

На правах рукописи

Тихонова Татьяна Николаевна

Проявление межмолекулярных взаимодействий альбумина и европия(III) в их оптических и структурных характеристиках

01.04.05 – Оптика

Автореферат

диссертация на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Москва – 2013

Работа выполнена на кафедре молекулярной физики физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: д.ф.-м.н., профессор Петрова Галина Петровна
Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Москва

Официальные оппоненты: д.ф.-м.н., доцент Одинцов Анатолий Иванович
Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Москва

д.ф.-м.н., в.н.с. Иванов Андрей Валентинович
ФГБУ Российский онкологический научный центр
имени Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Ведущая организация: Институт радиотехники и электроники
имени В.А. Котельникова РАН, Москва

Защита состоится «18» декабря 2013 года в 15:00 часов на заседании совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 501.001.45 на базе Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, по адресу: Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 5 (19-й корпус НИИ ядерной физики имени Д.В. Скобельцына МГУ имени М.В. Ломоносова), в аудитории 2-15.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке НИИ ядерной физики имени Д.В. Скобельцына МГУ имени М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан 12 ноября 2013 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
Д 501.001.45 на базе МГУ имени М.В. Ломоносова
кандидат физико-математических наук

Вохник О.М

Общая характеристика работы

Актуальность работы

Проявление межмолекулярных взаимодействий белков в их оптических и структурных характеристиках в настоящее время широко исследуется методами спектроскопии. Актуальность темы исследования обусловлена тем, что межмолекулярные взаимодействия белков играют очень важную роль в функционировании разных биологических систем. Изучение влияния на эти системы различных внешних факторов, среди которых отдельное внимание уделяется воздействию тяжелых металлов (ТМ), представляет собой особый интерес. Оптические методы являются одними из наиболее перспективных инструментов для экспериментальных исследований в биологии. В работе методами оптической спектроскопии исследуется взаимодействие белка сывороточного альбумина с ионами европия(III), который относится к типичным представителям тяжелых металлов. Данный белок составляет около 55% от всех белков, которые содержатся в плазме крови, и выполняет ряд необходимых функций в организме, например, является регулятором коллоидно-осмотического давления плазмы крови, поддерживает оптимальный уровень рН крови. Основной функцией альбумина является транспортная. Альбумин переносит гормоны, жирные кислоты, лекарства, а также различные ионы металлов. Изучение взаимодействия ионов металлов с белками ведется уже на протяжении многих десятилетий. Важность этих исследований связана с тем, что ионы тяжелых металлов играют двоякую роль в живых организмах: с одной стороны, они участвуют в метаболизме, т.е. вносят значительный вклад в обмен веществ, с другой стороны, повышенные концентрации тяжелых металлов могут приводить к конформационным изменениям, агрегации и денатурации белковых макромолекул.

В течение последних лет процессы связывания белков с различными химическими веществами широко обсуждались из-за их значимости во многих областях биотехнологических, фармацевтических и медицинских исследований. Очень важно уметь правильно оценить основные параметры связывания белков с металлами, лекарствами и другими веществами, чтобы понимать действие этих веществ на организм. В настоящее время существует большое число оптических методов, которые используются для определения данных параметров. Одним из наиболее часто употребляемых методов в данной области является метод тушения флуоресценции белков с использованием модифицированного уравнения Штерна-Фольмера. Однако анализ литературы показал, что основные характеристики процесса связывания для системы белок-ТМ, полученные из

данной методики не совпадают с параметрами, полученными с помощью других оптических методов. Поэтому одна из глав диссертации была посвящена экспериментальному исследованию процесса связывания для системы альбумин-европий(III) методом тушения флуоресценции белка, сравнению полученных результатов с данными других оптических методов, а также всестороннему анализу модифицированного уравнения Штерна-Фольмера.

Механизм связывания белковых молекул с ТМ может непосредственно влиять на агрегацию белков. Образование устойчивых комплексов белковых молекул приводит к потере их функциональности и является причиной некоторых серьезных заболеваний. Однако глобальное понимание данного явления и его основных механизмов все еще далеко до завершения. Агрегация белка характеризуется множественными взаимодействиями, в особенности конформационными изменениями и межмолекулярными взаимодействиями, которые сильно влияют друг на друга. Иерархия всех этих механизмов зависит от свойств среды и от некоторых физических и химических параметров, таких как: температура, рН, ионная сила и др. В связи с этим вторая экспериментальная глава данной диссертационной работы была посвящена исследованию процесса агрегации белковых макромолекул под действием различных внешних факторов двумя оптическими методами – методом абсорбционной спектроскопии и динамического светорассеяния.

Цель диссертационной работы состояла в исследовании молекулярно-динамических процессов, происходящих в растворах молекул альбумина при взаимодействии с ионами европия(III) оптическими методами.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Определение ключевых характеристик процесса связывания (числа сайтов (центров) связывания n и константы комплексообразования K_a) белка альбумина с солью ТМ европия(III) методом флуоресцентной спектроскопии с использованием как собственной (триптофановой) флуоресценции альбумина, так и флуоресценции европия(III).
2. Сравнение и анализ различных оптических методов и подходов в определении данных параметров.
3. Численный расчет распределений концентраций комплексов белок-ТМ с использованием модели ступенчатого комплексообразования и модели независимых сайтов; построение кривых тушения флуоресценции с

использованием полученных распределений и заданных наборов квантовых выходов комплексов. Аналитическое исследование модифицированных кривых тушения флуоресценции и анализ возможности их использования для определения параметров процесса связывания.

4. С использованием тушения собственной флуоресценции альбумина исследовать распределения ионов европия(III) по сайтам связывания альбумина.
5. С использованием двух оптических методов – метода абсорбционной спектроскопии и динамического светорассеяния – исследование молекулярно-динамического процесса агрегации, происходящего в растворах макромолекул альбумина при воздействии различных параметров среды (концентрации белка, ионной силы, pH), в том числе воздействия ионов металла европия(III).

Научная новизна работы

В данной работе впервые:

1. Исследовано тушение собственной флуоресценции бычьего сывороточного альбумина (БСА) и флуоресценции европия(III) в комплексах БСА-европей(III). Обнаружено, что число сайтов связывания БСА n и значение константы комплексообразования K_a , полученные из обоих методов, дают качественно разные результаты: например, методом тушения флуоресценции БСА было получено, что $n=1$ для pH=6 и pH=4,5, в то время как метод флуоресценции европия(III) показал наличие двух типов сайтов связывания с $n_1=2$, $n_2=4$ при pH=6 и $n_1=1$, $n_2=2$ при pH=4,5.
2. Показано, что использование европия(III) в качестве флуоресцентного зонда позволяет корректно определить основные параметры процесса связывания n и K_a , что закладывает основы нового оптического метода диагностики комплексообразования белков с тяжелыми металлами.
3. Разработан подход к расчету кривых тушения флуоресценции с использованием двух моделей комплексообразования (модели ступенчатого комплексообразования и модели независимых сайтов) и набора квантовых выходов комплексов. Проведен численный расчет с использованием модели ступенчатого связывания белка с лигандом, на основе которого было объяснено различие между числом сайтов связывания, полученное с применением двух вышеуказанных флуоресцентных подходов.

