

ВЛИЯНИЕ ПРОЦЕССОВ АССОЦИИИ МОЛЕКУЛ ЭОЗИНА НА ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С БЫЧЬИМ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ pH

Е. С. Городничев, А. А. Кулешова, А. В. Быков, А. М. Салецкий*

УДК 535.343;535.372:547.633.6

МГУ имени М. В. Ломоносова,

119991, Москва, ГСП, Ленинские горы, 1, стр. 2, Россия; e-mail: sam@physics.msu.ru

(Поступила 15 марта 2019)

Исследованы флуоресцентные характеристики молекул эозина в растворах бычьего сывороточного альбумина (БСА) при различных pH. Установлено, что тушение флуоресценции эозина с ростом его концентрации обусловлено двумя конкурирующими процессами: связыванием молекул БСА с молекулами эозина и образованием ассоциатов молекул красителя. Определены степень ассоциации, структура и термодинамические параметры димеров в буферных растворах и растворах БСА при различных pH. Вариация pH буферных растворов эозина вызывает изменение данных характеристик. Проведен учет влияния формирования ассоциатов эозина в растворах БСА на константы динамического тушения флуоресценции эозина. Показано, что учет формирования ассоциатов эозина в растворах БСА приводит к уменьшению константы динамического тушения флуоресценции эозина, которое пропорционально pH раствора.

Ключевые слова: эозин, бычий сывороточный альбумин, димер, степень ассоциации, структура димеров, энтальпия диссоциации, тушение флуоресценции, константа динамического тушения флуоресценции.

We study the fluorescent characteristics of eosin molecules in solutions of bovine serum albumin at various pHs. It is established that the quenching of eosin fluorescence with an increase in its concentration is due to two competing processes: the binding of BSA molecules to eosin molecules and the formation of associates of dye molecules. The degree of association, the structure and thermodynamic parameters of dimers in buffer and BSA solutions at different pH values are determined. Variations in the pH of eosin buffer solutions lead to the change of all these characteristics. It is shown that the formation of eosin associates in BSA solutions leads to a decrease in the dynamic quenching constant of eosin fluorescence, which is proportional to the pH of the solution.

Keywords: eosin, bovine serum albumin, dimer, degree of association, structure of dimers, enthalpy of dissociation, fluorescence quenching, dynamic fluorescence quenching constant.

Введение. Растущий интерес к исследованию взаимодействий флуорофор—сывороточный альбумин (СА) (человеческий и бычий) обусловлен тем, что СА являются основными транспортными белками системы кровообращения, связывающими небольшие молекулы (лиганды) [1—3]. С фармацевтической и биохимической точки зрения понимание структуры, функций, динамики и особенностей комплекса белок—лиганд имеет большое значение, например, для создания новых лекарств. Поэтому комплексы СА+молекулы красителя перспективны как модельные системы для изучения взаимодействий лиганд—белок. Особый интерес вызывает влияние взаимодействия с белками на спектральные и флуоресцентные свойства молекул красителей для дальнейшего установления механизмов связывания молекул белка и красителя [4, 5], причем эти характеристики могут значительно варьироваться при комплексообразовании с биополимерами. В частности, для такой цели используют

INFLUENCE OF EOSIN MOLECULE ASSOCIATION ON THE INTERACTION WITH BOVINE SERUM ALBUMIN AT VARIOUS pH VALUES

E. S. Gorodnichev, A. A. Kuleshova, A. V. Bykov, A. M. Saletsky* (M. V. Lomonosov Moscow State University, 1 bldg 2 Leniskie Gori, Moscow, 119991, GSP, Russia; e-mail: sam@physics.msu.ru)

молекулярные флуоресцентные зонды гомологичной серии производных флуоресцеина (эозин, эритрозин, бенгальский розовый), которые являются анионными при физиологических значениях pH 7.4. Эти красители применяются как для исследования белков крови человека [6, 7], так и в медицине для диагностики заболеваний [8]. Для установления характеристик связывания белок—зонд исследуется тушение флуоресценции молекул зонда, обусловленное ростом концентрации белков. Однако при изменении структуры белков возникают локальные области с повышенной концентрацией молекул зонда, что вызывает образование ассоциатов молекул. В [6, 9] установлен факт образования ассоциатов молекул зонда в растворах СА, однако влияние таких процессов на эффективность связывания в комплексах белок—красителей не изучено.

