

УДК: 539.12, 535.372

Флуоресценция молекулярного зонда и его диффузия в биологической жидкости

В. С. Маряхина, В. В. Гуньков

Оренбургский государственный университет.
Россия, 460018, г. Оренбург, пр. Победы, 13

E-mail: valemar@mail.ru

Получено 6 марта 2012 г.

В статье представлены результаты теоретических исследований диффузии молекулярного зонда в биологической жидкости и её влияние на спектры флуоресценции. Рассматривается случай с введением вещества в биологическую жидкость на примере инъекции. Показано, что смещение спектра флуоресценции введенного зонда относительно его спектра флуоресценции в буферном растворе является результатом диффузионных процессов в биологической жидкости и иммобилизации зонда в содержащиеся в ней структуры (вещества белковой природы, различные виды клеток и прочие).

Ключевые слова: диффузия, молекулярный зонд, флуоресценция, биологическая жидкость

Fluorescence of molecular probe and its diffusion in a biological liquid

V. S. Maryakhina, V. V. Gunkov

Orenburg State University, 13 Pobedy pr., Orenburg, 460018, Russia

Abstract. – The results of theoretical researches of molecular probe diffusion as well as its impact to probe fluorescence spectra are represented in this paper. The case with compound introduction to biological liquid as an injection has been considered. Shown, fluorescence spectra shifts of injected probe is a result of diffusion processes in biological liquid as well as its immobilization to contained structures (compound of peptides nature, different cell types and others).

Keywords: diffusion, molecular probe, biological liquid, fluorescence

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2012, vol. 4, no.1, pp. 201–208 (Russian).

Работа выполнена при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (договор №14 от 12.02.2010).

1. Введение

Флуоресцентные зонды часто используются в современной медицине наряду с фотосенсибилизаторами [Тучин, 1998]. В качестве примеров можно привести флуоресцентную диагностику биотканей [Воропай и др., 2007] и фотодинамическую терапию злокачественных образований [Sokolov et al, 1996]. Эти методы основаны на селективной сорбции фотосенсибилизаторов и зондов в патологических тканях.

В то же время, биологическая ткань состоит на 90% из воды, а остальные 10% представляют собой вещества органической и неорганической природы. Поэтому во время измерения спектров флуоресценции введенного зонда в биологическую ткань или кровеносный сосуд происходит регистрация суммарного спектра, в который входит свечение от иммобилизованных и свободно диффундирующих в водной среде молекул. И определить, какая часть зонда связалась с биоструктурами, а какая находится в свободном состоянии, достаточно затруднительно.

В настоящей работе представлены результаты теоретических исследований, которые описывают связь диффузии молекулярных зондов в биологической жидкости с их спектрами флуоресценции.

2. Экспериментальные исследования

Объектом экспериментальных исследований явился эритрозин ($M = 834.2$ г/моль) – представитель класса ксантеновых красителей, которые часто используются для биомедицинских исследований [Menezes et al, 2007; Меклер, Котельников, Лихтенштейн, 1983]. Ранее [Добрецов, 1989] было показано, что эритрозин проникает в клетки, локализуясь в цитоплазме, и связывается с белками. Из-за этого его относят к классу цитоплазматических красителей.

В качестве биологической жидкости использовалась клеточная суспензия, полученная после ферментативной диссоциации ткани молочной железы мышей линии BYRB. Для этого кусочки ткани молочной железы помещались в раствор коллагеназы ($M = 105000$ г/моль) с концентрацией 0.5 мг/мл и выдерживались в течение 40 минут при 37°C [Летута и др., 2011]. К полученной клеточной суспензии добавлялся эритрозин, спектры флуоресценции которого были измерены на спектрофлуориметре SOLAR CM-2203. Длина волны возбуждения была 520 нм.