4. Показано, что численный расчет позволяет продемонстрировать неприменимость одного из основных методов – модифицированного уравнения Штерна-Фольмера – для описания процесса связывания белка с тяжелыми металлами.
5. С использованием тушения собственной флуоресценции альбумина продемонстрирован процесс неоднородного распределения ионов ТМ по сайтам связывания белка при действии одинакового количества соли металла на белковый раствор.
6. Методами абсорбционной спектроскопии и динамического светорассеяния показано, что при воздействии ионов ТМ на белковый раствор при определенных условиях: $\text{pH}=6\div 8$, концентрация белка $[\text{BCA}]=4,3\text{e-}5\text{M}$ и европия(III) $[\text{Eu}^{3+}]=5,1\text{e-}4\text{M}$ – начинается процесс агрегации белка, т.е. формирование устойчивого белкового комплекса.
7. С использованием динамического светорассеяния показано, что процесс агрегации белковых молекул может быть объяснен адсорбцией белка на коллоидных частицах европия(III) с размерами порядка 1 мкм.

Практическая ценность

В диссертационной работе с использованием оптических методов получен ряд результатов, которые способствуют развитию понимания молекулярных процессов, происходящих при связывании белковых макромолекул с ионами тяжелых металлов.

Установленные в работе закономерности проявления процесса связывания белков с ионами ТМ в их оптических характеристиках дают возможность оценить корректность различных оптических методов, используемых для определения параметров связывания белков с ионами металлов.

Установленный с использованием флуоресцентной спектроскопии факт неодинакового распределения ионов тяжелого металла европия(III) по сайтам связывания альбумина при действии одинакового количества соли металла на белковый раствор может найти свое применение в фармакологии.

Изученное в работе с помощью двух оптических методов – метода абсорбционной спектроскопии и метода динамического светорассеяния – явление агрегации, происходящее при определенных внешних условиях среды при взаимодействии белка с солью ТМ, позволяет установить молекулярный механизм изменений в биологических объектах, связанный с токсическим действием тяжелых металлов на живые объекты.

Известно, что накопление ТМ в организме человека может быть причиной различных болезней. Можно предполагать, что образование белковых агрегатов в организме человека под действием ионов тяжелых металлов приводит к нарушениям целого ряда ферментативных реакций, транспортной и иммунной функций крови и лимфы, а также к структурным изменениям ряда тканей. Полученные результаты могут быть использованы в экологии и медицине при разработке методов и аппаратуры для диагностики различных заболеваний.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Модифицированное уравнение Штерна-Фольмера неприменимо для определения основных параметров связывания – числа сайтов связывания n и константы комплексообразования K_a – для системы белок–тяжелый металл.
2. Использование европия(III) в качестве флуоресцентного зонда позволяет определить число связанных и свободных ионов европия(III). Использование этих данных позволяет с помощью модели Скетчарда корректно определить число, тип и константу комплексообразования для системы БСА-Eu³⁺: $n_1=2$, $n_2=4$ при рН=6 и $n_1=1$, $n_2=2$ при рН=4,5.
3. Эффективность тушения альбумина катионами европия(III) зависит от количества добавляемого тушителя, что можно интерпретировать с помощью неравномерного распределения ионов европия(III) в растворе по сайтам связывания белка.
4. Агрегация альбумина при взаимодействии с европием(III) объясняется сорбцией белка на коллоидных частицах европия(III) (Eu(OH)₃)_c с размерами порядка 1 мкм при [Eu³⁺]=8e-4M, [БСА]=4e-5M.

Апробация работы и публикации

Основные результаты исследований, представленные в диссертационной работе, докладывались автором на следующих научных конференциях: III Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика 2010» (Москва, Россия, 2010), 9-я международная научно-практическая конференция «Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности» (Санкт-Петербург, Россия, 2010), международная конференция «The 8th Pacific Symposium on Flow Visualization and Image Processing» (Москва, Россия, 2011), международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013» (Москва, Россия, 2013), международная конференция «Ломоносовские чтения 2013» (Москва, Россия, 2013), международная

конференция по когерентной и нелинейной оптике, лазерам, их применениям и технологиям ICONO/LAT-2013 (Москва, Россия, 2013).

По материалам диссертационной работы опубликовано 14 научных работ, из них 3 статьи в рецензируемых научных журналах из перечня ВАК России, 11 статей и тезисов в сборниках трудов конференций.

Личный вклад автора

Все представленные в диссертационной работе оригинальные результаты получены лично автором, либо при его непосредственном участии. Автором осуществлялись проведение эксперимента, обработка, анализ экспериментальных данных, разработка методики обработки полученных данных. При участии автора проводилась интерпретация результатов численного моделирования эксперимента.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертация состоит из введения, четырех глав и заключения. Работа изложена на 126 страницах, включает в себя 48 рисунков, 52 формулы, 1 таблицу и список литературы (общее число ссылок равно 149).

Содержание работы

Во введении обоснована актуальность диссертационной работы, сформулирована цель и аргументирована научная новизна, изложена практическая ценность полученных результатов, представлены выносимые на защиту научные положения.

Первая глава посвящена обзору литературы в рамках поставленной задачи. В данной главе рассмотрены строение белковых макромолекул, в частности альбумина, их основные свойства и функции, а также поведение в водных растворах. Описан процесс попадания тяжелых металлов в организм человека, их функционирование и взаимодействие с белками и ферментами. Приведены основные фотофизические свойства европия(III), который относится к группе лантанидов, рассмотрены химические и физические свойства данного тяжелого металла. В первой части приводится описание механизма связывания альбумина с ионами ТМ, представлены экспериментальные работы по изучению основных параметров связывания, а именно: числа сайтов связывания n белка, т.е. числа ионов металла, способного связаться с одним белком, значения и типа константы комплексообразования K_a для системы белок-тяжелый металл. Приведен обзор различных подходов и оптических методов для определения данных характеристик, в том

числе методов диализа, калориметрии. Отдельно рассматривается около 50 работ, в которых определение параметров связывания проводилось методом тушения флуоресценции белка, представлено сравнение результатов в определении основных параметров процесса связывания белка с лигандом для различных методов. Часть данной главы посвящается обсуждению влияния различных внешних факторов, таких как: температура, рН среды, концентрация ТМ, в результате которых возможен процесс агрегации, т.е. формирования устойчивых белковых комплексов. Описаны процессы, приводящие к конформации, агрегации и денатурации белковых молекул. Приведен также литературный обзор, посвященный работам по взаимодействию различных белков с солями ТМ, такими как: свинец, кадмий, цинк, а также даны разные объяснения механизма агрегации белков.

