5,5 наблюдается уменьшение интенсивности флуоресценции эритрозина, а при увеличении рН от 5,5 и выше интенсивность флуоресценции не меняется. Уменьшение интенсивности флуоресценции в области рН 3,5 – 5,5 объясняется увеличением отрицательного заряда эритрозина и увеличением дипольной экранировки молекулами воды. При рН выше 5,5 заряд эритрозина больше не меняется (он находится в дианионной форме), поэтому дальнейшего тушения флуоресценции эритрозина молекулами воды не наблюдается.

При связывании эритрозина с молекулами сывороточного альбумина человека флуоресценция эритрозина тушится (рис. 4.1.5). По тушению флуоресценции эритрозина видно, что наибольшее связывание эритрозина с альбумином происходит в области рН, меньших 5,0. При рН, меньших 5,0, белок в целом положительно заряжен, а эритрозин или находится в нейтральной форме (при рН, меньших 3,6) или находится в слабо отрицательно заряженной форме моноаниона (при рН 3,6 – 5,0).

В работе также проведены исследования поляризованной флуоресценции наномаркера эритрозина в растворах. Степень поляризации ( $P$ ) и анизотропии ( $r$ ) флуоресценции эритрозина рассчитывалась по значениям  $I_{||}$  и  $I_{\perp}$  в максимуме спектра испускания флуоресценции. На рис. 4.1.6 представлены зависимости степени поляризации и анизотропии флуоресценции эритрозина от рН. Видно, что поляризация флуоресценции эритрозина в растворах альбумина больше, чем в растворах без белка.

В работе определены коэффициенты вращательной диффузии эритрозина при различных значениях рН растворов, как без белка, так и содержащих сывороточный альбумин человека (рис. 4.1.7). В растворах сывороточного альбумина человека по сравнению с растворами без белка коэффициент вращательной диффузии эритрозина при всех значениях рН уменьшается вследствие его связывания с молекулами белка, что и приводит к увеличению поляризации флуоресценции эритрозина.

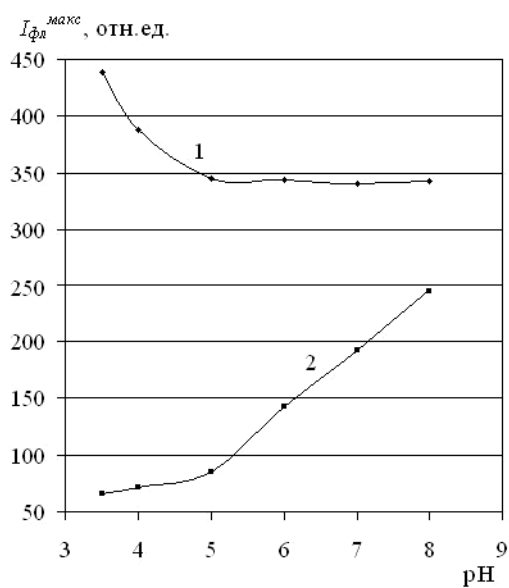


Рис. 4.1.5. Зависимость интенсивности в максимум спектра флуоресценции (длина волны возбуждения = 530 нм) эритрозина (30 мкМ) от рН в растворах без белка (1) и в растворах с сывороточным альбумином человека (150 мкМ) (2).

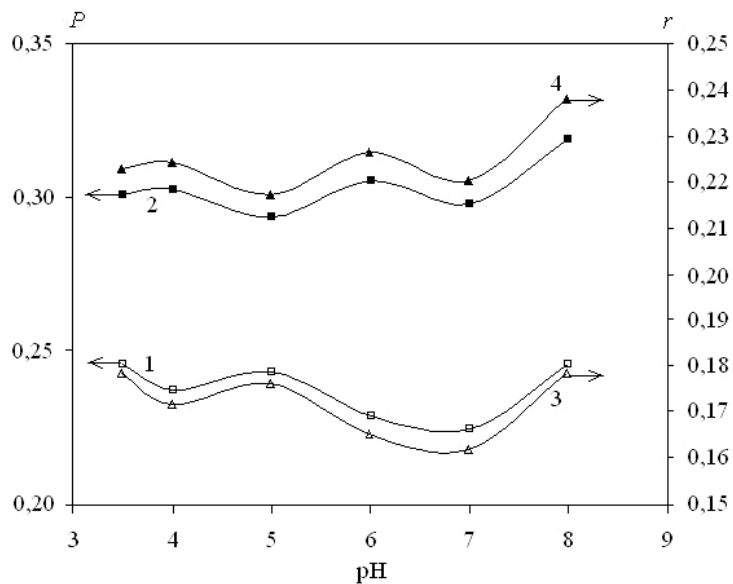


Рис. 4.1.6. Зависимости степени поляризации (1, 2) и анизотропии (3, 4) флуоресценции эритрозина (30 мкМ) в растворах, не содержащих белка (1, 3), и в растворах 150 мкМ сывороточного альбумина человека (2, 4), от величины рН.