На рисунке 1 представлены спектры флуоресценции эритрозина в буферном растворе, в растворе фермента коллагеназы и в суспензии живых клеток молочной железы. Заметно, что спектры флуоресценции эритрозина, растворенного в биообъектах, смещаются в сторону длинных волн относительно спектра флуоресценции красителя в буферном растворе и происходит их уширение. Такая же закономерность наблюдалась и другими авторами [Сапезинский, Кутсенова, 1970; Меклер, Котельников, Лихтенштейн, 1983; Menezes et al, 2007]. Полученный результат может быть объяснен иммобилизацией красителя в биологические структуры. В следующем разделе этой работы описаны результаты теоретических исследований этого явления.

3. Математическая модель

Рассмотрим систему, в которой есть мгновенный источник исследуемого вещества. Вещество вводится в виде инъекции в объем биологической жидкости, которая состоит как из воды, так и содержащихся в ней биологически активных молекул, например, белков, ферментов, эритроцитов, соматических клеток и других биоструктур. Рассматриваемый молекулярный зонд может иммобилизоваться внутри таких структур и флуоресцировать внутри них. В настоящей модели будем учитывать, что между молекулами зонда и биологическими структурами есть только физические взаимодействия и полное отсутствие химических превращений. При этом взаимодействие прочное и не происходит распада образованного комплекса в течение

времени, необходимого для измерений спектров флуоресценции и выхода диффузионных процессов на стационарный режим. Поэтому такие биоструктуры для нашего зонда являются «ловушками».

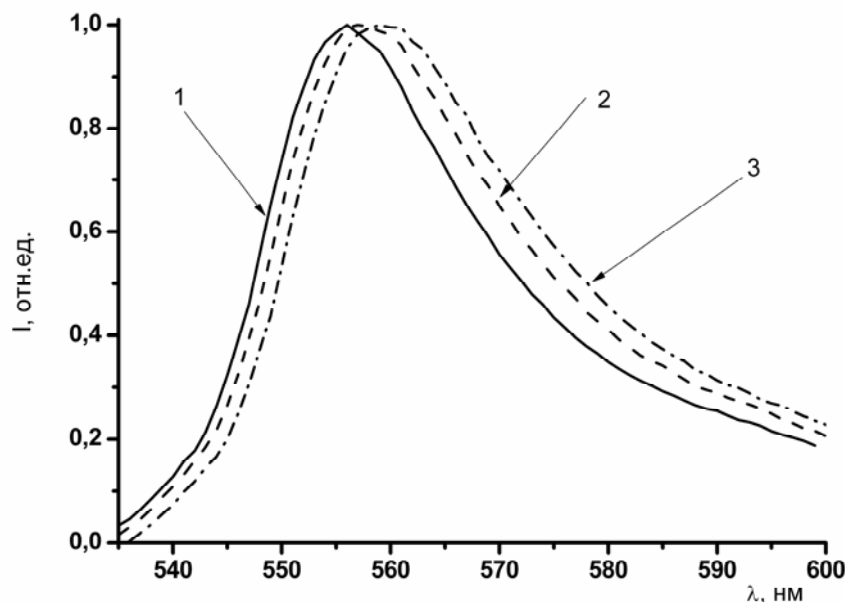


Рис. 1. Спектры флуоресценции эритрозина в буферном растворе (1), растворе коллагеназы (2) (0.5 мг/мл), суспензии клеток молочной железы (3). $C_{эп} = 10^{-5} M$

В биологической системе существует большое разнообразие таких поглощающих компонентов, их реакционная способность в основном определяется радиусом и объёмной концентрацией. Несмотря на неоднородность поверхности и формы биологических структур, предположим, что они имеют сферическую форму и локализованы равномерно по всему объёму. В этой работе будем учитывать два вида поглощающих компонентов, сильно различных между собой по диаметру и концентрации. Концентрацию первого типа биологических структур обозначим $N_1(t)$, концентрацию второго типа молекул – $N_2(t)$. При этом, будем считать, что они неподвижны. Под молекулами N_1 могут подразумеваться различные вещества белковой природы. В тоже время, биологическая система часто содержит различные виды клеток (эритроциты, лейкоциты, соматические клетки и др.), которые в этой модели учитываются функцией N_2 .