Вторая глава целиком посвящена оптическим методам, используемым в данной работе для исследования взаимодействия альбумина с ионами европия(III), приведено описание методик измерений. В данной главе рассматривается три оптических метода, используемые в эксперименте, один из которых дает возможность охарактеризовать процесс связывания белка с ТМ (метод флуоресцентной спектроскопии), а с помощью других двух методов описывается процесс агрегации альбумина под действием европия(III) (метод абсорбционной спектроскопии и динамического светорассеяния). Изначально рассмотрены физические основы двух методик флуоресцентной спектроскопии – метода тушения собственной флуоресценции БСА и метода флуоресценции европия(III), оба из которых дают возможность получить основные характеристики процесса связывания для системы БСА-Eu³⁺, n и K_d . Далее в данной главе подробно описаны оптические методы, с помощью которых в диссертационной работе наблюдался процесс агрегации – метод абсорбционной спектроскопии и динамического светорассеяния. Данные методы используются для количественного и качественного анализа веществ, они широко используются для исследования состава и строения частиц. Показано, что оба метода дополняют друг друга в понимании того, как именно формируются агрегаты, методы дают возможность оценить размер, форму и другие параметры образовавшихся комплексов.

В третьей и четвертой главах изложены оригинальные результаты. **Третья глава** диссертации содержит в себе данные экспериментального исследования процесса связывания макромолекул альбумина с ионами европия(III) при двух разных рН среды: рН=6 и рН=4,5. Известно, что поверхностный заряд на белковой молекуле зависит от рН среды. При рН=6 белок характеризуется отрицательным суммарным зарядом ($Z = -8$), а

при $pH=4,5$ – положительным ($Z=+5$). В связи с этим интерес представляет экспериментальное исследование эффективности связывания катионов европия(III) с положительно и отрицательно заряженным белком.

В данной части сравнивались разные флуоресцентные методы для определения основных параметров процесса связывания – числа сайтов связывания n и константы комплексообразования K_a – для системы белок–ТМ.

На Рис. 1(а) представлены экспериментальные данные по тушению собственной флуоресценции альбумина. Основные параметры процесса связывания определялись из модифицированного уравнения Штерна-Фольмера:

$$\lg \left[\frac{F_0 - F}{F} \right] = \lg K_a + n \lg Q,$$

где F_0 и F – интенсивность флуоресценции белка в отсутствии тушителя и в его присутствии, Q – тушитель (ионы европия(III)). Из модифицированного графика Штерна-Фольмера (Рис.1(б)) было определено, что число сайтов связывания $n=1$ для обоих значений pH среды.

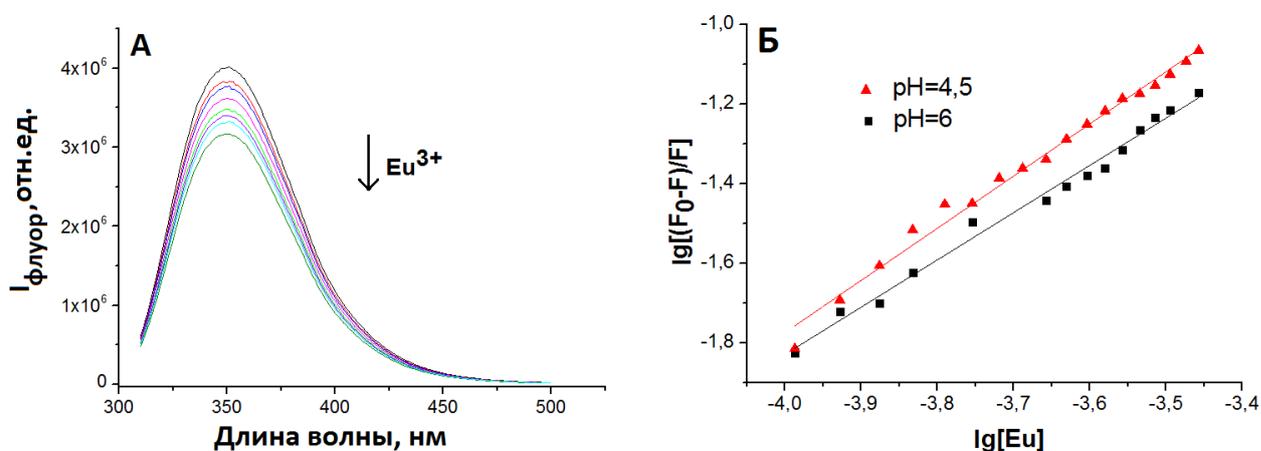


Рис.1. (а) Тушение интенсивности флуоресценции альбумина ионами европия(III), (б) Модифицированный график Штерна-Фольмера для двух значений pH : $pH=6$ и $pH=4,5$. $[BCA]=4,3e-5M$.

Значения констант комплексообразования для системы альбумин-европий(III) для $pH=6$ и $pH=4,5$ практически не отличались и были равны $lgK_a=2,9$ и $lgK_a=3,1$, соответственно.

Основные параметры связывания определялись в работе также с помощью метода флуоресценции европия(III). Флуоресценция европия(III) представляет собой результат переходов с уровня 5D_0 на все ниже лежащие 7F_J электронные уровни. Отношение

интенсивностей пиков I_{594}/I_{616} в спектре флуоресценции Eu^{3+} , соответствующие магнитному дипольному ${}^5\text{D}_0\text{-}{}^7\text{F}_1$ ($\lambda=594\text{nm}$) и индуцированному электрическому дипольному ${}^5\text{D}_0\text{-}{}^7\text{F}_2$ ($\lambda=616\text{nm}$) переходам, чувствительно к окружению ионов Eu^{3+} и может быть использовано для идентифицирования процесса связывания. Для получения количественной оценки числа сайтов связывания n в водный раствор Eu^{3+} , в котором концентрация европия(III) была постоянной, добавлялся белковый раствор. Как видно на Рис.2(а), происходит изменение спектра европия(III) в присутствии альбумина, при этом интенсивность пика на длине волны 594 нм, который соответствует магнитному дипольному переходу, остается практически постоянной, в то время как интенсивность пика на 616 нм, соответствующего «гиперчувствительному» переходу ${}^5\text{D}_0\text{-}{}^7\text{F}_2$, возрастает. Этот факт говорит о формировании комплекса $\text{Eu}^{3+}\text{-BSA}$.