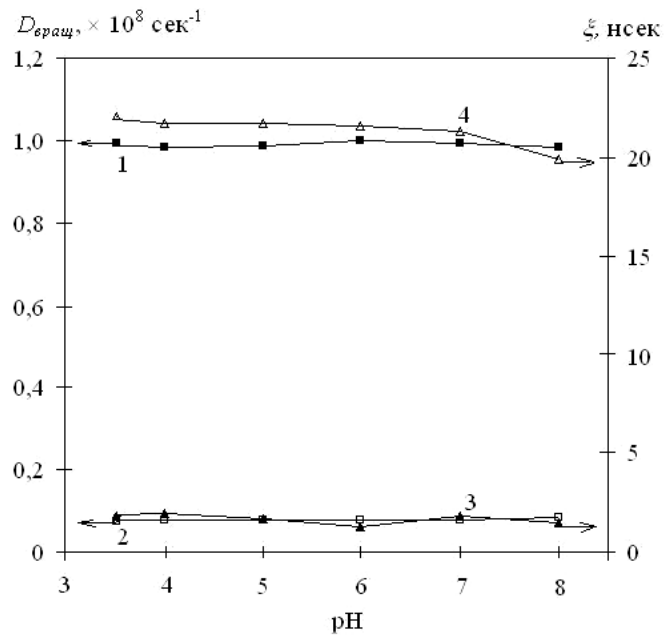


Рис. 4.1.7. Зависимости коэффициента вращательной диффузии (1, 2) и времени релаксации (3, 4) эритрозина (30 мкМ) в растворах, не содержащих белка (1, 3), и в растворах 150 мкМ сывороточного альбумина человека (2, 4) от величины рН.

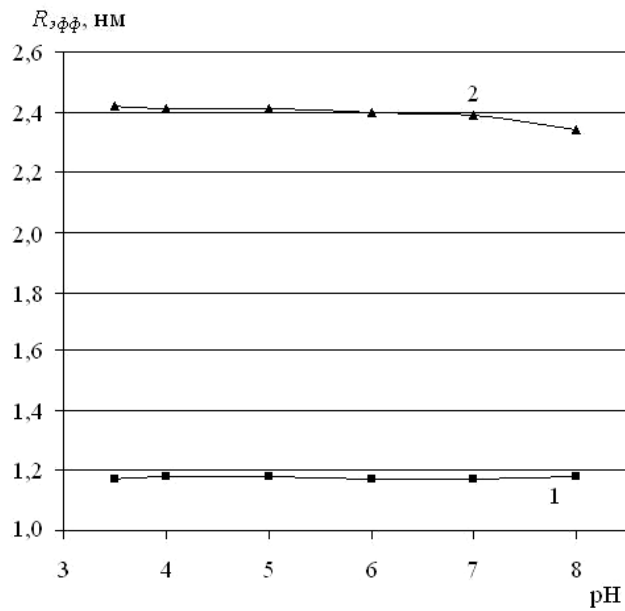


Рис. 4.1.8. Зависимости эффективного радиуса Эйнштейна молекул эритрозина (30 мкМ) в растворах без белка (1) и в растворах 150 мкМ сывороточного альбумина человека (2) от величины рН.

Как в растворах без белка, так и в растворах с белком, коэффициент вращательной диффузии эритрозина (рис. 4.1.7) не зависит от рН (в исследуемом диапазоне рН), что объясняется наличием в молекулах эритрозина сильно электроотрицательных атомов йода, затрудняющих изменения вращательной диффузии молекул эритрозина при вариации рН в связи с сильным взаимодействием эритрозина с полярной окружающей средой. Наличие сильно электроотрицательных атомов йода в структурной формуле эритрозина приводит к тому, что на фоне сильного взаимодействия молекул эритрозина с окружающей полярной средой вклады в изменение вращательной диффузии эритрозина от его молекулярной ассоциации, зависящей от рН, не существенны, что и приводит к независимости поляризации флуоресценции эритрозина от рН.

Также в работе определено при различных значениях рН время вращательной релаксации эритрозина (рис. 4.1.7). В растворах без белка время релаксации эритрозина существенно меньше, чем в растворах сывороточного альбумина человека. Свободный несвязанный с белком эритрозин имеет небольшое время разупорядочивания вследствие тепловой диффузии, меньшее времени жизни его флуоресценции, что приводит к сравнительно небольшой поляризации флуоресценции эритрозина в растворах без белка.

В работе рассчитан эффективный радиус молекул эритрозина (рис. 4.1.8) при различных значениях рН. В растворах без белка эффективный радиус эритрозина в среднем при различных рН равен 1,17 нм, а в растворах с белком возрастает примерно до 2,40 нм, что отражает его связывание с альбумином человека, а также указывает на то, что не весь эритрозин связывается с белком (размер альбумина порядка 9 нм).

Рассмотрим 4-бром-производную флуоресцеина – эозин.

Обнаружено, что максимумы спектров флуоресценции эозина в растворах с сывороточным альбумином человека смещены в красную область по сравнению с максимумами спектров флуоресценции эозина в растворах без белка при соответствующих значениях рН. Также в растворах сывороточного альбумина человека наблюдается тушение флуоресценции эозина. На рис. 4.1.9 представлены зависимости интенсивности в максимуме спектра флуоресценции эозина от рН в растворах без белка и в растворах с сывороточным альбумином человека.

Видно (рис. 4.1.9), что в растворах без белка интенсивность в максимуме спектра флуоресценции эозина уменьшается, а затем выходит на постоянное значение с увеличением рН. При рН, больших 5,0, молекулы эозина в среднем заряжены сильно отрицательно (дианионы), что вызывает их экранировку дипольными молекулами воды. При рН, меньших 5,0, но больших 3,0, молекулы эозина в среднем слабо отрицательно заряжены (моноанионы), поэтому экранировка практически отсутствует.