Ввиду описания процессов, происходящих в жидкой среде, можно принять коэффициент диффузии равным $10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$, что совпадает со средним по порядку величины коэффициентом диффузии для веществ в жидких средах.

В этой работе примем пространство однородным по всему объёму.

В настоящей системе будем рассматривать диффузию в объёме биологической жидкости, поэтому кинетические уравнения составлены на основе уравнения диффузии

$$\frac{dN(r,t)}{dt} = D\nabla^2 N(r,t).$$

Логично предположить, что оператор Лапласа необходимо записывать в сферических координатах. Однако ввиду однородности пространства задача представляется сферически симметричной, и концентрация зонда не зависит от углов θ и φ . Поэтому концентрация красителя будет зависеть только от радиуса r и времени t . С учетом этого предположения кинетиче-

ские уравнения выглядят следующим образом:

$$\begin{cases} \frac{\partial N(r,t)}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 N(r,t)}{\partial r^2} - \frac{2}{r} \frac{\partial N(r,t)}{\partial r} \right) - k_1 N_1(t) N(r,t) - k_2 N_2(t) N(r,t), \\ \frac{dN_1(t)}{dt} = -k_1 N_1(t) N(r,t), \\ \frac{dN_2(t)}{dt} = -k_2 N_2(t) N(r,t). \end{cases}$$

После замены переменных

$$W(r,t) = rN(r,t)$$

система уравнений принимает вид

$$\begin{cases} \frac{\partial W(r,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 W(r,t)}{\partial r^2} - k_1 N_1(t) \frac{W(r,t)}{r} - k_2 N_2(t) \frac{W(r,t)}{r}, \\ \frac{dN_1(t)}{dt} = -k_1 N_1(t) \frac{W(r,t)}{r}, \\ \frac{dN_2(t)}{dt} = -k_2 N_2(t) \frac{W(r,t)}{r}. \end{cases} \quad (3.1)$$

Предполагая, что лимитирующим процессом взаимодействия зонда с биологической жидкостью является диффузия, запишем уравнение для константы скорости [Эммануэль, 1984]

$$k_1 = \frac{2kT}{3\eta} \cdot \frac{(r_1 + r)^2}{r_1 \cdot r}$$

и

$$k_2 = \frac{2kT}{3\eta} \cdot \frac{(r + r_2)^2}{r \cdot r_2}, \quad (3.2)$$

где r_i – радиусы молекул веществ, взаимодействующих друг с другом, нм; k – постоянная Больцмана; T – температура, К; η – вязкость, Пз. Измерения проводились при температуре 298К. Вязкость клеточной суспензии была рассчитана по формуле [Freifelder, 1976], предложенной для расчёта, и составила 0.2 сПз.

4. Начальные условия

Для решения системы (3.1) необходимо знать начальные условия. Однако количество молекул коллагеназы и клеток в суспензии очень различно. При этом скорость взаимодействия их с красителем зависит от этих параметров. Поэтому для удобства будем пользоваться величиной объемной концентрации веществ в растворе (произведение количества молекул N на объём одной молекулы V_1).

Так, для эритрозина количество молекул в начальный момент времени определяется выражением $N(0) = C \cdot V \cdot N_A$. Учитывая, что рассматриваемый объём исследуемой жидкости равен 1 см^3 , $N(0) = 6 \cdot 10^{15} \text{ см}^{-3}$. Величину объёма одной молекулы эритрозина можно вычислить по формуле

$$V^1 = \frac{4}{3} \pi \cdot R^3, \quad (4.1)$$

где $R = \sqrt[3]{\frac{3 \cdot M}{4 \cdot \rho \cdot \pi \cdot N_A}}$ – радиус молекулы, м.