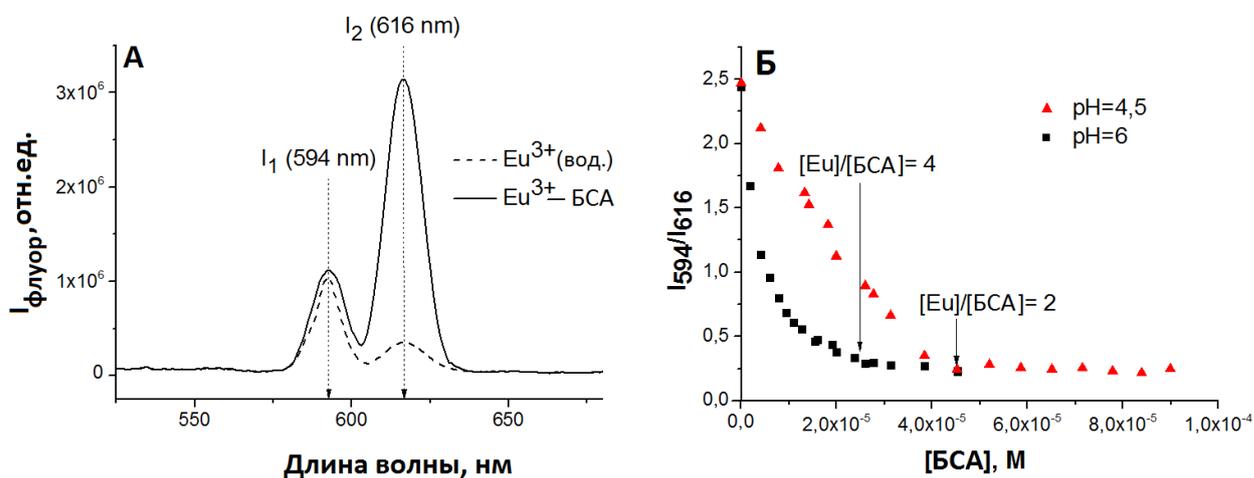


Рис. 2. (А) Спектр флуоресценции европия(III) в водном растворе и при добавлении альбумина, (Б) Зависимость отношения пиков I_{594}/I_{616} европия(III) от концентрации альбумина для двух значений pH: pH=6 и pH=4,5. $[\text{Eu}]=1\text{e-}4\text{M}$.

Зависимость отношения пиков I_{594}/I_{616} от концентрации БСА для двух значений pH, pH=6 и pH=4,5, представлена на Рис.2(б). Концентрация БСА, при которой отношение пиков I_{594}/I_{616} выходит на плато, соответствует ситуации, когда все ионы европия(III) связались с молекулами белка, и поэтому при дальнейшем прибавлении альбумина в раствор соли ТМ не наблюдается изменение спектра флуоресценции Eu^{3+} . Как видно из Рис.2(б), для кривой, полученной при pH=6, отношение I_{594}/I_{616} становится постоянным при отношении концентраций $[\text{Eu}^{3+}]/[\text{BSA}]=4$, т.е. четыре иона европия(III) связались с одной молекулой белка, $n=4$. Для pH=4,5 кривая зависимости $I_{594}/I_{616}([\text{BSA}])$ выходит на

плато при $[Eu^{3+}]/[BSA]=2$, т.е. в этом случае два иона европия(III) связались с одной молекулой белка, $n=2$.

Также проводились измерения флуоресценции европия(III) при титровании БСА европием(III) для получения константы комплексообразования (данные не показаны), значения K_a для обоих значений pH представлены в Таблице 1.

Данные по исследованию процесса связывания белков с различными лигандами чаще всего представляют с использованием модели Скетчарда, в которой предполагается существование у белковой молекулы n разных независимых друг от друга сайтов связывания, которые характеризуются различными константами комплексообразования K_a . Согласно модели Скетчарда среднее число связавшихся ионов европия(III) ν , приходящееся на одну молекулу БСА, может быть выражено следующим образом:

$$\nu = \frac{[c_B]}{[BSA]_T} = \sum_i^N \frac{n_i K_a^i [c_F]}{1 + K_a^i [c_F]},$$

где c_B и c_F – концентрация связанных и свободных ионов европия(III) в растворе, BSA_T – полная концентрация альбумина, n_i – число сайтов связывания i -го типа, приходящееся на одну молекулу белка, N – число различных типов сайтов связывания, K_a^i – константа комплексообразования для i -го типа сайта связывания. При использовании данных по флуоресценции европия(III) было определено число свободных и связанных ионов ТМ в белковом растворе, что дало возможность представить данные в стандартном виде с помощью модели Скетчарда, Рис. 3(а) и 3(б). При анализе данных графиков видно, что существует 2 типа различных сайтов связывания. Крутая часть графиков описывает специфические сайты связывания, которые характеризуются высокой константой комплексообразования K_a . Пологая часть графиков описывает неспецифические сайты связывания, характеризующиеся низкой константой комплексообразования. Использование модели Скетчарда дало возможность получить дополнительную информацию о типах сайтов связывания на белковой макромолекуле.

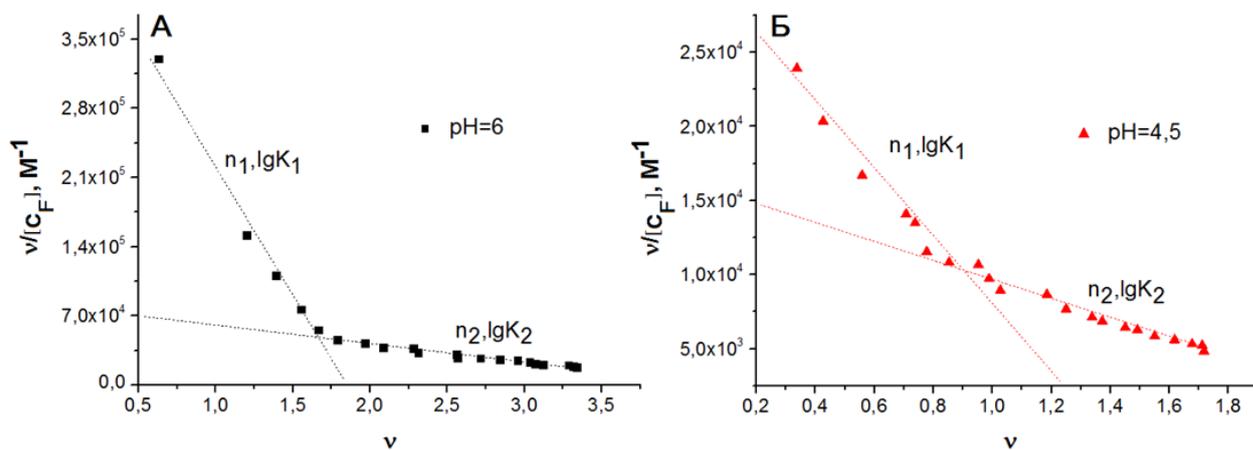


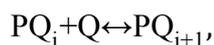
Рис. 3. Графики Скетчарда для системы БСА- Eu^{3+} для (А) $\text{pH}=6$ и (Б) $\text{pH}=4,5$.