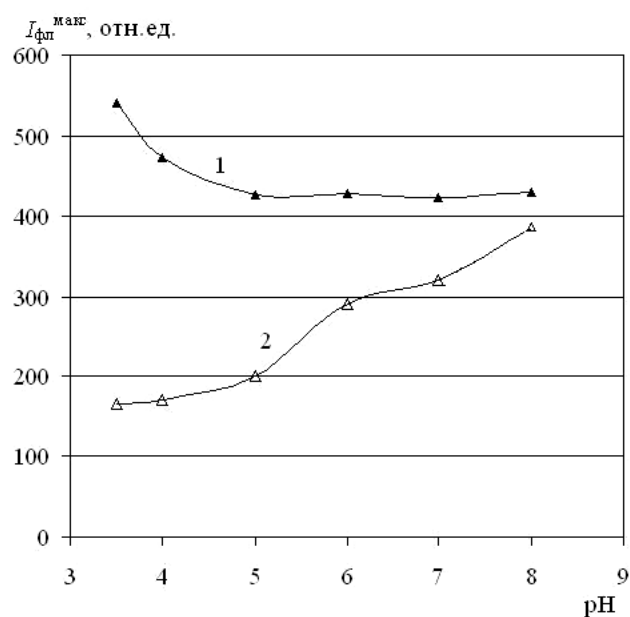


Рис. 4.1.9. Зависимость интенсивности в максимуме спектра флуоресценции (длина волны возбуждения = 520 нм) эозина (30 мкМ) от рН в растворах без белка (1) и в растворах 150 мкМ сывороточного альбумина человека (2).

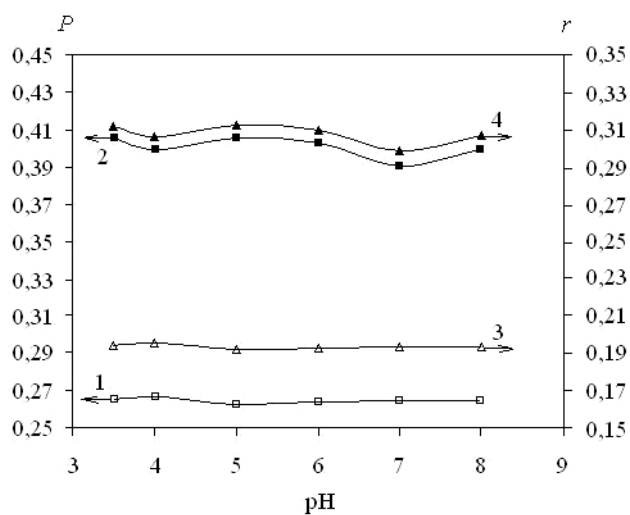


Рис. 4.1.10. Зависимости степени поляризации (1, 2) и анизотропии (3, 4) флуоресценции эозина (30 мкМ) в растворах, не содержащих белка (1, 3), и в растворах 150 мкМ сывороточного альбумина человека (2, 4) от величины рН.

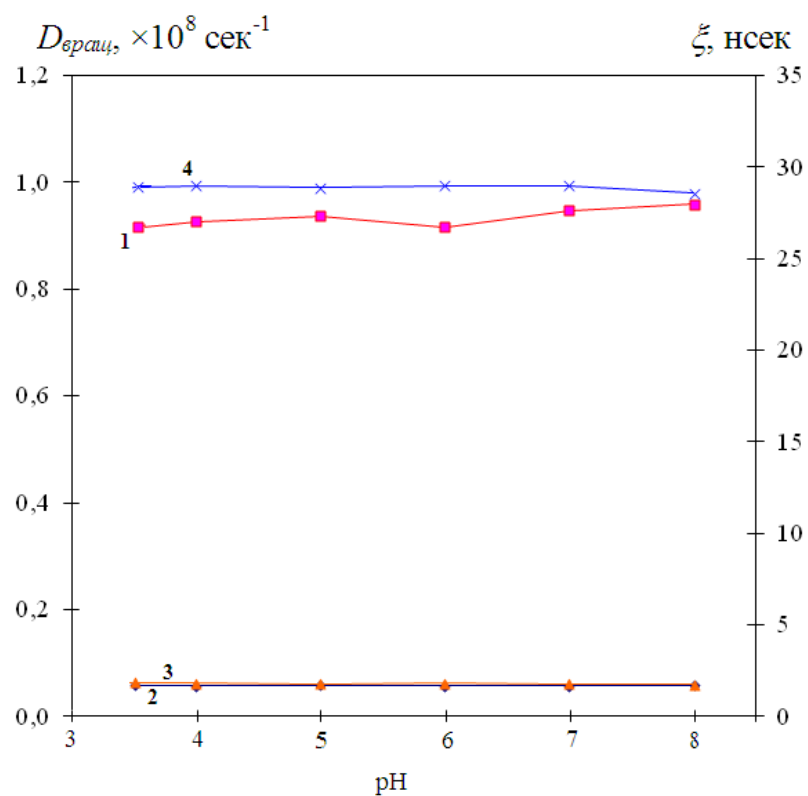


Рис. 4.1.11. Зависимость коэффициента вращательной диффузии (1, 2) и времени релаксации (3, 4) эозина (30 мкМ) в растворах, не содержащих белок (1, 3), и в растворах 150 мкМ сывороточного альбумина человека (2, 4) от величины рН.