Плотность сухого эритрозина – 0.98 г/л, следовательно, $V^1 = 1.4 \cdot 10^{-24} \text{ см}^3$. А значит, величина объёмной концентрации для эритрозина равна

$$N^1 V^1 = 6 \cdot 10^{15} \cdot 1.4 \cdot 10^{-24} = 8.4 \cdot 10^{-9} \text{ м}^3.$$

Количество молекул фермента можно вычислить по формуле $N_1 = C \cdot N_A / M$. Таким образом, $N_1(0) = 1.5 \cdot 10^{15} \text{ см}^{-3}$. Размер молекулы фермента примем равным 40 нм, т.к. это средняя величина для такого класса веществ [Metsler, 1977]. Поэтому объёмная концентрация колагеназы в исследуемой системе составит

$$N_1^1 V_1^1 = 1.5 \cdot 10^{15} \cdot 2.6 \cdot 10^{-22} = 3.9 \cdot 10^{-7} \text{ м}^3.$$

Концентрация клеток в суспензии была экспериментально измерена с помощью камеры Горяева и составила $1 \cdot 10^5 \text{ см}^{-3}$. Радиус клетки был измерен с помощью микроскопа Micros MSD 500 и составил 25 мкм. После вычисления объёма одной клетки по формуле (4.1) получим объёмную концентрацию клеток

$$N_2^1 V_2^1 = 10^5 \cdot 6.5 \cdot 10^{-14} = 6.5 \cdot 10^{-9} \text{ м}^3.$$

Отметим, что физический смысл произведения NV – это объём каждого типа молекул в 1 см^3 суспензии. Если эти величины разделить на объёмную концентрацию эритрозина, то получим относительные объёмные концентрации компонентов с размерностью см^{-3} . Поэтому начальные условия для системы уравнений (2) составили $N(0) = 1 \cdot \delta(r) \text{ см}^{-3}$, $N_1(0) = 46.4 \text{ см}^{-3}$, $N_2(0) = 0.77 \text{ см}^{-3}$, где $\delta(r)$ – дельта-функция, учитывающая наличие мгновенного точечного источника в исследуемой системе.

Неоднородное распределение красителя по радиусу позволяет сделать граничное условие второго рода $W_r'(r=0, t) = 0$.

5. Результаты и их обсуждение

В результате диффузии вещества происходит его перераспределение по всему объёму жидкости. Интегрирование функции $W(r, t)$ позволяет получить значение приведенной концентрации в каждый момент времени

$$N(t) = \int_0^{+\infty} \frac{W(r, t)}{r} dr. \quad (5.1)$$

Изменение приведенной концентрации зонда в свободном и связанном состоянии изображено на рисунке 2. Кривые имеют плавный характер, без перегибов. Состояние диффузного равновесия наступает приблизительно через 10–12 минут. С увеличением расстояния от источника инъекции концентрация введенного вещества уменьшается и выходит на стационарный уровень.

Рассчитанные по уравнению (5.1) концентрации $N_i(t)$ позволяют связать количество иммобилизованного зонда с изменением спектров флуоресценции во времени. Для этого брали экспериментально полученные спектры люминесценции зонда в фосфатном буферном растворе (рН = 7.4) и раствора содержащего поглощающие компоненты первого и второго типов (рис. 1). Расчёт динамики спектров производили по формуле

$$S(\lambda) = S_1(\lambda)N_1(t) + S_2(\lambda)N_2(t) + S_3(\lambda)N(t), \quad (5.2)$$

где λ – длина волны, нм; $S(\lambda)$ – итоговый спектр флуоресценции зонда в исследуемой биологической системе; $S_1(\lambda)$, $S_2(\lambda)$, $S_3(\lambda)$ – спектры флуоресценции зонда в растворе, содержащем поглощающие компоненты первого и второго типов, и в буферном растворе соответственно.

