

На правах рукописи
УДК 535.37; 532:541.64

Сокол Наталья Васильевна

Оптические свойства растворов белков, содержащих
ионы тяжелых металлов

03.00.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва

2006

Работа выполнена на кафедре молекулярной физики физического факультета
Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,
профессор Петрова Галина Петровна

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук,
профессор

Рууге Энно Куустович

кандидат физико-математических наук,
старший научный сотрудник

Захаров Станислав Дмитриевич

Ведущая организация: Государственное учреждение
Российский онкологический
научный центр им. Н.Н.Блохина РАМН

Защита диссертации состоится 8 июня 2006 года в 18:00 часов на
заседании диссертационного совета К 501.001.08 в МГУ им. М.В. Ломоносова
по адресу: 119992, ГСП-2, г. Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В.
Ломоносова, Физический факультет, аудитория 5-19.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке физического
факультета МГУ.

Автореферат разослан 5 мая 2006 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета К 501.001.08,

доцент

Г.Б. Хомутов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Большинство метаболических реакций в живом организме осуществляются при непосредственном участии белковых макромолекул. Несомненный интерес для современной биофизики и физико-химической медицины представляют исследования воздействий на белковые системы токсичных металлов, которые являются причиной экологических загрязнений и приводят к серьезным, часто необратимым структурно-функциональным нарушениям в организме.

Токсичные металлы могут находиться в растворах белков как в свободной (ион металла + гидратная оболочка), так и в хелатной формах (ион металла + хелат + гидратная оболочка). Хелатные соединения, в частности этилендиаминтетраацетат (*ЭДТА*) с ионами металлов, являются устойчивыми комплексами. Это свойство используется в пищевой промышленности, а также в клинической практике для лечения отравлений тяжелыми металлами. Конкурирующими ионами за место в комплексе с *ЭДТА* могут выступать ионы кальция, калия, натрия. Поэтому применение комплексов на основе *ЭДТА* может приводить к нарушениям установившегося равновесия между различными ионами металлов в плазме крови и тканях организма. Молекулы комплексонов практически не подвергаются расщеплению в биологической среде и при определенных концентрациях могут отрицательно воздействовать на слизистую оболочку.

Поведение белковых макромолекул в растворах определяется электростатическим взаимодействием между зарядами на их поверхности. Однако оказалось, что при определенных условиях, например, когда в растворе присутствуют ионы тяжелых металлов, взаимодействие заряженных групп белковых макромолекул с ними может приводить к экранированию поверхностных зарядов. В этом случае существенную роль начинают играть диполь-дипольные взаимодействия, молекулы белка

сближаются на предельно допустимые расстояния, что приводит к изменениям их как статических, так и динамических параметров.

Ранее с помощью методов статического и динамического рассеяния света было показано, что присутствие токсичных ионов в белковых растворах приводит к агрегации частиц и образованию т.н. белковых нанокластеров.

Среди существующих оптических методов флуоресцентные методы анализа являются одними из наиболее чувствительных для определения количественного содержания вещества в биологических образцах. Параметры флуоресценции чувствительны к структуре окружения флуорофора, поэтому флуоресцентные методы применяются также и для изучения структурных превращений в различных веществах.

Очень важное свойство флуоресцентных методов в биологических экспериментах состоит в том, что измерения люминесценции и спектров поглощения могут проводиться в сильно рассеивающих, гетерогенных средах.

В основе метода поляризации флуоресценции лежит исследование вращательной подвижности молекул в растворах. Вращательная подвижность частиц в растворах белка при добавлении токсичных ионов будет изменяться при образовании белковых структур — нанокластеров. Поэтому, исследуя поляризацию флуоресценции молекул в растворах белка, содержащих токсичные ионы, можно определять времена корреляции вращательной подвижности, которые напрямую связаны с массами и размерами нанокластеров, а также условия их образования в зависимости от параметров среды.

Исследования растворов белков, содержащих ионы тяжелых металлов или их хелатные комплексы, представляют несомненный интерес для понимания механизмов токсического воздействия этих соединений на организм.

Цель и задачи исследования

Цель данной работы — экспериментальное исследование возникновения макромолекулярных кластеров в растворах альбумина, содержащих ионы тяжелых металлов и хелата европия, с помощью методов поляризации флуоресценции, светорассеяния, флуоресцентной и корреляционной спектроскопии.

Для достижения этой цели в работе предполагалось решить *ряд задач*:

- создание экспериментальной установки на основе *Ar*-лазера для изучения поляризации флуоресценции биологических жидкостей в видимом диапазоне длин волн;
- подбор флуоресцентных зондов для исследования вращательной подвижности частиц в растворах альбумина, содержащих ионы тяжелых металлов;
- исследование флуоресценции растворов белков, содержащих соли свинца, натрия и хелат европия;
- получение и сравнение спектров флуоресценции водных растворов альбумина при добавлении токсичных ионов и без них;
- расчет времени корреляции вращательной подвижности и эффективной массы частиц в исследуемых растворах в зависимости от параметров среды (концентрации токсичных ионов, *pH*);
- сравнение полученных результатов с данными по светорассеянию и корреляционной спектроскопии в тех же системах.

Научная новизна диссертации

- С помощью флуоресцентной спектроскопии в видимом и ультрафиолетовом диапазонах длин волн и метода поляризации флуоресценции проведено исследование растворов сывороточного альбумина (*BSA*) с солями металлов (Na^+ , Pb^{2+} и Cd^{2+}) при изменении ряда параметров среды, таких как концентрация макромолекул, *pH* и ионная сила растворов.