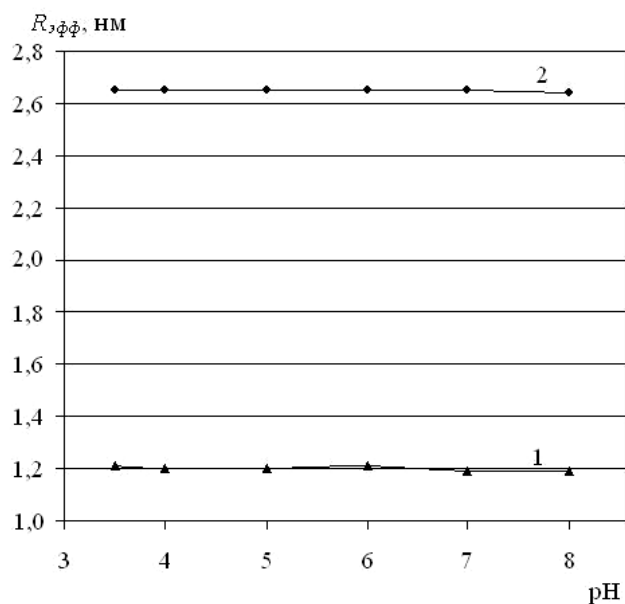


Рис. 4.1.12. Зависимости от величины рН эффективного радиуса Эйнштейна молекул эозина (30 мкМ) в растворах без белка (1) и в растворах 150 мкМ сывороточного альбумина человека (2).

Низкая интенсивность флуоресценции эозина в растворах альбумина человека при значениях рН, меньших 5,0, обусловлена интенсивным связыванием эозина с белком.

В работе также проведены исследования поляризованной флуоресценции наномаркера эозина. В работе степень поляризации и анизотропии флуоресценции эозина рассчитывалась по значениям  $I_{||}$  и  $I_{\perp}$  в максимуме спектра испускания флуоресценции. Зависимости от значения рН степени поляризации и анизотропии флуоресценции эозина в растворах представлены на рис. 4.1.10. Видно, что степень поляризации и степень анизотропии флуоресценции эозина в растворах сывороточного альбумина человека больше, чем в растворах, не содержащих белка.

В работе рассчитаны коэффициенты вращательной диффузии эозина при различных значениях рН, как в растворах без белка, так и в растворах альбумина человека (рис. 4.1.11). В случае связывания наномаркера эозина с молекулами альбумина коэффициент вращательной диффузии эозина уменьшается по сравнению с аналогичным коэффициентом вращательной диффузии свободного эозина в растворах без белка.

Как следует из полученных данных (рис. 4.1.10, 4.1.11), поляризация флуоресценции эозина, а также коэффициент вращательной диффузии эозина не зависят от значения рН (в диапазоне  $3,5 \leq \text{pH} \leq 8,0$ ), как в растворах с сывороточным альбумином человека, так и в растворах без белка, что объясняется наличием в молекулах эозина сильно электроотрицательных атомов брома, затрудняющих изменения вращательной диффузии молекул эозина при вариации значений рН в связи с сильным взаимодействием молекул эозина с полярной окружающей средой.

Наличие сильно электроотрицательных атомов брома в структурной формуле эозина приводит к тому, что на фоне сильного взаимодействия молекул эозина с окружающей полярной средой вклады в изменение коэффициента вращательной диффузии эозина от его молекулярной ассоциации, зависящей от рН, не существенны, что и приводит к независимости поляризации флуоресценции эозина от рН.

Также в работе определено при различных значениях рН время вращательной релаксации эозина (рис. 4.1.11). Видно, что в растворах без белка время релаксации эозина существенно меньше, чем в растворах сывороточного альбумина человека. Свободный несвязанный с белком эозин имеет небольшое время разупорядочивания вследствие тепловой диффузии, меньшее времени жизни его флуоресценции, что приводит к не очень большой поляризации флуоресценции эозина в растворах без белка.

В работе рассчитан эффективный радиус Эйнштейна молекул эозина (рис. 4.1.12) при различных значениях рН. В растворах без белка эффективный радиус эозина в среднем равен 1,20 нм, а в растворах с белком возрастает примерно до 2,65 нм, что



отражает его связывание с сывороточным альбумином человека, а также указывает на то, что не весь эозин связывается с белком.

Рассмотри 4-хлор-4-йод-производную флуоресцеина – бенгальский розовый.

Проведены исследования поляризованной флуоресценции бенгальского розового. В работе степень поляризации и анизотропии флуоресценции бенгальского розового рассчитывалась по значениям  $I_{||}$  и  $I_{\perp}$  в максимуме спектра испускания флуоресценции.

Зависимости от значения рН степени поляризации и анизотропии флуоресценции бенгальского розового в растворах представлены на рис. 4.1.13. Видно, что степень поляризации и степень анизотропии флуоресценции бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека больше, чем в растворах, не содержащих белка.

В работе по теории вращательной деполяризации Левшина – Перрена рассчитаны коэффициенты вращательной диффузии бенгальского розового при различных значениях рН, как в растворах без белка, так и в растворах альбумина человека (рис. 4.1.14). В случае связывания наномаркера бенгальского розового с молекулами альбумина коэффициент вращательной диффузии бенгальского розового уменьшается по сравнению с аналогичным коэффициентом вращательной диффузии свободного бенгальского розового в растворах без белка.

Как следует из полученных данных (рис. 4.1.13, 4.1.14), поляризация флуоресценции бенгальского розового, а также коэффициент вращательной диффузии бенгальского розового не зависят от значения рН (в диапазоне  $3,5 \leq \text{pH} \leq 8,0$ ), как в растворах с сывороточным альбумином человека, так и в растворах без белка, что объясняется наличием в молекулах бенгальского розового сильно электроотрицательных атомов хлора и йода, затрудняющих изменения вращательной диффузии молекул бенгальского розового при вариации значений рН в связи с сильным взаимодействием молекул бенгальского розового с полярной окружающей средой.

Наличие сильно электроотрицательных атомов хлора и йода в структурной формуле бенгальского розового приводит к тому, что на фоне сильного взаимодействия молекул бенгальского розового с окружающей полярной средой вклады в изменение коэффициента вращательной диффузии бенгальского розового от его молекулярной ассоциации, зависящей от рН, не существенны, что и приводит к независимости поляризации флуоресценции бенгальского розового от рН.