В настоящей работе представлены результаты исследования такого влияния для модельной системы бычий сывороточный альбумин (БСА)+анионный краситель эозин. Выбор БСА обусловлен важной ролью этого белка в плазме крови: именно БСА вносит основной вклад во внутрисосудистое коллоидно-осмотическое давление, регулирует вместе с другими белками плазмы pH крови, а также является молекулой-переносчиком биологически важных веществ. При этом БСА имеет разные конфигурационные изомеры при различных pH [10]. Эозин при различных pH существует в разных формах: дианионной в основном растворителе, при уменьшении pH — в анионной, нейтральной в виде трех таутомеров [11].

В [12] методом спектроскопии КР установлено, что при вариациях pH раствора различные аминокислотные остатки молекулы белка участвуют в связывании молекул красителей. Поэтому представляет интерес изучение в широком диапазоне pH как константы связывания БСА и молекул зонда, так и процессов ассоциации эозина в системе БСА+эозин.

Эксперимент. Использованы эозин (Aldrich Sigma, Германия), БСА (Sigma) без дополнительной очистки. Для приготовления растворов молекул эозина и БСА с различными pH взяты следующие буферные растворы: 0.1 М $\text{CH}_3\text{COOH-KOH}$ (pH 3.5—5.0); 0.1 М KH_2PO_4 –0.1 М NaOH (pH 6.0—8.0). Приготовлены растворы с разной концентрацией эозина и растворы с добавлением БСА разной концентрации. Исследованы спектрально-люминесцентные характеристики растворов эозина и растворов эозин+БСА с различными pH.

Спектры поглощения зарегистрированы на спектрофотометре Perkin Elmer Lambda 35 при различных температурах с помощью специальной приставки (точность поддержания температуры 5 %). Флуоресцентные характеристики растворов изучены с помощью спектрофлуориметра Perkin Elmer LS 55 при комнатной температуре. Флуоресценция эозина возбуждалась при $\lambda = 520$ нм.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 представлены спектры поглощения водных растворов эозина для трех его концентраций. С ростом концентрации красителя в спектрах поглощения появляется коротковолновая полоса с максимумом при $\lambda \sim 490$ нм, интенсивность которой увеличивается с ростом концентрации эозина, при этом уменьшается интенсивность длинноволновой полосы. Такое поведение спектров указывает на образование комплексов эозина в основном состоянии (ассоциатов), а наличие изобестической точки при $\lambda = 505$ нм подтверждает, что эти комплексы — димеры.

Молекулярные спектры в видимой области являются результатом вибронных переходов, соответственно, экситонные взаимодействия в молекулах приводят к расщеплению мономерных полос на две серии полос вибронных экситонов. Таким образом, мономерный спектр эозина имеет как минимум две вибронные полосы, тогда спектры димера можно интерпретировать в терминах расщепления каждой вибронной полосы на две экситонные полосы [13]. Поэтому разделение спектров поглощения эозина на спектры мономеров и димеров осуществлено с учетом вибронной структуры молекулярных спектров [14]. На рис. 1 представлен спектр димера эозина. Он состоит из двух полос — коротковолновой $\lambda_k = 495$ нм и длинноволновой $\lambda_d = 530$ нм. Степень ассоциации $(1-X)$ определяется как отношение интегральной интенсивности спектров поглощения ассоциатов к интегральной интенсивности спектров растворов [14]. На рис. 1 также представлены зависимости степени ассоциации $(1-X)$ эозина от концентрации красителя и pH раствора. Для эозина наблюдается рост степени ассоциации при увеличении концентрации красителя и уменьшение $(1-X)$ при увеличении pH растворов.