- Впервые с помощью флуоресцентной спектроскопии и метода поляризации флуоресценции проведено исследование растворов хелата европия (соединение ЭДТА с Eu^{3+}) при изменении ряда параметров среды, таких как концентрация и pH растворов.
- С помощью флуоресцентной спектроскопии и метода поляризации флуоресценции проведено исследование растворов *БСА*, содержащих хелат европия при изменении различных параметров, таких как концентрация компонентов, pH растворов, длина волны возбуждения флуоресценции.
- Показано, что наличие в растворах белка ионов легких металлов (Na^+) не приводит к увеличению времени корреляции вращательной подвижности и массы частиц. Наличие в растворах *БСА* ионов тяжелых металлов (Cd^{2+} , Pb^{2+}) вызывает образование наночастиц — белковых кластеров.
- Впервые показано, что наличие в растворах *БСА* молекул хелата европия приводит к образованию белковых макромолекулярных комплексов — наночастиц, как и при добавлении солей тяжелых металлов.
- Показано, что значения времен корреляции вращательной подвижности частиц в растворах белков, содержащих тяжелые ионы, растут при увеличении ионной силы (концентрации).
- Получены зависимости времен корреляции вращательной подвижности частиц в белковых растворах от поверхностного заряда на макромолекулах; эти зависимости имеют максимумы в изоэлектрической точке белка.
- Метод поляризации флуоресценции применен для исследования растворов сыворотки крови; показано, что интегральные характеристики времен корреляции вращательной подвижности

белков сыворотки крови могут различаться для здоровых людей и пациентов с онкологическими заболеваниями.

Научно-практическая значимость исследования

Основные результаты работы способствуют развитию представлений о молекулярно-динамических процессах, происходящих в растворах белковых макромолекул, содержащих ионы легких и тяжелых металлов, а также вносят вклад в понимание природы межмолекулярных взаимодействий.

Изученное в работе поведение белковых макромолекул в растворах и их взаимодействие с ионами различных металлов, в том числе с ионами тяжелых металлов, может быть использовано в исследованиях изменений физико-химических характеристик сыворотки крови, происходящих при патогенезе многих распространенных заболеваний.

Метод поляризации флуоресценции, отличающийся высокой чувствительностью и специфичностью, возможно применять для диагностики заболеваний (в том числе онкологических) на ранних стадиях их развития, даже при незначительных изменениях свойств сыворотки крови.

Материалы диссертации могут быть использованы при разработке физических методов мониторинга загрязнения природных сред тяжелыми металлами, а также для создания диагностических приборов.

Защищаемые положения

- Показана возможность определения малых концентраций ионов токсичных металлов в свободной и хелатной формах с помощью флуоресцентных методов.
- С помощью метода поляризации флуоресценции обнаружено образование наночастиц — белковых кластеров в водных растворах альбумина в присутствии ионов тяжелых металлов свинца и кадмия.

- Обнаружено, что присутствие молекул хелата европия в растворах *БСА* приводит к увеличению времени корреляции вращательной подвижности частиц, что, по-видимому, связано с образованием белковых кластеров.
- Независимо методами интегрального светорассеяния и фотонно-корреляционной спектроскопии подтверждено образование наночастиц в растворах альбумина, содержащих ионы хелата европия.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на конференциях: International Conference ALT-03 (Silsoe, 2003), Четвертая Всероссийская научная конференция «Физические проблемы экологии» (Москва, 2004), Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов 2004», «Ломоносов 2005» (Москва, 2004, 2005), II Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии (Москва, 2005), International Conference ICONO/LAT 2005 (St. Petersburg, 2005), Конференция молодых ученых в рамках всемирного дня физики в МГУ, (Москва, 2005), ежегодная научная конференция «Ломоносовские Чтения» 2006 (Москва, 2006), Photonic West, Diagnostics and Sensing VI (San-Jose, USA, 2006).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 05-02-17838 и Университеты России 01.03.077.

Публикации

По материалам диссертационной работы имеется 13 публикаций, в числе которых 3 статьи в российских и международных научных журналах.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения и списка литературы, содержащего 90 наименований. Объем работы составляет 173 страницы, включая 98 рисунков и 18 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во *введении* представлена общая характеристика диссертационной работы. Обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, изложены научная новизна и практическая ценность полученных результатов.

Первая глава диссертации посвящена описанию взаимодействий в растворах электролитов. В §1 изложены основные положения теории Дебая-Хюккеля, описывающей поведение полиэлектролитов в растворе в свете простейшей модели твердых сфер, погруженных в сплошную среду и взаимодействующих по закону Кулона. Согласно этой теории, каждая молекула оказывается окруженной атмосферой противоионов, что приводит к частичной экранировке кулоновских взаимодействий. Даны определения ионной силы, коэффициента активности ионов, pH среды и изоэлектрической точки.

В §2 изложена теория взаимодействия в растворах электролитов. Описаны виды слабых взаимодействий между молекулами растворов.

В §3 описан механизм взаимодействия ионов металлов с заряженными макромолекулами в растворах, приведен обзор экспериментальных работ по исследованию растворов белков с ионами тяжелых металлов. Белки в растворе представляют собой полиэлектролиты, основным видом взаимодействия между которыми является кулоновское отталкивание. Ионы тяжелых металлов будут взаимодействовать с противоположно заряженными группами на поверхности белка, нейтрализуя тем самым

суммарный поверхностный заряд макромолекул. В этом случае характер взаимодействия белковых макромолекул будет определяться конкуренцией сил диполь-дипольного притяжения и сил кулоновского отталкивания.

Согласно Скэтчарду, свободная энергия межмолекулярного взаимодействия в таких растворах определяется вторым вириальным коэффициентом B :

$$B = \frac{V_1}{M_2^2} \left(\frac{Z^2}{4c_3} + \frac{\beta_{22}}{2} - \frac{\beta_{23}^2 c_3}{4 + 2\beta_{33} c_3} \right), \quad (1)$$

здесь V_1 — удельный объем растворителя; M_2 — масса макроиона, c_3 — концентрация ионов соли; Z — суммарный заряд на белковой поверхности. Параметры β_{ij} характеризуют эффект исключенного объема и взаимодействие между парами ионов (индекс 2 относится к макромолекулам белка, 3 — ионам соли). Очевидно, что коэффициент взаимодействия меняется с ростом суммарного заряда на белке по параболическому закону (эффект Доннана) с минимумом в изоэлектрической точке.

Таким образом, если эффективный поверхностный заряд $Z \rightarrow 0$, что наблюдается в области изоэлектрической точки, то белковые макромолекулы могут сблизиться на предельно малые расстояния. Это значит, что создаются такие условия (при минимуме свободной энергии), что молекулам выгоднее объединиться в комплексы — кластеры.