В Таблице 1 представлено сравнение данных, полученных разными флуоресцентными методами для определения основных параметров процесса связывания системы БСА- Eu^{3+} .

Таблица 1. Сравнение основных параметров процесса связывания альбумина с ионами европия(III), полученных разными методами флуоресцентной спектроскопии.

Метод	n		$\lg K_a$	
	$\text{pH}=6$	$\text{pH}=4,5$	$\text{pH}=6$	$\text{pH}=4,5$
Тушение флуоресценции белка (модифицированное уравнение Штерна-Фольмера)	$n=1,2\pm 0,1$	$n=1,3\pm 0,1$	$\lg K = 2,9\pm 0,1$	$\lg K = 3,1\pm 0,1$
Флуоресценция Eu^{3+} (отношение пиков I_{594}/I_{616})	$n=4\pm 0,3$	$n=2\pm 0,2$	$\lg K = 5,5\pm 0,2$	$\lg K = 4,4\pm 0,2$
Метод Скетчарда	$n_1=1,8\pm 0,2$ $n_2=4,4\pm 0,3$	$n_1=1,2\pm 0,1$ $n_2=2,4\pm 0,2$	$\lg K_1 = 5,4\pm 0,3$ $\lg K_2 = 4,4\pm 0,2$	$\lg K_1 = 4,4\pm 0,2$ $\lg K_2 = 3,8\pm 0,1$

Из Таблицы 1 видно, что значения параметров, полученных с помощью модифицированного уравнения Штерна-Фольмера, не совпадают с этими же параметрами, полученными другими двумя флуоресцентными методами. Для объяснения несоответствия результатов анализировалась модель, которая используется в выводе модифицированного уравнения Штерна-Фольмера, – модель ступенчатого связывания лигандов с белком. Данная модель оперирует со ступенчатым (пошаговым) связыванием лиганда (ионов европия(III)) с белком:



где PQ_i обозначает комплекс белка с числом i лигандов, P – белок, Q – лиганд (в данной работе ионы европия(III)). Для констант комплексообразования выполнено следующее соотношение:

$$K_1 K_2 \dots K_n = \frac{[PQ_n]}{[P][Q]^n},$$

где K_i – это константа комплексообразования для связывания комплекса PQ_{i-1} с лигандом Q , n – суммарное число сайтов связывания на молекуле белка.

На Рис.4. представлен численный расчет распределения образовавшихся комплексов в зависимости от добавления лиганда с концентрацией $[Q]$. При этом в модель закладывались следующие параметры процесса связывания: $n=5$ и $\lg K_a = 4$.

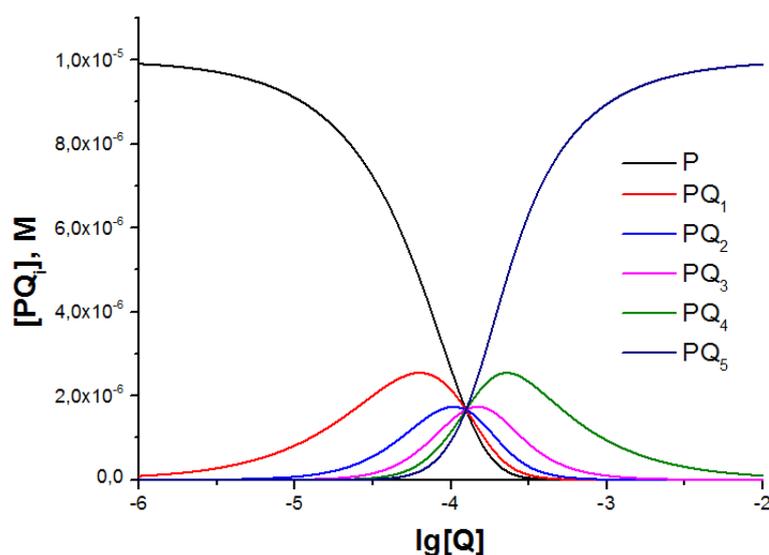


Рис. 4. Распределение комплексов белок-лиганд с помощью ступенчатой модели связывания. Используемые параметры связывания: $n=5$, $\lg K_a=4$. $[P]_T=1e-5M$.

С помощью данного распределения исследовались основные предположения, которые делаются при выводе модифицированного уравнения Штерна-Фольмера. Также, основываясь на нем и на общем выражении для интенсивности собственной флуоресценции белка:

$$F = \sum_{i=0}^n \alpha_i [PQ_i],$$

где α_i - квантовый выход флуоресценции комплекса с числом i лигандов, был выполнен численный расчет модифицированного графика Штерна-Фольмера, Рис.5. Набор квантовых выходов был получен с использованием данных по тушению флуоресценции БСА, Рис. 1(а). Предполагалось, что квантовый выход чистого белка был равен единице, а присоединение каждого иона европия(III) к молекуле БСА приводило к падению значения α на 0,03 (падения интенсивности флуоресценции на 15% при концентрации тушителя $[Eu^{3+}] = 1 \cdot 10^{-4} M$).

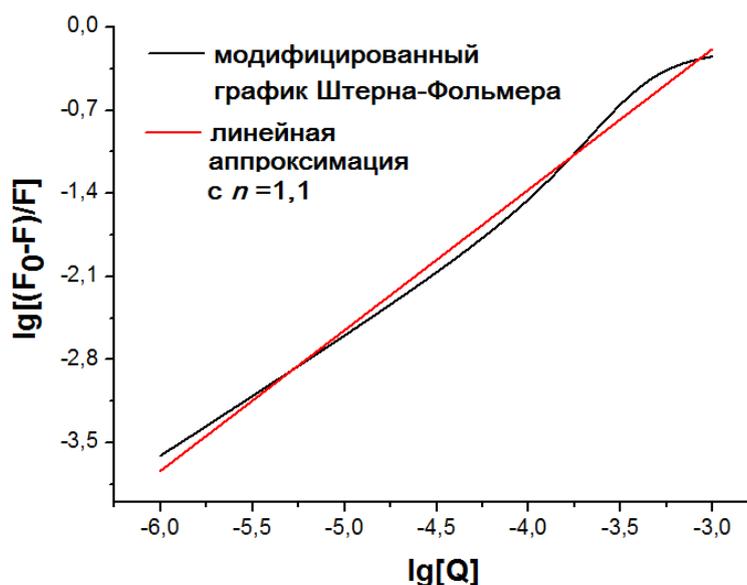


Рис. 5. Численный расчет модифицированного графика Штерна-Фольмера, полученного из ступенчатой модели связывания.