Также в работе определено при различных значениях рН время вращательной релаксации бенгальского розового (рис. 4.1.14). Видно, что в растворах без белка время релаксации бенгальского розового существенно меньше, чем в растворах сывороточного альбумина человека.

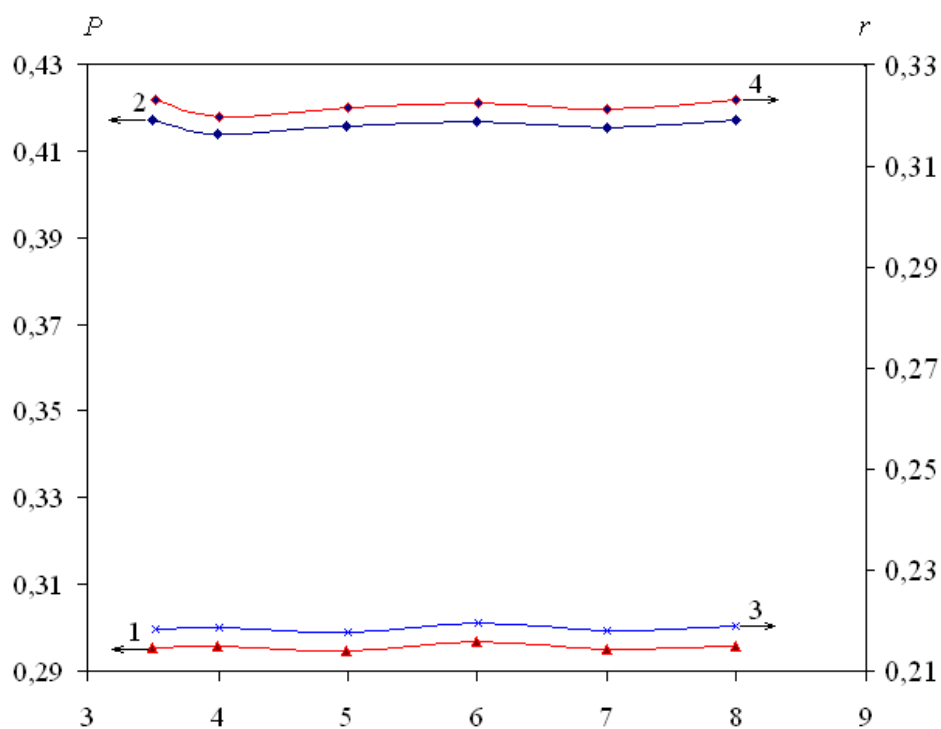


Рис. 4.1.13. Зависимости степени поляризации (1, 2) и анизотропии (3, 4) флуоресценции бенгальского розового (3 мкМ) в растворах, не содержащих белка (1, 3), и в растворах 150 мкМ сывороточного альбумина человека (2, 4).

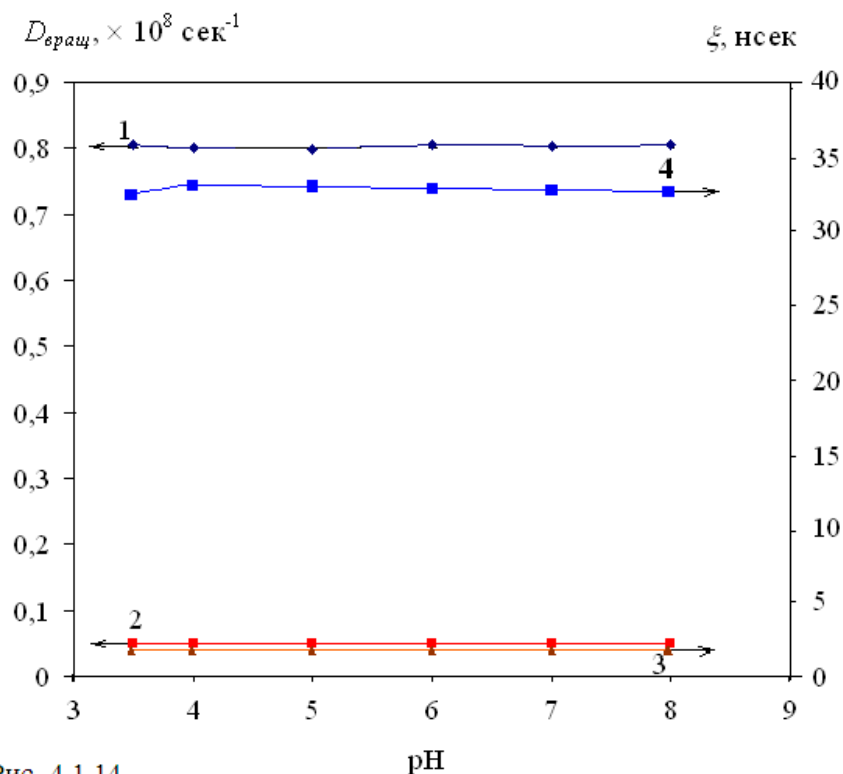


Рис. 4.1.14. Зависимости коэффициента вращательной диффузии (1, 2) и времени вращательной релаксации (3, 4) бенгальского розового (3 мкМ) в растворах, не содержащих белка (1, 3), и в растворах 150 мкМ сывороточного альбумина человека (2, 4), от величины рН.