Вторая глава посвящена описанию методов люминесцентного анализа. Рассмотрены физические основы явления флуоресценции и основные законы флуоресценции (§1). Описан экспериментальный метод поляризации флуоресценции (§2), а также экспериментальные установки (§3) и методика проведения эксперимента (§4).

Свечение атомов, молекул, ионов и других, более сложных соединений, возникающее в результате испускания фотонов из электронно-возбужденных состояний в этих частицах, называется люминесценцией.

В основе экспериментального метода поляризации флуоресценции, применяемого в данной работе, лежит последовательное измерение компонент интенсивности флуоресценции с параллельным и перпендикулярным направлениями поляризации. Флуорофорами поглощаются в основном те фотоны, у которых электрические векторы световой волны направлены параллельно диполю поглощения флуорофора при переходе в возбужденное состояние. Для каждого флуорофора диполи поглощения и испускания имеют фиксированную ориентацию, а угол между ними определяет максимальную измеряемую поляризацию флуоресценции P .

Согласно теории вращательной деполяризации люминесценции Левшина-Перрена, при поляризованном возбуждении справедливо соотношение:

$$\frac{1}{P} = \frac{1}{P_0} + \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \frac{\tau_{\text{фл}}}{\tau_{\text{вр}}}; \quad \tau_{\text{вр}} = \frac{V\eta}{kT} = \frac{M\eta}{\rho kT}; \quad (2)$$

здесь P — наблюдаемая степень поляризации; P_0 — ее предельное значение в отсутствие деполяризации; V , M — объем и масса вращающейся молекулы; ρ — ее плотность; $\tau_{\text{фл}}$ — время жизни возбужденного состояния; $\tau_{\text{вр}}$ — время корреляции вращательной подвижности (переориентации) молекулы; η — вязкость раствора.

Степень поляризации убывает с уменьшением времени ориентационной корреляции излучающей молекулы и может служить мерой ее вращательной подвижности. Именно на этой зависимости основан метод поляризации флуоресценции.

Основная часть исследований проводилась на оптической установке с Ar -лазером ИЛА-120 и фотоэлектрической регистрацией излучения (Рис. 1). Исследования проводились на длине волны 460 нм (мощность излучения ~ 15 мВт). Спектры флуоресценции снимались на фирменных спектрофлуориметрах «Хитачи» и «Перкин Элмер».

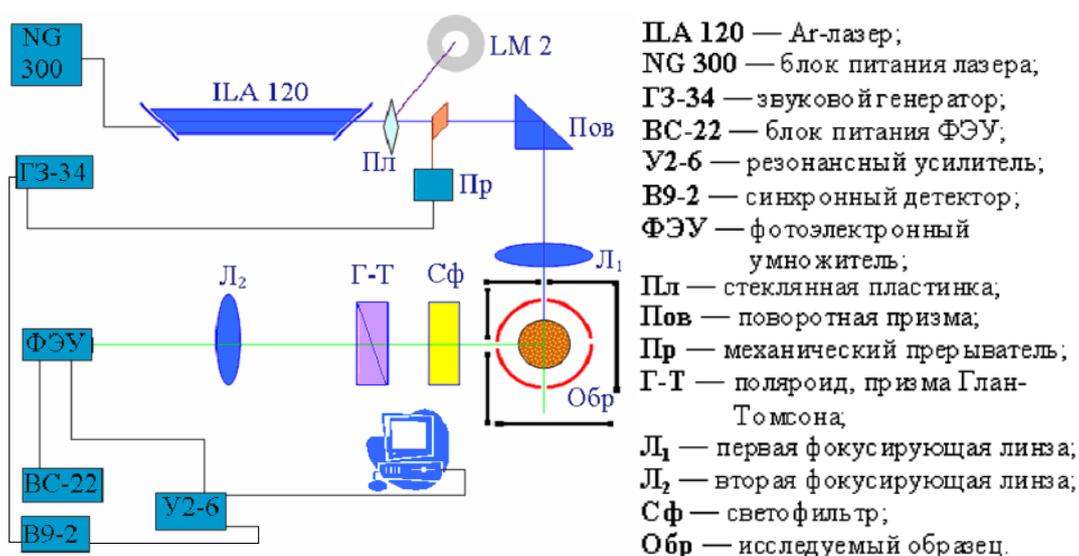


Рис. 1. Схема оптической установки на основе Ar-лазера с изображением хода лучей.

Третья глава посвящена описанию физических свойств, флуоресцентных характеристик исследуемых в работе веществ. В ней содержатся общие сведения о химическом составе и строении исследуемых веществ: макромолекул *BCA*; тяжелых металлов свинца и кадмия в составе солей $Pb(CH_3COO)_2$ и $CdSO_4$; хелата европия — соединения Eu^{3+} с ЭДТА; а также специально подобранных флуоресцентных красителей: *DSY*, *TNS*, флуоресцеина.

В четвертой главе содержится экспериментальная часть работы. Приводятся данные, полученные в результате исследования спектральных характеристик систем растворов, зависимости характеристик макромолекул от различных параметров (концентрации токсичных соединений, концентрации белка, *pH* среды), проведенные математические расчеты и оценки.

§1 посвящен исследованию спектров и поляризации флуоресценции белковых растворов при добавлении красителя флуоресцеина. Зависимость степени поляризации флуоресценции зонда в водных растворах белка и растворах белка с солью тяжелого металла *Cd* приведена на Рис.2.