При добавлении в буферные растворы молекул БСА изменяется степень ассоциации. На рис. 2 представлены зависимости $(1-X)$ от pH для эозина в растворах БСА при двух концентрациях красителя. С ростом pH растворов БСА+эозин степень ассоциации $(1-X)$ красителя уменьшается. Отметим, что для буферных растворов эозина, не содержащих БСА, ход зависимости $(1-X)$ от pH такой же. Это связано с тем, что при pH в диапазоне 3.0—5.0 молекулы эозина имеют слабо отрицательно заряженную форму моноаниона и процесс их ассоциации облегчен по сравнению с процессом образования

ассоциатов при $\text{pH} > 5.0$ (молекулы эозина находятся в дианионной форме, и процессу образования димеров мешает их взаимное отталкивание). В растворах БСА значения $(1-X)$ для эозина меньше, чем в растворах без белков, так как часть молекул красителя, образующая ассоциаты эозина, при добавлении БСА в раствор взаимодействует с ним, образуя не только комплекс эозин+эозин, но и эозин+БСА.

На рис. 2 показана зависимость $\Delta A_{\text{БСА}}$ эозина от pH ($\Delta A_{\text{БСА}} = (1-X)_{\text{Э}} - (1-X)_{\text{БСА}}$, где $(1-X)_{\text{Э}}$ и $(1-X)_{\text{БСА}}$ — степени ассоциации эозина в буферном и БСА растворах). Степень ассоциации молекул эозина монотонно убывает с ростом pH в растворах БСА. При этом в растворах БСА степень ассоциации $(1-X)$ эозина для всех pH меньше, чем в буферных растворах красителя. В растворах белка $\Delta A_{\text{БСА}}$ уменьшается с ростом pH (рис. 3, кривая 3). Как видно, $\Delta A_{\text{БСА}}$ увеличивается при росте концентрации эозина для всех pH .

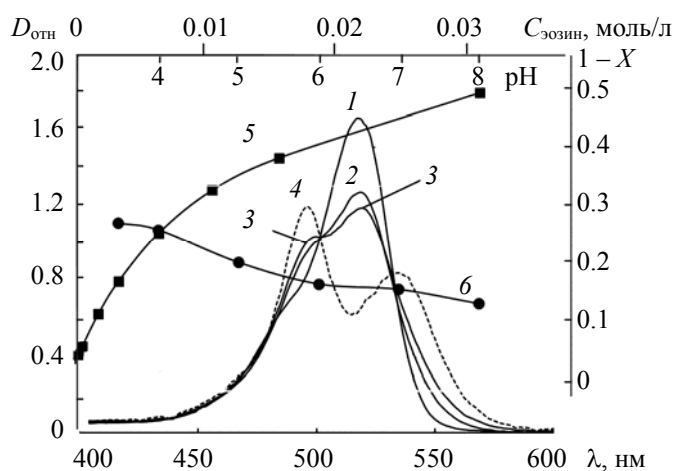


Рис. 1. Спектры поглощения водных растворов эозина (1—3) и его димеров (4) при концентрациях $1 \cdot 10^{-4}$ (1), $1.5 \cdot 10^{-4}$ (2) и $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л (3); зависимости степени ассоциации $(1-X)$ эозина от его концентрации (5) и pH среды ($C_{\text{эозин}} = 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) (6)

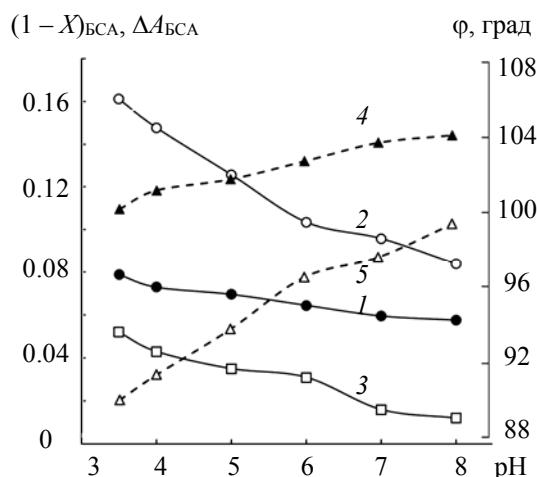


Рис. 2. Зависимости степени ассоциации эозина (1, 2), угла ϕ между его молекулами в димере (4, 5) в растворах БСА, разности $\Delta A_{\text{БСА}}$ (3) от pH для концентраций 10^{-5} (1, 4), $3 \cdot 10^{-6}$ (3) и $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л (2, 5)