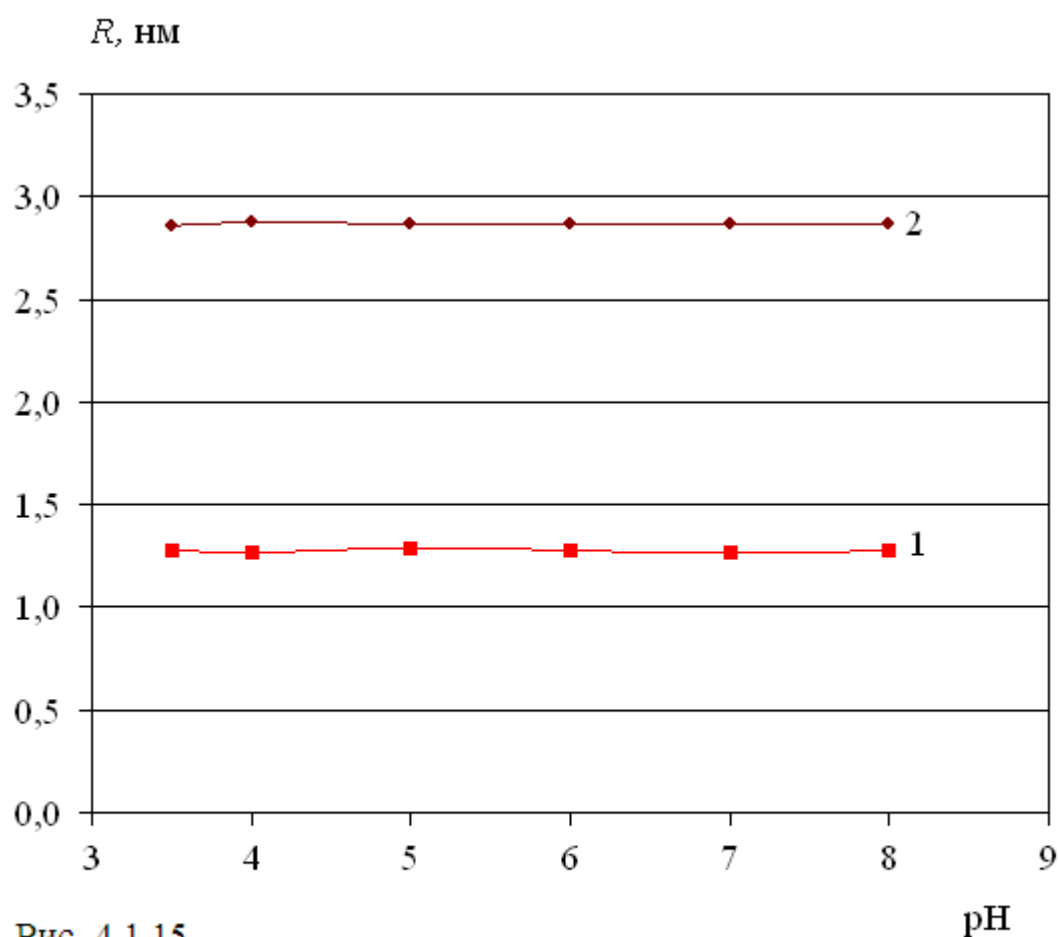


Рис. 4.1.15.

Зависимости эффективного радиуса Эйнштейна молекул бенгальского розового (3 мкМ) в растворах без белка (1) и в растворах сывороточного альбумина человека (2) от величины рН.

В работе рассчитан эффективный радиус Эйнштейна молекул бенгальского розового (рис. 4.1.15) при различных значениях pH.

В растворах без белка эффективный радиус Эйнштейна молекул бенгальского розового практически соответствует реальному размеру молекулы этого наномаркера, а в растворах с альбумином человека эффективный радиус Эйнштейна является не реальным размером, а представляет собой эффективный размер, связанный с процентным содержанием связанного с белком бенгальского розового от его общего количества в растворе. В растворах без белка эффективный радиус бенгальского розового в среднем равен 1,27 нм, а в растворах с белком возрастает примерно до 2,87 нм, что отражает его связывание с сывороточным альбумином человека, а также указывает на то, что не весь бенгальский розовый связывается с белком.

#### **§4.2. Сравнительный анализ вращательной диффузии исходного соединения флуоресцеина и его производных эритрозина, эозина и бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека при различных значениях pH**

При сравнительном анализе поляризованной флуоресценции наномаркеров флуоресцеина, эритрозина, эозина и бенгальского розового показано, что для всех четырех наномаркеров в растворах сывороточного альбумина человека значения степени поляризации и степени анизотропии флуоресценции наномаркера больше, чем в растворах без белка, что объясняется связыванием наномаркеров с молекулами сывороточного альбумина человека и, как определено по коэффициенту вращательной диффузии, уменьшением их вращательной диффузии, вызывающей деполяризацию флуоресценции.

В растворах сывороточного альбумина человека при всех значениях pH у всех четырех наномаркеров семейства флуоресцеина наблюдается уменьшение коэффициента вращательной диффузии, увеличение времени вращательной релаксации наномаркеров.

В тоже же время зависимости поляризации флуоресценции от pH различаются для флуоресцеина и его галоген – производных (эритрозина, эозина и бенгальского розового). У флуоресцеина зависимость степени поляризации флуоресценции от pH имеет нелинейный вид с максимумом при pH 6,0, а у эозина, эритрозина и бенгальского розового она практически от pH (в исследованном диапазоне pH) не зависит.

Также для флуоресцеина и его галоген – производных наблюдается различие в зависимостях коэффициента вращательной диффузии наномаркера от pH: коэффициент вращательной диффузии флуоресцеина нелинейно зависит от pH с минимумом при pH 6,0, а у эозина, эритрозина и бенгальского розового он не зависит от pH (при  $3,5 \leq \text{pH} \leq 8,0$ ).