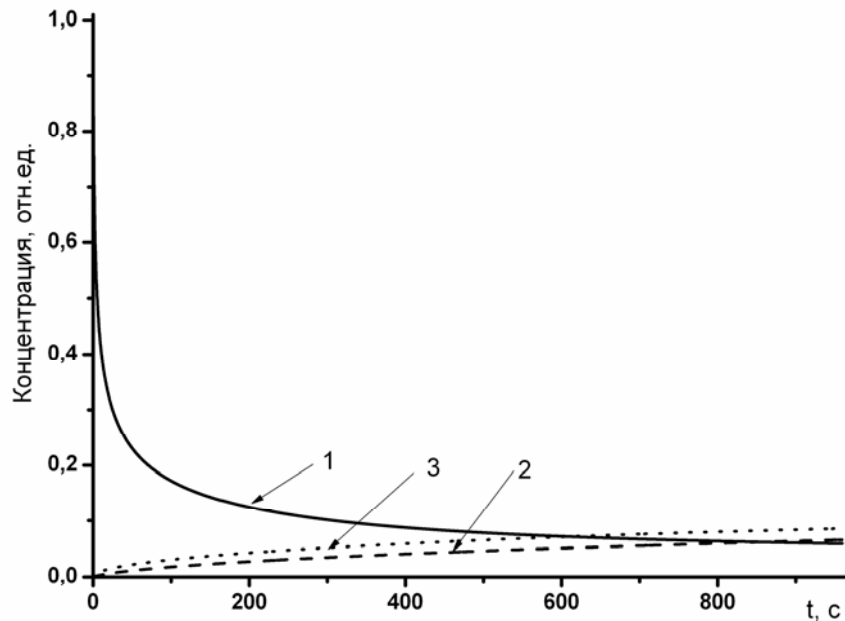


Рис. 2. Изменения приведённой концентрации введенного реагента в виде инъекции в свободном состоянии от времени в пространстве

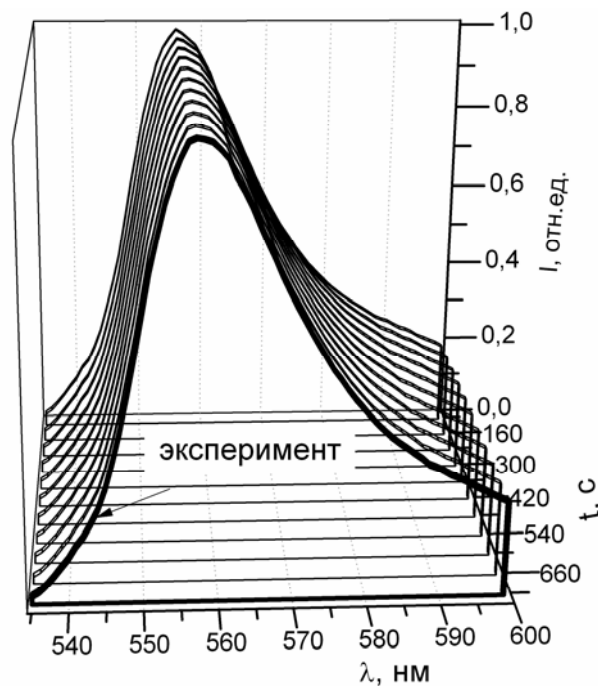


Рис. 3. Изменение нормированных спектров флуоресценции эритрозина в зависимости от времени его диффузии

Однако полученная клеточная суспензия содержала некоторое количество раствора коллагеназы. Поэтому последний спектр (с клетками молочной железы) будем рассматривать как итоговый и сравнивать его с теоретически полученным спектром $S(\lambda)$.

Изменение результирующего спектра флуоресценции эритрозина от времени представлено на рисунке 3. Для сравнения на том же рисунке показан спектр флуоресценции эритрозина в клеточной суспензии, полученный экспериментально (рис. 3). Вычисления спектров по форму-

ле (5.2) в каждый момент времени показали отличную аппроксимацию экспериментального спектра. Стоит также отметить, что с течением времени происходит смещение максимума спектра флуоресценции относительно спектра флуоресценции для эритрозина в буферном растворе. Эта закономерность наблюдается и в спектрах, полученных экспериментально (рис. 1).