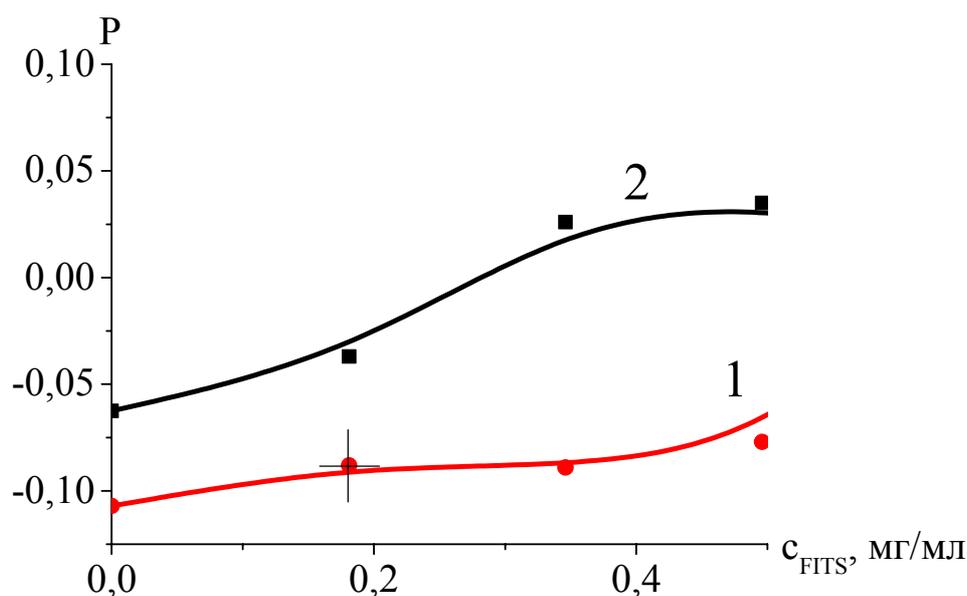


Рис. 2. Поляризация флуоресценции растворов (pH 7) в зависимости от концентрации флуоресцеина ($\lambda_{\text{возб}}=4579\text{\AA}$):
 1 — BCA ($C_{BCA}=5,6 \cdot 10^{-6}M$) + флуоресцеин;
 2 — BCA ($C_{BCA}=5,6 \cdot 10^{-6}M$) + $CdSO_4$ ($C_{Cd}=3,3 \cdot 10^{-3}M$) + флуоресцеин.

В области малых концентраций красителя, где еще не происходит концентрационного тушения, степень поляризации флуоресценции красителя имеет бóльшую величину в растворах белка, содержащих ионы кадмия. В соответствии с формулой (2) это свидетельствует о росте времени корреляции вращательной подвижности частиц в этих растворах, а следовательно о росте средней эффективной массы частиц.

§2 четвертой главы посвящен исследованию спектров и поляризации флуоресценции белковых растворов при добавлении флуоресцентного красителя TNS . Было выявлено свойство данного красителя увеличивать квантовый выход флуоресценции при присоединении к поверхности белка. При добавлении малых концентраций соли Pb^{2+} в растворы альбумина с красителем, интенсивность флуоресценции красителя увеличивалась с ростом концентрации свинца. Интенсивность флуоресценции красителя в растворах с концентрацией Pb^{2+} , не превышающей ПДК, практически не отличалась от значений интенсивности флуоресценции растворов без тяжелых ионов. Значения степени поляризации частиц в растворах

альбумина с Pb^{2+} , как и в случае с Cd^{2+} , были больше значений для альбумина в водном растворе. Что также подтверждает увеличение массы частиц в растворах белка с тяжелыми ионами, связанное с объединением белковых молекул в кластеры.

§3 посвящен исследованию спектров и поляризации флуоресценции белковых растворов при добавлении флуоресцентного красителя *DSY*. Интенсивность флуоресценции *DSY* увеличивалась в растворах белка, содержащих ионы тяжелого металла.

В §4 приведены данные по исследованию флуоресцентных спектров и поляризации флуоресценции растворов *БСА* при добавлении хелата европия (*Eu-ЭДТА*). Спектры хелата *Eu* имеют 3 выраженных максимума, интенсивность флуоресценции в которых зависит от концентрации хелата и *pH* среды (Рис. 3).

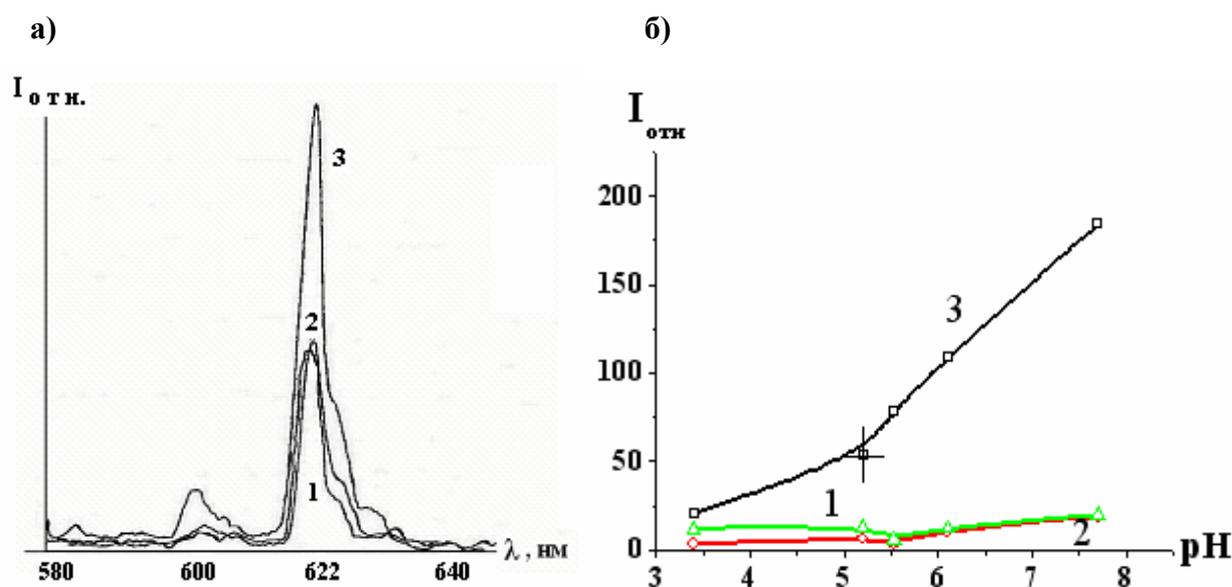


Рис. 3 а) Спектры флуоресценции растворов хелата *Eu*, $I_{отн}(\lambda_{исп})$, $\lambda_{возб}=460\text{нм}$:
 1 — $C_{Eu-ЭДТА}=232 \cdot 10^{-5}\text{М}$; 2 — $C_{Eu-ЭДТА}=116 \cdot 10^{-5}\text{М}$; 3 — $C_{Eu-ЭДТА}=15 \cdot 10^{-5}\text{М}$; **б)** *pH*-зависимости относительной интенсивности флуоресценции *Eu-ЭДТА* в водных растворах для трех максимумов флуоресцентного спектра ($\lambda_{возб}=457,9\text{нм}$):
 1 — $\lambda_{фл}=512\text{нм}$; 2 — $\lambda_{фл}=600\text{нм}$; 3 — $\lambda_{фл}=622\text{нм}$.