Линейная аппроксимация численно рассчитанного модифицированного графика Штерна-Фольмера дала значение $n = 1,10 \pm 0,01$ для ступенчатой модели связывания, в которой изначально были заложены параметры $n = 5$ и $lgK_a = 4$, что свидетельствовало о том, что значения сайтов связывания n , которые получаются из экспериментов по тушению флуоресценции белка, не соответствуют реальному числу сайтов связывания белка с лигандом.

В конце данной главы приведены экспериментальные данные по измерениям локального распределения ионов европия(III) по сайтам связывания альбумина. С помощью тушения интенсивности флуоресценции БСА показано, что распределение ионов ТМ по сайтам связывания белка существенно зависит от объема раствора с ионами металла, который добавляется в раствор белка.

В четвертой главе диссертационной работы обсуждаются результаты экспериментального изучения процесса агрегации, который происходит при определенных условиях среды (концентрация ТМ, концентрация белка, рН), полученные двумя оптическими методами – методом абсорбционной спектроскопии и методом динамического светорассеяния. Методом абсорбционной спектроскопии изучены условия, при которых начинается процесс комплексообразования альбумина под действием соли европия(III), исследуется процесс роста агрегатов, условия агрегации и денатурации белковых макромолекул.

На Рис.6 (а) представлены спектры поглощения чистого альбумина в отсутствие и в присутствии ионов европия(III) при рН=6,3.

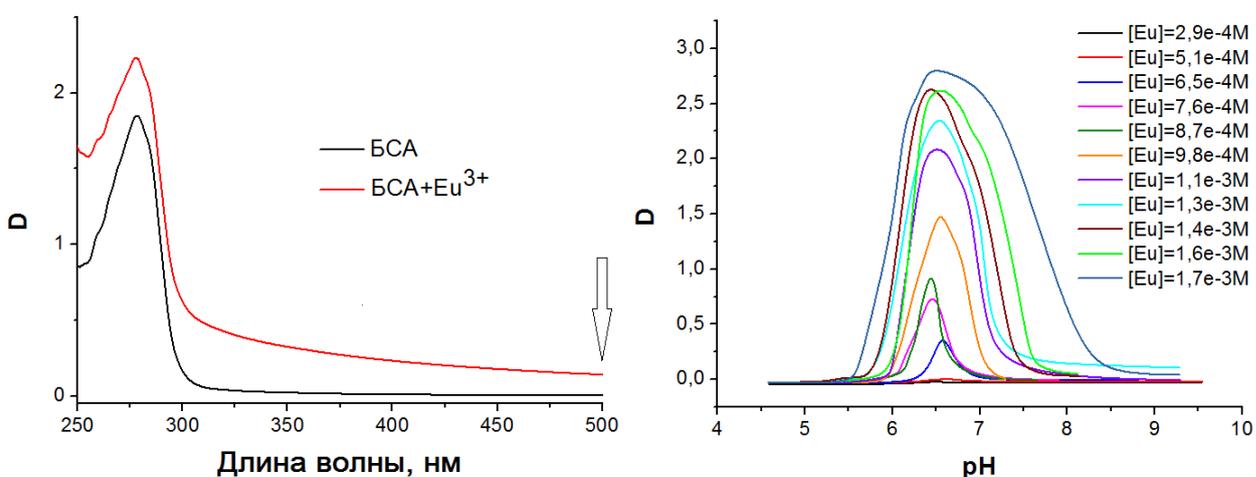


Рис. 6. (а) Спектр поглощения альбумина в отсутствие и в присутствии ионов европия(III), [БСА]=4,3e-5М, [Eu]=7,6e-4М, рН=6,3. (б) Оптическая плотность раствора альбумина при добавлении ионов европия(III) на длине волны 500нм в зависимости от рН, [БСА]=4,3e-5М.

Видно, что при добавлении соли европия(III) определенной концентрации, [Eu]=7,6e-4М, и при определенном значении рН, рН=6,3, оптическая плотность D на всех длинах волн возрастает, что говорит о процессе образования агрегатов. Также исследовалась зависимость D(рН) на длине волны 500нм, Рис. 6 (б), из которой видно, что процесс агрегации начинается примерно при рН=6,5 и при концентрации ионов европия(III) [Eu]=5,1e-4М, т.е. когда отношение концентраций соли ТМ к белку было равно примерно

11, [Eu]/[BCA]~11. Процесс агрегации альбумина может быть объяснен двумя разными процессами: 1) белки могут быть связаны между собой коллоидными частицами европия(III), т.е. коллоидные частицы будут выступать в качестве мостиков между белками. Или же возможен второй вариант: 2) белок адсорбируется на коллоидных частицах европия(III), что приводит к процессу агрегации и сильному помутнению раствора. Для исследования данного вопроса был использован метод динамического светорассеяния, который дал возможность исследовать размер и форму коллоидных частиц европия(III) и систему БСА-Eu³⁺.

Методом динамического рассеяния экспериментально измерялась временная автокорреляционная функция интенсивности рассеянного света, $g^{(2)}(\tau)$. Эта функция может быть преобразована в корреляционную функцию поля световой волны первого порядка $g^{(1)}(\tau)$, которая, в свою очередь, связана с трансляционным коэффициентом диффузии D_t . Гидродинамический радиус частиц R рассчитывался из формулы Стокса-Эйнштейна:

$$D_t = \frac{kT}{6\pi\eta R},$$

где k – константа Больцмана, T – абсолютная температура, η – сдвиговая вязкость раствора.