6. Заключение

В работе показана связь между диффузионными процессами введенного в биологическую жидкость зонда в виде инъекции и его спектрами флуоресценции. Наилучшая аппроксимация экспериментальных спектров достигается использованием модели, составленной на основе уравнения диффузии с учетом процессов иммобилизации зонда в биоструктуры. Как показано в этой работе, лимитирующим фактором во время взаимодействия зонда с биологической жидкостью является его диффузия по объему биологической жидкости. Поэтому спектральные измерения наиболее целесообразно проводить спустя не менее 10 минут после инъекции для установления диффузного равновесия.

Поскольку окрашивание биоструктур фотосенсибилизаторами приводит к смещению спектров поглощения [Тахчиди и др., 2005], полученные результаты могут быть использованы во флуоресцентной диагностике клеток и биотканей, введением лекарств, во время проведения экспериментальных исследований и интерпретации полученных данных.

Список литературы

- Воропай Е. С., Самцов М. П., Каплевский К. Н., Мельников Д. Г., Ляшенко Л. С. Фотодинамическая лазерная терапия и диагностика областей локализации опухолей на основе новых типов фотосенсибилизаторов // *Известия РАН. Серия физическая.* – 2007. – Т. 71, № 1. – С. 145–149.
- Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. – М.: Наука, 1989. – 277 с.
- Летуца С. Н., Маряхина В. С., Пашкевич С. Н., Рахматуллин Р. Р. Длительная люминесценция органических красителей в клетках биологических тканей // *Оптика и спектроскопия.* – 2011. – Т. 110, № 1. – С. 72–75.
- Меклер В. М., Котельников А. Н., Лихтенштейн Г. Н. Применение зондов, испускающих аннигиляционную замедленную флуоресценцию для исследования модельных и биологических мембран // *Биофизика.* – 1983. – Т. 28. – С. 503–504.
- Меклер В. М., Котельников А. И., Лихтенштейн Г. И., Беркович М. А. Применение флуоресцентных зондов для исследования модельных и биологических мембран // *Биофизика.* – 1982. – Т. 27. – С. 641–645.
- Сапежинский И. Н., Куценова А. В. Об усилении ксантоновыми красителями фотохемилюминесценции растворов сывороточного альбумина // *Биофизика.* – 1970. – Т. 15. – Вып. 3. – С. 531–534.
- Тахчиди Х. П., Белый Ю. А., Терещенко А. В., Семенов А. Д., Каплан М. А., Володин П. Л., Румянцев Д. С., Пономарев Г. В., Баум Р. Ф. Фотодинамическая терапия в офтальмологии (обзор) // *Офтальмохирургия.* – 2005. – № 1. – С. 45–51.
- Тучин В. В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1998. – 394 с.
- Freifelder D. *Physical biochemistry. Application to biochemistry and molecular biology.* Freeman: San Francisco, 1976.
- Menezes P. F. C., Bernal C., Imasato H., Bagnato V. S., Perussi J. R. Photodynamic activity of different dyes // *Laser physics.* – 2007. – V. 17, № 4. – P. 468–471.

- Metsler D. E.* Biochemistry. Chemical reaction of living cells. Academic press, New York, 1977.
- Sokolov V. V., Chissoy V. I., Trakhtenberg A. K., Mamontov A. S., Frank G. A., Filonenko E. V., Telingina L. V., Gladunov V. K., Belous T. A., Aristarkhova E. I., Zharkova N. N., Smirnov V. V., Kozlov D. N.* Endoscopic fluorescent diagnostics and PDT of early malignancies of lung and esophagus // *Proc. SPIE.* – 1996. – V. 2728. – P. 39–47.