В растворах эозина и БСА изменяется не только эффективность ассоциации, но и структура ассоциатов. Для характеристики структуры ассоциатов (димеров) определим угол φ между мономерными молекулами в димере в рамках экситонной модели, согласно которой возбужденные состояния молекул димера расщепляются на два уровня с энергией ниже и выше энергии возбужденного состояния индивидуальных молекул. С использованием экспериментальных коэффициентов экстинкции $\epsilon_i(\nu)$, частот максимумов коротковолновой и длинноволновой полос димера эозина ν_k, ν_d определены силы осцилляторов $f_{k,d} = 4.32 \cdot 10^{-9} \int \epsilon_{k,d}(\nu) d\nu$, а затем в рамках этой модели — и угол φ между молекулами в димере по формуле [14]:

$$\varphi = 2 \arctan \sqrt{\nu_k f_d / \nu_d f_k}, \quad (1)$$

где ν_k, ν_d и f_k, f_d — частоты и силы осцилляторов соответствующих переходов.

На рис. 2 (кривые 4 и 5) представлены зависимости $\varphi(\text{pH})$ для димеров эозина в растворах БСА. С ростом pH увеличивается угол φ между мономерными молекулами эозина в димере, и чем больше концентрация молекул красителя, тем это увеличение значительней.

Энергия связи в димерах эозина может быть определена из термодинамических параметров системы. Изменение энергии Гиббса для ассоциатов эозина:

$$\Delta G = -TR \ln K, \quad (2)$$

где R — универсальная газовая постоянная; K — константа равновесия

$$K = (1 - X) / 2X^2 C, \quad (3)$$

X — доля мономеров в растворе; C — концентрация красителя.

Из (2) следует

$$\ln K = -\Delta G / TR. \quad (4)$$

Потенциал Гиббса

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S. \quad (5)$$

Подставляя (5) в (4), получаем так называемое уравнение Вант-Гоффа:

$$\ln K = -\Delta H / RT + \Delta S / R. \quad (6)$$

Здесь ΔH — энтальпия диссоциации, характеризующая энергию связи ассоциированных молекул красителя; ΔS — энтропия.

Энергия связи $U = \Delta H$ может быть определена из линейного уравнения (6). Для этого измерены спектры поглощения эозина в буферных БСА растворах при различных температурах. Из этих спектров определены доли мономеров X и степени ассоциации $(1-X)$ для каждой температуры T . По формуле (4) для каждой температуры найдены константы равновесия K . Энергия связи $U = \Delta H$ определена методом наименьших квадратов из уравнения (6).

На рис. 3 представлены зависимости $U(\text{pH})$ для димеров эозина в буферном растворе и растворе БСА. С ростом pH энергия связи U между молекулами эозина увеличивается как для буферных растворов, так и для растворов БСА, причем для БСА эта зависимость линейная, в то время как для буферного раствора она S-образная. Изменения U характеризует кривая 3, которая представляет собой разность энергий связи молекул в димере эозина в растворах БСА и буферных растворах: $\Delta U = U_{\text{БСА}} - U_{\text{БР}}$. Видно также, что при $\text{pH} < 5$ увеличивается U в димере эозина при добавлении БСА. Резкое уменьшение U в растворах БСА наблюдается в области $5 < \text{pH} < 7$ (при этом U в БСА меньше, чем в буферных растворах).

Как показано в [15], альбумины являются тушителями флуоресценции молекул красителей семейства флуоресцеина. Нами исследованы спектры флуоресценции эозина для различных концентраций БСА. Для установления эффективности тушения флуоресценции эозина вычислены значения $B = I_0/I - 1$ для различных концентраций БСА $[Q]$, где I_0, I — интенсивности флуоресценции наномаркера в буферных растворах и растворах БСА. Построены зависимости Штерна—Фолмера $B = (I_0/I - 1)$ от $[Q]$ для исследуемых систем. На рис. 4 (кривая 1) представлена такая зависимость для растворов БСА при pH 4 и концентрации эозина 10^{-5} моль/л.

Процесс тушения флуоресценции эозина при различных концентрациях белка может быть описан как

$$I_0/I = 1 + K[Q], \quad (7)$$

где K — константа динамического тушения флуоресценции.