Оказалось, что добавление альбумина в водный раствор хелата *Eu* приводит к смещению максимума интенсивности в спектре испускания в более коротковолновую область (Рис. 3). Интенсивность флуоресценции

Eu^{3+} в растворах хелата с альбумином зависит от pH и достигает максимальных значений в области pH 5 (Рис. 5).

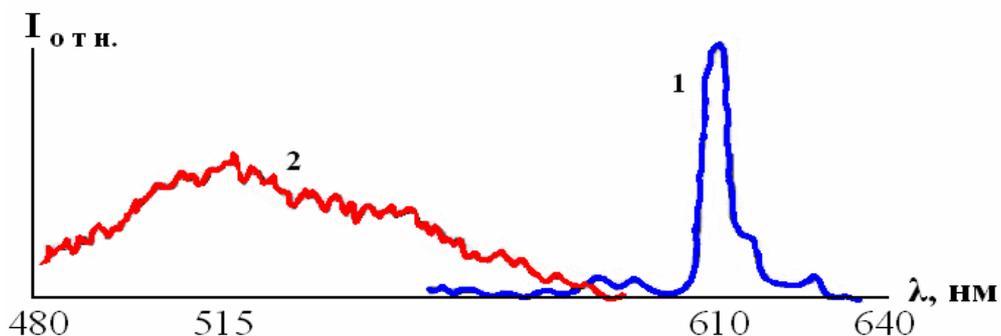


Рис. 4. Спектры поглощения раствора хелата европия по сравнению с флуоресцентными спектрами растворов *BSA* с хелатом европия (pH 7), $I_{отн}(\lambda_{исп})$, $\lambda_{возб}=460$ нм:

- 1 — $C_{Eu-ЭДТА}=14,5 \cdot 10^{-5}$ М;
 2 — $C_{BSA}=3,3 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{Eu-ЭДТА}=5,7 \cdot 10^{-5}$ М.

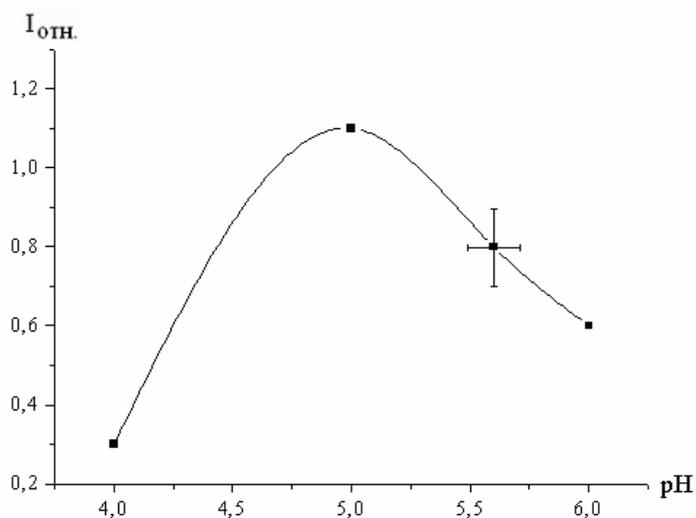


Рис. 5. Зависимость интенсивности флуоресценции водных растворов *BSA* ($C_{BSA}=8,3 \cdot 10^{-6}$ М)+хелат *Eu* ($C_{Eu-ЭДТА}=4,2 \cdot 10^{-6}$ М) от pH среды.

По исследованию поляризации флуоресценции хелата *Eu* в 60%-х растворах глицерина с белком были найдены значения предельной степени поляризации P_0 (Рис. 6).

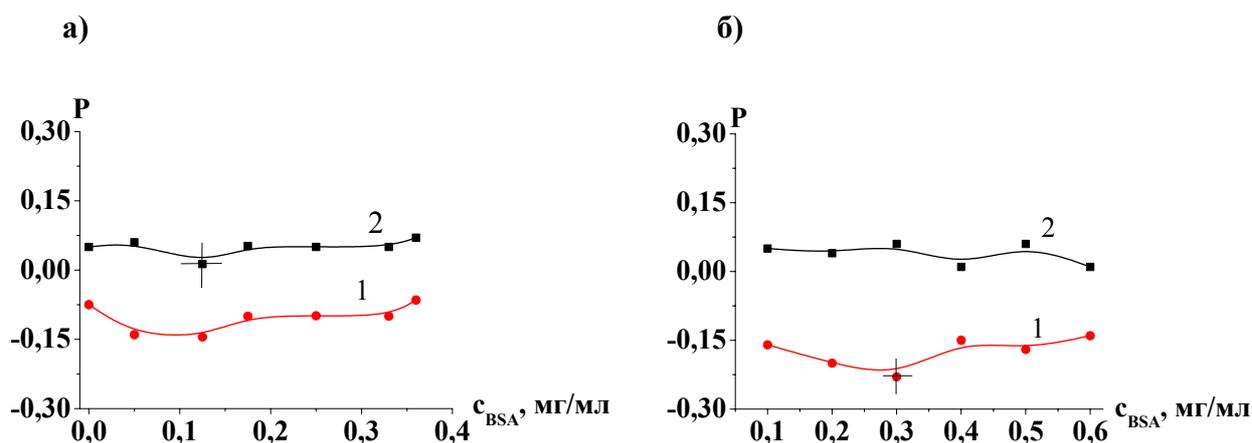


Рис. 6. Зависимости степени поляризации флуоресценции частиц в растворах *BSA* + хелат *Eu*: **а)** $C_{Eu-ЭДТА}=2,9 \cdot 10^{-5} M$; **б)** $C_{Eu-ЭДТА}=4,9 \cdot 10^{-5} M$; кривые 1 — соответствуют водным растворам; 2 — 60% растворам глицерина.