На Рис.7 представлены спектры распределения по гидродинамическим радиусам для частиц БСА без добавления ТМ и при разных концентрациях ионов европия(III), полученные методом динамического светорассеяния:

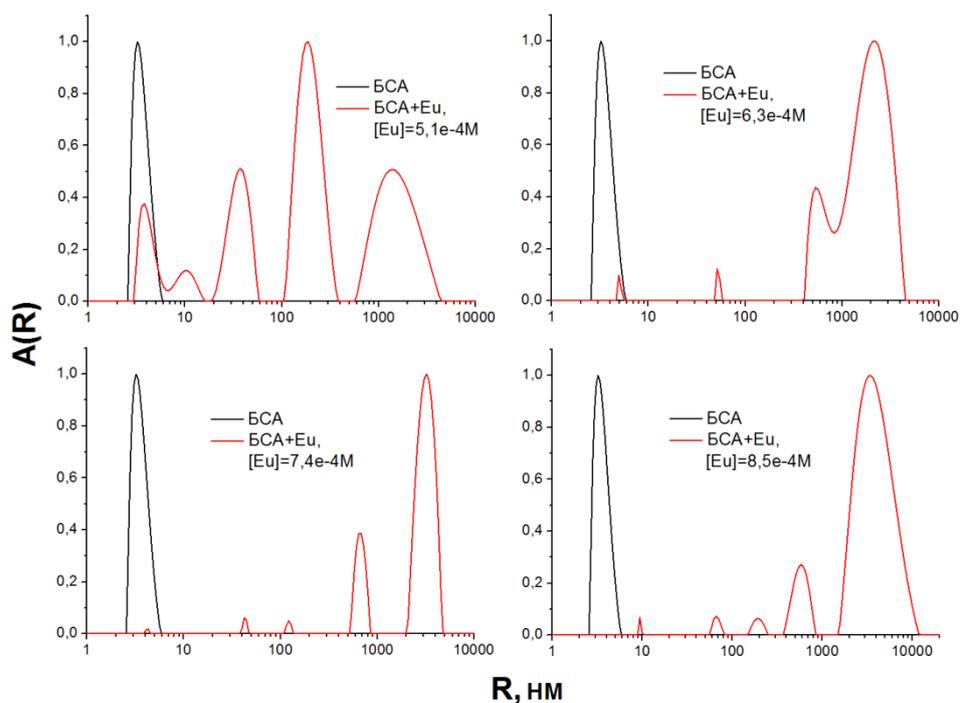


Рис. 7. Спектры распределения по гидродинамическим радиусам для частиц БСА и комплексов БСА+европий(III) при (а) $[Eu]=5,1e-4M$, (б) $[Eu]=6,3e-4M$, (в) $[Eu]=7,4e-4M$, (г) $[Eu]=8,5e-4M$. $[BSA]=4,3e-5M$, $pH=6,5$.

Видно, что по мере роста концентрации соли ТМ размер агрегатов увеличивался, и при концентрации Eu^{3+} равной $[Eu]=8,5e-4M$ в растворе наблюдались частицы, характеризующиеся радиусами порядка 1мкм. Для исследования процесса образования частиц с такими размерами сравнивались растворы чистого европия(III) и раствора БСА+европий(III), Рис. 8.

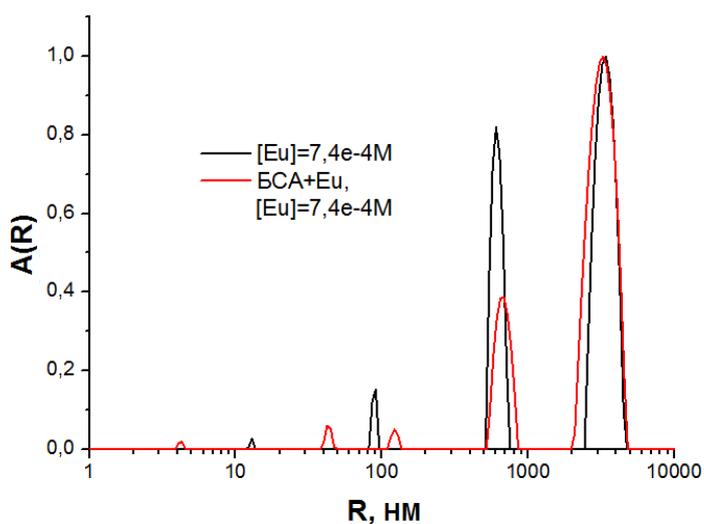


Рис. 8. Спектры распределения по гидродинамическим радиусам для коллоидных частиц Eu^{3+} и комплексов БСА+ Eu^{3+} в водном растворе. $[Eu]=7,4e-4M$, $pH=6,5$.

Из данного графика видно, что коллоидные частицы европия(III) характеризовались разными размерами, но основной вклад в рассеяние света давали частицы с радиусом порядка $R \sim 1 \mu\text{м}$, как и в случае системы БСА+Eu³⁺, что свидетельствовало о том, что процесс агрегации являлся результатом адсорбции белка на коллоидных частицах европия(III).

Надо отметить, что хотя размеры частиц в данных растворах были практически идентичны, см. Рис. 8, мутности τ обоих растворов сильно отличались. Интенсивность рассеяния раствора для системы БСА+Eu³⁺ в 78 раз превышала интенсивность рассеяния раствора коллоидных частиц европия(III). Наличие мутности определяется в основном двумя параметрами: изменением показателя преломления в среде и размером частиц:

$$\tau = \frac{32\pi^3}{3\lambda_0^4 N_a} \frac{\left(n \cdot \frac{dn}{dc_2}\right)^2 \cdot c_2}{\left(\frac{1}{M} + 2Vc_2\right)},$$

где dn/dc – инкремент показателя преломления, N_a – число Авогадро, M – масса частиц, V – вириальный коэффициент, c_2 – концентрация растворителя, λ_0 – длина волны. Изменение мутности коллоидного раствора европия(III) по сравнению с раствором альбумин+Eu³⁺ можно объяснить контрастом в показателе преломления для обоих растворов.

В заключении приведены основные результаты и выводы диссертационной работы, которые перечислены ниже:

1. Экспериментально получены основные параметры связывания – число сайтов связывания n и константа комплексообразования K_a – для системы белок-тяжёлый металл методом флуоресцентной спектроскопии. Показано, что для оценки данных параметров помимо стандартного метода – метода тушения флуоресценции белка – можно использовать европий(III) в качестве флуоресцентного зонда для определения числа связанных и свободных ионов европия(III) в белковом растворе. Использование этих данных с помощью модели Скетчарда дает возможность корректно определить число, тип сайтов связывания и значения констант комплексообразования.
2. При определении n и K_a методами флуоресцентной спектроскопии для системы БСА-Eu³⁺ было выявлено, что метод тушения флуоресценции белка, который основан на модифицированном уравнении Штерна-Фольмера, дал заниженные значения параметров n и K_a , $n=1$, $\lg K_a \sim 3$ при обоих значениях рН по сравнению с