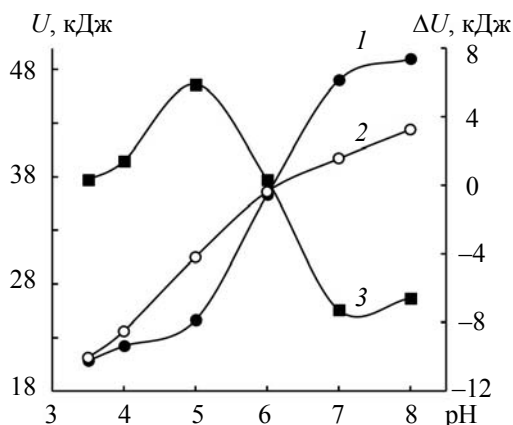


Рис. 3. Зависимости энергии связи молекул эозина в димере U в буферном растворе (1), в растворе БСА (2) и ΔU от pH среды (3)

В связи с тем что зависимости $B([Q])$ для красителей семейства флуоресцеина нелинейные (см. [15] и рис. 4, кривая 1) и состоят из двух линейных компонент: при $C_{\text{БСА}} < 2 \cdot 10^{-4}$ и при $C_{\text{БСА}} > 2 \cdot 10^{-4}$ моль/л, мы определили K в первой области концентраций белка. На рис. 4 (кривая 4) представлена зависимость K от pH для системы эозин+БСА ($C_{\text{эозин}} = 10^{-5}$ моль/л). Для исследуемых красителей наблюдается монотонное уменьшение K с ростом pH. Зависимость $K(\text{pH})$ получена в предположении, что тушение флуоресценции эозина происходит только за счет взаимодействия с молекулами БСА. Однако, как показано выше, в растворах БСА+эозин образуются ассоциаты эозина. В результате в таких растворах тушение флуоресценции эозина происходит за счет двух механизмов: взаимодействия молекул красителя и белка и уменьшения числа мономерных молекул эозина за счет процессов ассоциации. Учитывая это, воспользуемся стандартной процедурой [16] и определим ход уменьшения интенсивности флуоресценции I_X молекул эозина в зависимости от концентрации красителя C , обусловленного только взаимодействием между молекулами белка и красителя:

$$I_X(C) = I_{\Sigma}(C)/X(C), \quad (8)$$

где $I_{\Sigma}(C)$ — суммарная интенсивность флуоресценции эозина для его концентрации C в растворе БСА; $X(C)$ — доля мономеров красителя в растворе.

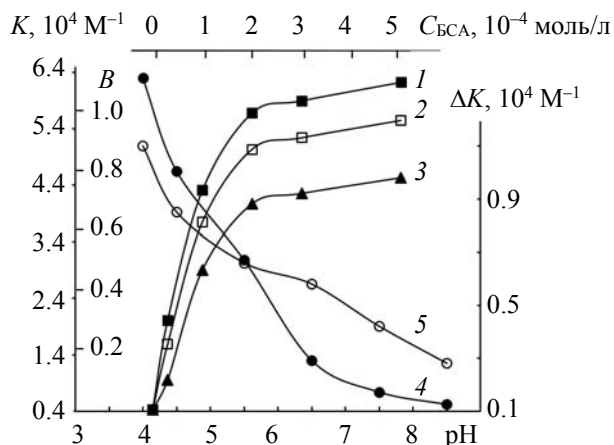


Рис. 4. Зависимости B (1) и B_X (2, 3) для эозина от концентрации БСА при pH 4 и зависимости K (4) и ΔK (5) от pH для концентрации красителя 10^{-5} (1, 2), $2 \cdot 10^{-5}$ (4, 5) и $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л (3)

С использованием экспериментальных значений X и I_{Σ} вычислены I_X и $B_X = (I_0/I_X - 1)$ для различных концентраций эозина и БСА. На рис. 4 представлены зависимости B_X от $C_{\text{БСА}}$ для концентраций эозина 10^{-5} и $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л при pH 4. Видно, что для всех концентраций $C_{\text{БСА}}$ значения B_X меньше, чем B , и это различие увеличивается с ростом концентрации эозина. Таким образом, учет процессов ассоциации молекул зондов изменяет ход зависимости Штерна—Фолмера, что приводит к другому значению константы динамического тушения флуоресценции K_X , определенному по (7). На рис. 4 также представлена зависимость от pH разности $\Delta K = K - K_X$, где K определена без учета, а K_X с учетом процессов ассоциации. Константа K_X при учете процессов ассоциации сильно отличается от K для всех pH — с ростом pH ΔK уменьшается.