§5 посвящен исследованию спектров и поляризации флуоресценции растворов *BSA* при возбуждении в ультрафиолетовом диапазоне длин волн. Исследования проводились в водных растворах и 60%-х растворах глицерина, для определения P_0 . На **Рис. 7а** приведены зависимости интенсивности флуоресценции альбумина в водных растворах при добавлении ионов металлов — тяжелого Pb^{2+} и легкого Na^+ .

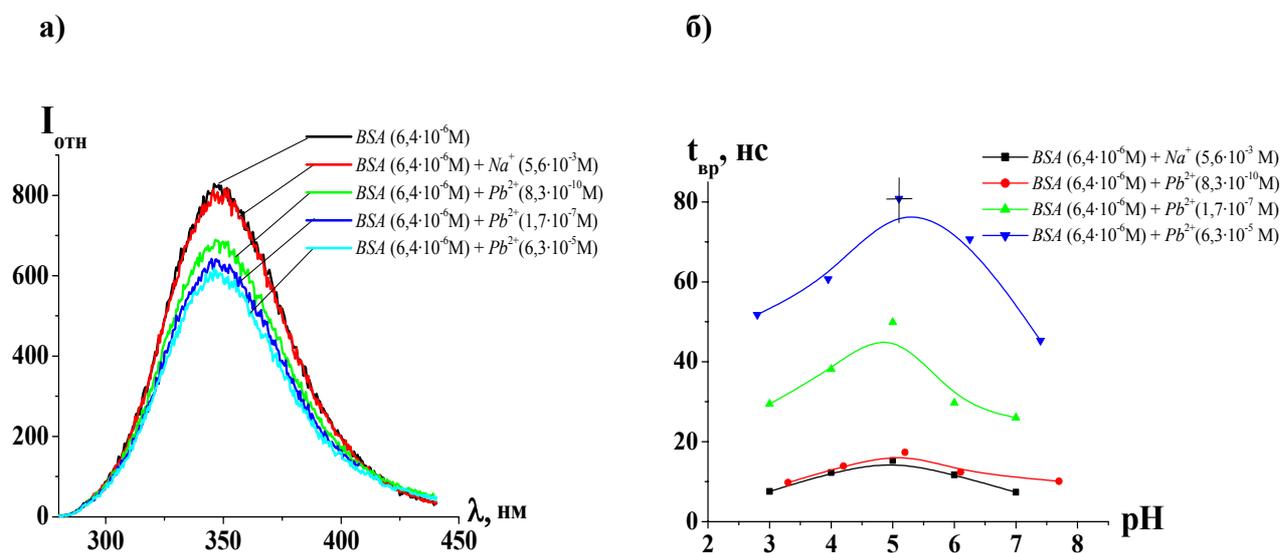


Рис. 7 а) Интенсивность флуоресценции в растворах *BSA* ($pH 7$) при добавлении ионов металлов при возбуждении на 270нм; **б)** Зависимость от pH времени корреляции вращательной подвижности частиц в растворах *BSA*, содержащих ионы свинца, по сравнению с раствором *BSA* с ионами натрия.

Эффект уменьшения значения интенсивности при увеличении концентрации Pb^{2+} (Рис. 7а) можно объяснить изменением энергетических уровней флуоресценции при происходящей агрегации молекул альбумина. Явление агрегации, или кластеризации, также подтверждают концентрационные зависимости $\tau_{вр}(pH)$ (Рис. 7б). Времена корреляции вращательной подвижности частиц в растворах альбумина при добавлении ионов свинца увеличиваются почти на порядок по сравнению с соответствующим значением $\tau_{вр}$ гидратированного белка в растворе с ионами натрия.

На Рис. 8а приведен расчетный график зависимости отношения масс наночастиц к массе молекулы альбумина от логарифма отношения молярных концентраций белка и ацетата свинца при pH 5.

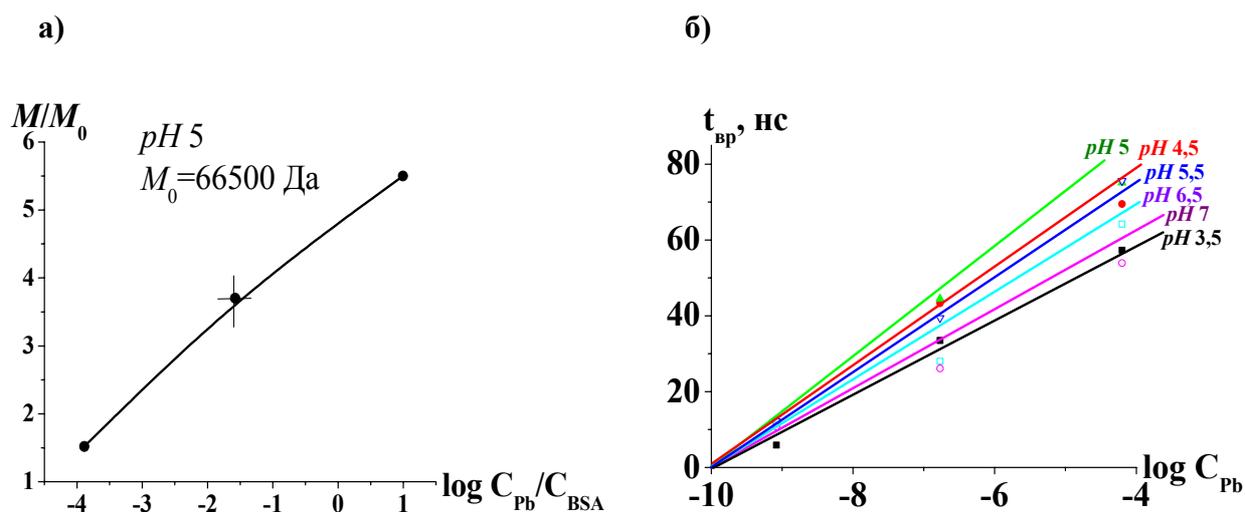


Рис. 8 а) Зависимость $\frac{M}{M_0}$ от $\log \frac{C_{Pb}}{C_{BSA}}$, рассчитанная из параметров флуоресценции водных растворов *BSA* + ацетат *Pb*; б) Зависимость τ_{rot} от $\log C_{Pb}$ в растворах *BSA* с ацетатом свинца при разных pH .