- теми же параметрами, полученными методами флуоресценции европия(III) и методом Скетчарда: $n_1=2$, $n_2=4$ при $pH=6$ и $n_1=1$, $n_2=2$ при $pH=4,5$.
3. Экспериментально показано, что значения параметров n и K_a , которые были определены с помощью модифицированного уравнения Штерна-Фольмера, не зависели от pH среды, $n=1$ при $pH=6$ и $pH=4,5$, в то время как другие методы показали уменьшение числа сайтов связывания с $n=4$ до $n=2$ при изменении суммарного заряда молекулы альбумина от отрицательного (при $pH=6$) к положительному (при $pH=4,5$).
 4. Численно рассчитана модель ступенчатого связывания альбумина с лигандами (ионами европия(III)), на основе которой выводится модифицированное уравнение Штерна-Фольмера. С помощью полученных распределений была показана некорректность предположений, заложенных в вывод модифицированного уравнения Штерна-Фольмера.
 5. С помощью метода тушения флуоресценции белка исследовано локальное распределение ионов европия(III) по сайтам связывания альбумина. Показано, что воздействие концентрированного раствора лиганда на белковую молекулу приводит к неравномерному распределению ионов европия(III) по сайтам связывания из-за конформационных изменений белка.
 6. Экспериментально исследован процесс агрегации альбумина под действием тяжелого металла Eu^{3+} методом абсорбционной спектроскопии. Показано, что он происходит в определенном диапазоне pH среды, $pH>6$, определенной концентрации европия(III), $[Eu]>5e-4M$, и альбумина, $[BCA]=4e-5M$, в растворе.
 7. Обнаруженное увеличение мутности белкового раствора по сравнению с раствором коллоидных частиц европия(III) объяснено тем, что белковые молекулы, адсорбируясь, создают белую пленку на поверхности коллоидных частиц, что ведет к контрасту показателя преломления белковых агрегатов по сравнению с коллоидными частицами европия(III).
 8. Экспериментальные результаты, полученные методом динамического светорассеяния, позволяют объяснить процесс агрегации наличием коллоидных частиц европия(III) в растворе, размер которых зависит от водородного показателя среды и от концентрации ТМ в растворе. При этом происходит адсорбция белковых молекул на поверхности коллоидных частиц.

Список публикаций автора по теме работы

1. G. Petrova, A. Boiko, K. Fedorova, I. Sergeeva, N. Sokol, T. Tichonova “Optical properties of solutions consisting of albumin and γ -globulin molecules in different ratio modeling blood serum” // *Laser Phys.*, 19, 1303-1307, (2009);
2. Г. Петрова, Ю. Петрусевич, М. Гурова, И. Сергеева, Т. Тихонова, К. Федорова, Ч. Сяолей “Физический механизм токсического воздействия тяжелых металлов на белки и ферменты”// *Мед. Физ.*, 2, 101-104, (2010);
3. Т. Тихонова, Г. Петрова, Ю. Петрусевич, К. Федорова, В. Кашин “Образование дипольных нанокластеров в растворах основных белков сыворотки крови, содержащих ионы европия и калия”// *Вестник МГУ. Сер.3. Физика. Астрономия.* №2, 82-87, (2011);
4. Г. Петрова, Ю. Петрусевич, С. Сергеев, К. Федорова, Т. Тихонова “Механизмы токсичного воздействия тяжелых ионов и ионов калия на организм человека” // *Физ. проб. экологии*, 16, 230-236, (2010);
5. К. Федорова, Т. Тихонова, Г. Петрова, Ю. Петрусевич, Е. Папиш “Воздействие ионов европия на ферменты – лизоцим и креатинкиназу – в водных растворах” // *Физ. проб. экологии*, 17, 469-475, (2010);
6. Г.П. Петрова, В.В. Колесов, Т.Н. Тихонова, В.В. Кашин “Физические методы исследования и визуализации наноструктур, возникающих при взаимодействии металлов большого ионного радиуса с заряженными макромолекулами”// *девятая международная научно-практическая конференция “Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности”, 22-23 апрель, 2010, Сборник трудов, стр. 380-388, Санкт-Петербург, Россия.*
7. Г.П. Петрова, Т.Н. Тихонова, К. Федорова, В.В. Кашин “Отравление белков и ферментов ионами калия, изученное методами рассеяния света и АСМ”// *III Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии “Медицинская физика - 2010”, 21-25 июня, 2010, Сборник материалов, стр.120-122, Москва, Россия.*
8. Г. Петрова, Ю. Петрусевич, И. Сергеева, Т. Тихонова, К. Федорова «Образование дипольных нанокластеров в растворах белков и ферментов, содержащих малые концентрации токсичных тяжелых металлов» // *III Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии “Медицинская физика - 2010”, 21-25 июня, 2010, Сборник материалов, стр.326-327, Москва, Россия.*
9. G. Petrova, Y. Petrusevich, K. Fedorova, I. Sergeeva, T. Tichonova, Z. Xiaolei “Physical mechanism of “poisoning” the proteins and enzymes by heavy metals”// *International*

- Conference on Laser Applications in Life Sciences (LALS-2010), June 2010, Book of abstract, p.140, Oulu, Finland.
10. G. Petrova, Y. Petrusevich, M. Gurova, I. Sergeeva, S. Sergeev, T. Tichonova, K. Fedorova, Z. Xiaolei “Mechanism of heavy metal ions toxic influence on proteins and enzymes studying by different laser optical methods”// 18-th International Conference Advanced Laser Technologies (ALT-10), 11-16 September, 2010, Book of abstract, p.53, Egmond aan Zee, The Netherlands.
 11. G.P. Petrova, M. Ivanova, I. Sergeeva, T.N. Tichonova, K.V. Fedorova “Diffusion processes in proteins and enzymes water solutions containing toxic heavy metals and visualization of appearing dipole nano structures by atomic force microscopy” // The 8-th Pacific Symposium on Flow Visualization and Image Processing (PSFVIP-8), 21-25 August, 2011, Book of abstract, p. 52 , Moscow, Russia.
 12. Т.Н. Тихонова “Определение числа связывающих центров альбумина при взаимодействии с солью европия методом флуоресцентной спектроскопии”// Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам “Ломоносов – 2013”, 8-13 апреля, 2013, сборник трудов, Москва, Россия.
 13. Е.А. Ширшин, Жданова Н.Г., Тихонова Т.Н., Фадеев В.В. “Диагностика структурных характеристик сывороточного альбумина человека с использованием лазерной флуоресцентной спектроскопии”// Международная научная конференция “Ломоносовские чтения”, апрель, 2013, сборник трудов, Москва, Россия.
 14. Т. N. Tikhonova, E.A. Shirshin, G. Petrova, V.V. Fadeev “Albumin-Eu³⁺ interaction: determination of the number of binding sites with the use of fluorescence spectroscopy”// International Conference on Laser, Applications and Technologies (ICONO/LAT), 2013, 18-22 June, Moscow, Russia.

Формат 15×21. Заказ 1214. Тираж 100 экз.

Печать лазерная. Бумага для лазерных аппаратов.

Отпечатано в ООО «Lintek», Москва, Ленинские горы, вл.1, стр.58

Тел. (495)988-41-61