Данный факт объясняется тем, что при наличии сильно электроотрицательных атомов в формулах наномаркеров (эозин, эритрозин и бенгальского розового) имеет место 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, и, следовательно, к независимости поляризации флуоресценции наномаркеров от pH.

А при наличии слабо электроотрицательных атомов в структурной формуле наномаркера (флуоресцеин) на вращательную диффузию наномаркера основное влияние оказывают процессы его молекулярной ассоциации и степень эффективности его связывания с белком, зависящие от pH, что приводит, в свою очередь, к зависимости поляризации флуоресценции наномаркера от pH.

При сравнении поляризованной флуоресценции четырех наномаркеров между собой обнаружено, что увеличение электроотрицательности радикалов боковых групп (в направлении «Н у флуоресцеина – I у эритрозина – Br у эозина – I и Cl у бенгальского розового») в структурных формулах наномаркеров приводит к увеличению поляризации их флуоресценции, к уменьшению коэффициента их вращательной диффузии, к увеличению времени их вращательной релаксации.

## Основные результаты и выводы работы

1. В растворах сывороточного альбумина человека обнаружено красное смещение максимума спектра флуоресценции и тушение флуоресценции бенгальского розового, представляющего собой 4-хлор-4-йод-производную флуоресцеина.
2. С помощью различных теоретических моделей определены константы тушения флуоресценции бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека, отражающие фактически связывание этого наномаркера с белком, при различных значениях рН. Показано, что эффективность связывания бенгальского розового с альбумином человека монотонно убывает с ростом рН.
3. Обнаружено, что в растворах сывороточного альбумина человека степень молекулярной ассоциации бенгальского розового уменьшается по сравнению с растворами без белка, что объясняется связыванием маркера с белком.
4. Обнаружено увеличение поляризации флуоресценции наномаркеров флуоресцеина, эритрозина, эозина и бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека по сравнению с растворами без белка, что объясняется их связыванием с альбумином человека.
5. В растворах сывороточного альбумина человека у наномаркеров семейства флуоресцеина установлено уменьшение коэффициента вращательной диффузии и увеличение времени вращательной релаксации наномаркеров по сравнению с растворами без белка.
6. Обнаружено, что увеличение электроотрицательности радикалов боковых групп в структурных формулах наномаркеров семейства флуоресцеина приводит к увеличению поляризации их флуоресценции, к уменьшению коэффициента их вращательной диффузии, к увеличению времени их вращательной релаксации.

## Список цитируемой литературы

1. Левшин Л.В., Салецкий А.М. Оптические методы исследования молекулярных систем. 1994, Издательство московского университета.
2. Левшин Л.В., Салецкий А.М. Люминесценция и её измерения. 1989, Издательство московского университета.
3. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии 1986, Москва, Мир.
4. Тиноко. Физическая химия Применение в биологических науках. 2002, Техносфера.
5. Шмидт В. Оптическая спектроскопия для химиков и биологов. 2007, Москва, Техносфера.
6. Левшин Л.В., Славнова Т.Д., Митцель Ю.А // Журн. прикл. спектр. 1967, Т. 7, вып. 6, С. 893.
7. Левшин Л.В., Славнова Т.Д., Митцель Ю.А // Журн. прикл. спектр. 1968Ю Т. 8, вып. 2, С. 283.
8. Практикум по спектроскопии (под ред. Л. В. Левшина). М., Изд-во МГУ, 1976.
9. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследованиях клеток, мембран и липопротеинов. 1989, Москва, Наука.
10. Vlasova I.M., Bukharova E.M., Kuleshova A.A., Saletsky A.M. Spectroscopic investigations of interaction of fluorescent nanomarkers of fluorescein family with human serum albumin at different values of pH. // Current Applied Physics, 2011; doi:10.1016/j.cap.2011.02.004.
11. Vlasova I.M., Saletsky A.M. Spectroscopic investigation of binding of three fluorescent nanomarkers to biomolecules of HAS. // Current Applied Physics, 2009; v. 9, p. 1027-1031.
12. Кулешова А.А., Бухарова Е.М., Власова И.М. Вращательная диффузия наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах альбумина человека. // В сборнике тезисов международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов – 2010», секция «Физика», том 1, физический факультет МГУ, 2010, стр. 224-225.
13. . Бухарова Е.М., Власова И.М., Кулешова А.А., Салецкий А.М. Определение параметров вращательной диффузии наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах сывороточного альбумина человека методом поляризованной флуоресценции. // В сборнике тезисов докладов и сообщений на XVII Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем-Яльчик-2010», Уфа-Казань-Москва-Йошкар-Ола, 2010, стр. 34.