Из графика (Рис. 8а) видно, что отношение $\frac{M}{M_0}$ растет при увеличении относительной концентрации свинца в растворах. На Рис. 8б показана зависимость времен корреляции вращательной подвижности частиц в растворах белка с ацетатом свинца от логарифма концентрации свинца для

различных значений pH . Наибольшее время корреляции наблюдается при pH 5, т.е. в области изоэлектрической точки белка.

В §6 четвертой главы приведены данные по исследованию растворов сыворотки крови. Оказалось, что флуоресценция сыворотки обусловлена в основном флуоресценцией триптофана: максимумы флуоресцентных спектров наблюдались в области 350 нм. Интенсивность в максимуме спектров зависела от объемного содержания сыворотки в приготовленных растворах. Интегральные значения времен корреляции вращательной подвижности белков, содержащихся в сыворотке крови, для онкологических больных не зависят от pH , что можно объяснить возможной потерей белками транспортной функции при подобных заболеваниях.

Пятая глава посвящена обсуждению полученных экспериментальных результатов (§§1-3), а также обзору экспериментальных данных, полученных независимо с помощью других оптических методов (§4).

В §1 приведен сравнительный обзор экспериментальных данных по исследованию растворов на разных экспериментальных установках: фирменных спектрофлуориметрах «Хитачи» и «Перкин-Элмер» и на установке с Ar -лазером. Выяснилось, что данные измерений на разных экспериментальных установках хорошо соотносятся между собой и дополняют друг друга.

В §2 проведен сравнительный анализ времен вращательной подвижности и масс частиц в растворах BCA с токсичными ионами по сравнению с теоретически рассчитанными для молекул BCA в водном окружении. В растворах BCA + соль Cd^{2+} по Рис.2, в соответствии с (2) оценены $\tau_{вр}$ и M частиц. Оказалось, что массы частиц в растворах BCA ($C_{BCA}=5,6 \cdot 10^{-6}M$) + $CdSO_4$ ($C_{Cd}=3,3 \cdot 10^{-3}M$) увеличиваются в 6 раз по сравнению с массами молекул BCA . Массы частиц в растворах BCA + ацетат Pb ($\frac{C_{Pb}}{C_{BCA}}=1,3 \div 4,9$) возрастают в 3 раза по сравнению с массой молекулы BCA . Массы частиц в растворах BCA ($C_{BCA}=7,5 \cdot 10^{-7} \div 9,0 \cdot 10^{-6}M$) + хелат Eu

($C_{Eu-ЭДТА} = 2,9 \cdot 10^{-5} \div 4,9 \cdot 10^{-5} M$) примерно в 8 раз больше, чем масса молекулы *БСА*.

В §3 проведен расчет сорбции красителя на поверхности альбумина по теории Ленгмюра для некоторых исследованных систем растворов.

§4 содержит экспериментальные зависимости радиусов и масс частиц в растворах *БСА*+хелат *Eu*, полученные методами интегрального рассеяния света и корреляционной спектроскопии.

Согласно теории Дебая, для разбавленных растворов макромолекул можно написать следующее вириальное разложение по концентрации c :

$$\frac{cHK}{R_{90}} = \frac{1}{M}(1 + 2VMc + \dots), \text{ где величина } H \text{ определяется формулой: } H = \frac{2\pi^2 n_0^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}{\lambda^4 N_A},$$

K – фактор Кабана, n_0 — показатель преломления растворителя, $\frac{dn}{dc}$ —

инкремент показателя преломления раствора, λ — длина волны возбуждения

лазера, $R_{90} = \frac{2\pi^2 c n_0^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}{\lambda^4 N_A \frac{1}{RT} \frac{\partial \Pi}{\partial c}}$, Π – осмотическое давление раствора. Из этого

уравнения можно определить массу макромолекулы M и коэффициент межмолекулярного взаимодействия B .

Динамическое рассеяние света связано также как и статическое рассеяние с флуктуациями концентрации рассеивающих частиц. Для растворов макромолекул корреляционная функция $G(t)$, описывающая молекулярное движение, связана с коэффициентом трансляционной диффузии D_t : $G(t) = G_0 \exp(-D_t k^2 t)$, k — волновой вектор, $D_t = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$, R_h — гидродинамический радиус.

На **Рис. 9** показана зависимость массы рассеивающих частиц от pH для раствора *БСА*, содержащего хелат *Eu*.

Значения гидродинамических радиусов частиц в растворах *БСА* при добавлении хелата *Eu*, полученные с помощью метода корреляции фотонов,

возрастают примерно в 2 раза по сравнению с радиусом молекул *БСА* в воде.

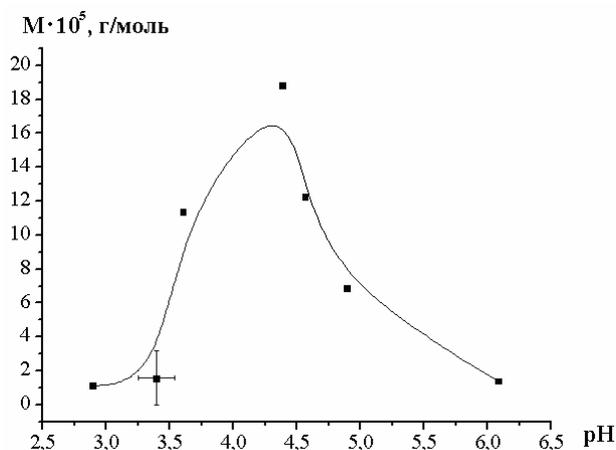


Рис. 9 Зависимость массы рассеивающих частиц от заряда на белке в растворах *БСА*, содержащих хелат *Eu* ($C_{\text{БСА}} = 9,6 \cdot 10^{-7} \text{M}$, $C_{\text{Eu-ЭДТА}} = 9,5 \cdot 10^{-7} \text{M}$).