Заключение. В растворах бычьего сывороточного альбумина с молекулярным зондом эозином происходит тушение флуоресценции эозина, обусловленное двумя конкурирующими процессами — связыванием молекул бычьего сывороточного альбумина с молекулами эозина и образованием ассоциатов эозина. Вариация pH буферных растворов эозина приводит к изменению степени ассоциации, структуры и термодинамических параметров молекул эозина. Добавление бычьего сывороточного альбумина в буферные растворы изменяет эти характеристики. В результате имеет место влияние процессов ассоциации молекул зонда эозина на концентрационное тушение его флуоресценции молекулами бычьего сывороточного альбумина. Учет формирования ассоциатов эозина в растворах бычьего сывороточного альбумина приводит к уменьшению константы динамического тушения флуоресценции эозина, пропорциональному pH раствора.

- [1] M. H. Baig, S. Rahman, G. Rabbani, M. Imran, K. Ahmad, I. Choi. *Int. J. Mol. Sci.*, **20** (2019) 662—679
- [2] A. A. Ksenofontova, P. S. Bocharova, E. V. Antina. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **368** (2019) 254—257
- [3] H. J. Gaus, R. Gupta, A. E. Chappell, M. E. Østergaard, E. E. Swayze, P. P. Seth. *Nucl. Acid. Res.*, **47**, N 3 (2019) 1110—1122
- [4] I. M. Vlasova, E. M. Bukharova, A. A. Kuleshova, A. M. Saletsky. *Current Appl. Phys.*, **11**, N 5 (2011) 1126—1132
- [5] П. Г. Пронкин, А. С. Татиколов. *Журн. прикл. спектр.*, **83**, N 6 (2016) 884—890 [P. G. Pronkin, A. S. Tatikolov. *J. Appl. Spectr.*, **83** (2016) 938—944]
- [6] I. M. Vlasova, A. M. Saletsky. *Current Appl. Phys.*, **9**, N 5 (2009) 1027—1031
- [7] I. V. Vlasova, A. M. Saletsky. *Laser Phys.*, **20**, N 9 (2010) 1844—1848
- [8] H. Ali, S. Ali, M. Mazhar, A. Ali, A. Jahan, Abid Ali. *Photodiagnos. Photodynam. Therap.*, **19** (2017) 37—44
- [9] Е. М. Бухарова, И. М. Власова, А. М. Салецкий. *Журн. прикл. спектр.*, **75**, № 6 (2008) 782—787 [E. M. Buharova, I. M. Vlasova, A. M. Saletsky. *J. Appl. Spectr.*, **75** (2008) 785—790]
- [10] D. Gao, Y. Tian, F. Liang, D. Jin, Y. Chen, H. Zhayg, A. Yu. *J. Lumin.*, **127** (2007) 515—522
- [11] A. Waheed, K. S. Rao, P. Gupta. *Analyt. Biochem.*, **287** (2000) 73—79
- [12] I. V. Vlasova, A. M. Saletsky. *Laser Phys. Lett.*, **4**, N 5 (2007) 390—394
- [13] D. Fornasiero, T. Kurucsev. *J. Chem. Soc, Faraday Trans.*, **2**, **82** (1986) 15—19
- [14] О. И. Волкова, А. Н. Баранов, А. М. Салецкий. *Журн. прикл. спектр.*, **85**, № 3 (2018) 372—375 [O. I. Volkova, A. N. Baranov, A. M. Saletsky. *J. Appl. Spectr.*, **85** (2018) 381—384]
- [15] I. M. Vlasova, A. M. Saletsky. *J. Mol. Struct.*, **936** (2009) 220—227
- [16] Л. В. Левшин, А. М. Салецкий. *Люминесценция и ее измерение*, Москва, МГУ (1989) 166—167