14. Кулешова А.А., Власова И.М. Спектроскопические исследования взаимодействия флуоресцентного наномаркера бенгальского розового с сывороточным альбумином человека. // Материалы XVIII международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2011», секция «Физика», подсекция «Биофизика», стр. 3-4.
15. Власова И.М., Кулешова А.А., Полянский Д.В. Анализ взаимодействия бенгальского розового с сывороточным альбумином человека по спектрам флуоресценции и поглощения наномаркера. // В сборнике тезисов XVIII Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем-Яльчик-2011», Казань, Казанский федеральный университет, 2011, стр. 29.
16. Власова И.М., Кулешова А.А., Салецкий А.М. Флуоресцентные характеристики и молекулярная ассоциация наномаркера бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человека. // Вестник МГУ. Серия 3. Физика. Астрономия, 2011, № 5, стр. 44-48.
17. Shaikh S. M. T., Seetharamappa J., Kamdagal P.B., Manjunatha D.H., Ashoka S. Spectroscopic investigations on the mechanism of interaction of bioactive dye with bovine serum albumin.// *Dyes and Pigments*, 2006, p. 1-7.
18. Sunil Jain, C.Vijaya Kumar, Devendra S.Kalonia. Protein – peptide interaction as probed by Tryptophan Fluorescence: Serum Albumin and Enkephalin Metabolites. // *Pharmaceutical Research*, 1992, v. 9, №. 8, p. 36.
19. Charles E. Cobb, Eric J. Hustedt, Joseph M. Beechem, Albert H. Beth. Protein rotational dynamics investigated with a dual EPR/optical molecular probe. // *Bioophys. J*, 1993, v. 64, p. 605 – 613.
20. Beth A.H., Cobb C.E., Beechem J.M. Synthesis and characterization of a combined fluorescence, phosphorescence and electron paramagnetic resonance probe. // *Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Time-Resolved Laser Spectroscopy*, 1992, III. 504-512.
21. Vlasova I. M., Saletsky A. M. Investigation of different values of pH on mechanisms of binding of human serum albumin with markers of fluorescein family.// *Journal Molecular Structure*, 2009, v. 936, p. 220-227.
22. Бухарова Е.М., Власова И.М., Салецкий А.М. Структура молекулярных ассоциатов флуоресцентных зондов в растворах сывороточного альбумина человека. // *Журнал Прикладной спектроскопии*, 2008, стр.782-788.
23. Pauline Johnson, Peter B. Garland. Fluorescent triplet probes for measuring the rotational diffusion of membrane proteins. // *Biochem. J.*, 1982, v. 203, p. 313-321.



24. Pablo Argueso, Ann Tisdale, Sandra Spurr-Michaud, Mika Sumiyoshi, Ilene K. Gipson. Mucin Characteristics of Human Corneal – Linbal Epithelial Cells that exclude the rose Bengal anionic dye. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 2006, 47(1), p. 113-119.
25. Michael A.J. Rodgers. Picosecond fluorescence studies of rose Bengal in aqueous micellar dispersions. // *Chemical Physics Letters*, 1981, v. 78, Issue 3, p. 509-514.
26. Suresh I Prajapati, Carlo O Martinez, Ali N Bahadur, Isabel Q Wu, Wei Zheng, James D Lechleiter, Linda M McManus, Gary B Chosholm, Joel E Michalek, Paula K Shireman, Charles Keller. Near-Infrared Imaging of Injured Tissue in Living Subjects using IR-820. // *Mol Imaging*, 2009, 8(1), p. 45-54.
27. Sang Hak Lee, Jung Kee Suh, Ming Li. Determination of bovine serum albumin by its enhancement effects of Nile Blue fluorescence. // *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2003, v. 24, № 1, p. 45-48.
28. Greenspan P., Fowler S.D. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. // *Journal of Lipid Research*, 1985, v. 26, p. 781-789.
29. Goswami N., Makhal A., Pal SK. Toward an alternative intrinsic probe for spectroscopic characterization of a protein. // *J. Phys. Chem. B.*, 2010, v. 114, p. 46.
30. Bose D., Sarkar D., Chattopadhyay N. Probing the binding interaction of a phenazinium dye with serum transport proteins: a combined fluorometric and circular dichroism study. // *Photochem. Photobiol.*, 2010, v. 86(3), p. 538 – 44.
31. Gluo Y., Yang J., Wu X., Mao H. Sensitive determination of protein based on the fluorescence enhancement effect of terbium (III) – epinephrine – protein – sodium dodecylsulfate system. // *Luminescence*, 2009, v. 24(6), p. 372-378.
32. Sen P., Fatima S., Ahmand B., Khan RH. Interactions of thioflavin T with serum albumins: spectroscopic analysis. // *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.*, 2009, v. 74(1), p. 94-99.
33. Zhu X., Sun J., Hu Y. Determination by hydroxypropyl – beta – cyclodextrin sensitized fluorescence quenching method with erythrosine sodium as a fluorescence probe. // *Anal Chim Acta*, 2007, v. 596(2), p. 298 – 302.
34. Ercelen S., Klymchenko AS, Mely Y, Demchenko AP. The binding of a novel two – color fluorescence probe FA to serum albumins of different species. // *Int J Biol Macromol.*, 2005, v. 35(5), p. 231 – 242.
35. Nagataki S., Matsunaga I. Binding of fluorescein monoglucuronide to human serum albumin. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1985, v. 26(8) p. 1175 – 1178.
36. Egbaria K., Friedmen M. Absorption of fluorescein dyes on albumin microspheres. // *Pharmaceutical Research.*, 1992, v. 9(5), p. 629 – 635.

37. Schiller A., Schayer R., Less E. Fluorescein-conjugated bovine albumin. // *JGP*, 1953, v. 36(4), p. 489 – 506.
38. Yue Y., Chen X., Qin J., Yao X. A study of the biniding of C.I. Direct Yellow 9 to human serum albumin using optical spectroscopy and molecular modeling. // *Dye and Pigments*, 2008, v. 79, p. 176 – 182.
39. Penniston J. Fluorescence polarization measurement of binding of fluorescein to albumin. // *Exp Eye Res.*, 1982, v. 34, p. 435 – 443.
40. Kremer P., Wunder A., Sinn H., Haase T., Rheinwald M., Zilmann U., Albert FK, Kunze S. Laser-induced fluorescence detection of malignant gliomas using fluorescein-labeled serum albumin: experimental and preliminary clinical results.// *Neurol Res.*, 2000, v. 22(5), p. 481 – 489.