Методами светорассеяния и корреляционной спектроскопии подтверждено увеличение средних гидродинамических радиусов частиц в растворах *БСА*, содержащих комплексон *Eu*, а также зависимость роста массы наночастиц от *pH* раствора с максимумом в изоэлектрической точке белка.

В *заключении* подведены основные итоги диссертационной работы и сформулированы выводы.

ВЫВОДЫ

1. Исследования флуоресценции красителей флуоресцеина, *TNS* и *DSY* в растворах *БСА* с ионами токсичных металлов Pb^{2+} и Cd^{2+} показали, что интенсивность флуоресценции в области малых концентраций линейно растёт с ростом концентрации тяжелых ионов. Степень поляризации флуоресценции красителей и времена корреляции вращательной подвижности частиц в растворах *БСА*, содержащих ионы металлов Pb^{2+} и Cd^{2+} , увеличиваются.
2. Времена корреляции вращательной подвижности и рассчитанные массы частиц в растворах *БСА*, содержащих ионы Cd^{2+} и Pb^{2+} , возрастают примерно на порядок по сравнению со временами корреляции вращательной подвижности молекул белка в водном растворе и в растворе, содержащем ионы Na^+ , что согласуется с данными полученными методом светорассеяния.
3. Обнаружено, что добавление хелата Eu^{3+} в растворы *БСА* смещает максимум флуоресцентного спектра в более коротковолновую область, что свидетельствует о взаимодействии молекул хелата с поверхностными группами альбумина.
4. Обнаружено образование наночастиц — белковых кластеров в растворах *БСА*, содержащих хелат европия. Времена корреляции вращательной подвижности в этом случае примерно на порядок больше, чем для молекул альбумина в водном растворе, что также подтверждено с помощью метода светорассеяния.
5. Показано, что предложенная методика позволяет определять ничтожно малые концентрации токсичных ионов в растворах ($\sim 10^{-10}M$), что возможно использовать для экологического мониторинга.
6. Эффективные (суммарные) времена корреляции вращательной подвижности частиц в растворах сыворотки крови онкологических больных не зависят от рН, что возможно связано с потерей заряда белками в случае онкологических заболеваний.

Результаты диссертационной работы изложены в следующих публикациях:

Статьи:

1. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Рыжиков Б.Д., Акимов В.А., Сокол Н.В., Образование дипольных кластеров в растворах альбумина, содержащих ионы кадмия и комплексоны хелата европия // Вестник МГУ. — 2003. **3**, 5. — С. 32.
2. Petrova G. P., Petrusevich Y. M., Sokol N. V., Ten D. I., Protein Aggregation Processes in Solutions Containing Heavy Metal and Chelate Ions: Studying by Laser Light Scattering and Polarized Fluorescence Methods // SPIE, ALT'03. — 2003. Vol. 5, No 30, 5486-7. — P. 43.
3. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Сокол Н.В. и др. Структурные фазовые переходы в растворах белков, содержащих ионы легких и тяжелых металлов. — М., 2005. — (Препринт / физ. ф-т МГУ, №2).
4. Петрова Г.П., Сокол Н.В., Флуоресценция растворов альбумина, содержащих ионы Pb^{2+} и Cd^{2+} // Вестник МГУ. — 2006. **3** (в печати).

Тезисы докладов:

1. Petrova G.P., Petrusevich Yu.M., Sokol N.V., Ten D.I., Protein aggregation processes in solutions in presence of heavy metals and chelate ions studied by laser light scattering and polarized fluorescence // ALT'03 Biomedical Optics, Proc. of SPIE. — Bellingham: WA, 2004. Vol. 5486. — P. 43.
2. Сокол Н.В., Исследование белковых растворов, содержащих тяжелые ионы, методом поляризованной флуоресценции // Межд. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых по фунда. наукам Ломоносов 2004, секция физика. — М.: физ. ф-т МГУ, 2004. — С. 210.
3. Сокол Н.В., Взаимодействие ионов кадмия и хелата европия с сывороточным альбумином в водных растворах // Экологическая физика. — М.: физ. ф-т МГУ, 2004. — С. 123.

4. Petrova G. P., Petrusevich Yu. M., Garkusha E.V., Pleshkova M.S., Sokol N.V., Rizhikov B. D., Ten D. I., Zhukov P. G., Formation and destruction of dipole nanostructures in proteins water solutions contained heavy metal ions in free and chelate forms. Diagnostics by polarized fluorescence and photon-correlation spectroscopy // digest book of ICONO/LAT 2005. — St. Pb, 2005. — IThG 5. — P. 52.
5. Petrova G.P., Petrusevich Yu.M., Rizhikov B.D., Sokol N.V., Spectra and polarized fluorescence of water albumin solutions containing plumbum ions and europium chelate ions // digest book of ICONO/LAT 2005. — St. Pb, 2005. — IFO 17. — P. 98.
6. Сокол Н.В. Спектры и поляризованная водных растворов сывороточного альбумина, содержащих ионы свинца; и хелата европия // Межд. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых по физ. наукам Ломоносов 2005. — М.: физ. ф-т МГУ, 2005. — С. 192.
7. Сокол Н.В., Флуоресценция белков сыворотки крови в растворах, содержащих комплексон (хелат европия) и ионы свинца // сб.тез. II Евразийского конгресса по медицинской физике и инженерии, Москва, 21-24 июня 2005. — М.: Асс. мед. физ. Рос., 2005. — С. 195.
8. Сокол Н.В. Флуоресценция альбумина в растворах в присутствии хелата европия и ионов свинца // сб.тез. Конф. молодых ученых в рамках всемирного дня физики в МГУ, сентябрь 2005. — М.: физ.ф-т МГУ, 2005.
9. Saha A., Manglass L., Lionel S., Sklyarov A., Sokol N., Petrussevich Y., Petrova G., Yakovlev V., Optical spectroscopy of human blood serum albumin interaction with lead ions // Photonics West. Optical Diagnostics and Sensing VI, Proc. of SPIE. — Bellingham: WA, 2006. Vol. 6094. — P. 68.