

Фотоиндуцированное усиление флуоресценции красителя эванса синего в водном растворе альбумина*

© А.А. Намыкин¹, А.П. Хороводов¹, О.В. Семячкина-Глушковская¹, В.В. Тучин^{1,2,3}, И.В. Федосов¹

¹ Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, 410012 Саратов, Россия

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, 634050 Томск, Россия

³ Институт проблем точной механики и управления РАН, 410028 Саратов, Россия

e-mail: anton-namikin@bk.ru

Поступила в редакцию 23.11.2018 г.

В окончательной редакции 26.01.19 г.

Принята к публикации 31.01.2019 г.

Рассмотрен эффект фотоиндуцированного усиления флуоресценции красителя эванс синий (ЕВ) в плазме крови и растворе альбумина. Сравнены проявления эффекта усиления флуоресценции красителя в растворе альбумина и в плазме крови крысы. Впервые обнаружено насыщение фотоиндуцированной флуоресценции, эффект запаздывания усиленной флуоресценции и расхождения в спектрах флуоресценции растворов. На основе полученных результатов предложена гипотеза о присутствии не флуоресцирующих комплексов с участием ЕВ в плазме крови.

DOI: 10.21883/OS.2019.05.47664.13-19

Введение

Эванс синий (Evans Blue dye, ЕВ) является тетраантрий диазо-органической солью с молекулярной массой 960.8 а.е. [1]. Не флуоресцирует в водных растворах, слабая флуоресценция наблюдается в спиртовых растворах. Имеет сродство к белкам и образует в плазме крови флуоресцентные комплексы с альбумином и глобулином [2]. Флуоресценция комплексов эванса синего и белков наблюдается на длине волны 680 nm для длины волны возбуждения 620 nm. При попадании в организм ЕВ не нарушает циркуляционные процессы, не проникает в мембраны живых клеток [3]. Имеет долгое время выведения, фотообесцвечивание экспериментально не наблюдается [4]. Эванс синий используется для изучения целостности мембран [5] и исследования проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) при различных патологиях [6–11].

Азокрасители являются классом цветных органических соединений, которые используются как красители и пигменты. Особенностью данного класса соединений является наличие одной или нескольких азогрупп $-N=N-$, связывающих ароматические или гетероароматические остатки, соединяющиеся друг с другом или с остатками соединений, имеющих активные CH_2 -группы. За счет вращения молекулярных групп вокруг центральной связи происходит *цис-транс*-изомеризация молекул.

* The 22nd Annual Conference Saratov Fall Meeting 2018 (SFM'18): VI International Symposium „Optics and Biophotonics“ and XXII International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics, September 24–29, 2018, Saratov, Russia. <https://www.sgu.ru/structure/fiz/saratov-fall-meeting/previous-conferences/sara>

Впервые эффект *цис-транс*-изомеризации был обнаружен у молекул азобензола и его производных [12]. Обычно молекулы азобензола находятся в *транс*-форме, а при воздействии света могут быть преобразованы в *цис*-форму. Реакция фотохимического *цис-транс*-преобразования является обратимой, скорость восстановления изомеризации напрямую зависит от агрегатного состояния вещества, твердое вещество сохраняет изомеризацию длительное время даже при фотовоздействии. Позже были синтезированы флуоресцентные красители на основе азокрасителей, а также обнаружено, что флуоресценция в *цис*-состоянии более эффективна, чем в *транс*-состоянии. Как следствие изомеризации, наблюдалась усиленная люминесценция, объясненная непланарной геометрией *цис*-изомера молекулы. На данный момент сообщалось о наблюдении данного эффекта в тонких пленках [13], растворах и полимерных матрицах [14].

В работе [15] нами был обнаружен эффект фотоиндуцированного усиления флуоресценции ЕВ в растворе плазмы крови при предварительном воздействии интенсивным лазерным излучением ($2 \cdot 10^5$ W/cm²) с длиной волны 635 nm или 405 nm, интенсивность флуоресценции увеличивается на 50% [15]. При этом воздействие фиолетового лазера приводило к более слабому проявлению эффекта. Было установлено, что время жизни фотоиндуцированного усиления флуоресценции составляет около 1 s. В работе [15] нами использовались два одинаковых полупроводниковых лазера с длиной волны 635 nm, излучение одного из которых, „пишущего“ лазера, было сфокусировано в тонкую линию поперек кровеносного сосуда и использовалось для локального усиления флуоресценции путем предварительного облучения

плазмы крови с введенным в нее красителем. Излучение второго лазера, так называемого „считывающего“, было расфокусировано так, чтобы обеспечить равномерное освещение поля зрения микроскопа. „Считывающий“ лазер был синхронизирован с камерой микроскопа и использовался для возбуждения флуоресценции красителя.

Исследование эффекта усиления интенсивности флуоресценции при различной мощности „пишущего“ и „считывающего“ лазеров выявило слабую зависимость интенсивности от мощности „считывающего“ лазера.

Мы продемонстрировали применение эффекта для прижизненного измерения методом флуоресцентной молекулярной метки скорости кровотока в капиллярах и сосудах различного диаметра. Данные, полученные в ходе работы, позволили сделать вывод, что эффект фотоиндуцированной флуоресценции связан с *цис-транс*-изомеризацией молекул ЕВ в связанном состоянии с белками альбумина. Мы впервые наблюдали возможность фотоиндуцированного усиления флуоресценции в растворах плазмы крови, а также в составе цельной крови прижизненно.

Исследования сродства ЕВ в плазме крови проводились с различными фракциями белков, выделенных из плазмы крови человека, после осаждения несвязанного красителя; считалось количество связанного с белком красителя при помощи фотоэлектрического колориметра. Было выявлено, что в плазме крови ЕВ образует комплексы с белками альбумина и глобулина [2]. В настоящей работе мы исследовали и сопоставили проявление эффекта в водном растворе альбумина и в плазме крови при одинаковых условиях. Наше исследование позволило провести качественную оценку проявления эффекта в условиях отсутствия прочих белков плазмы крови и непосредственно в плазме крови *in vitro*. Проведено спектральное исследование флуоресценции растворов ЕВ плазмы крови и альбумина, и установлено расхождение спектров флуоресценции в длинноволновой области. Обнаружен эффект насыщения и запаздывания усиленной флуоресценции.

1. Материалы и методы

1.1. Экспериментальная установка

Для наблюдения флуоресценции комплексов ЕВ + альбумин и изучения эффекта увеличения интенсивности флуоресцентного сигнала был разработан флуоресцентный микроскоп (рис. 1). Оптическая система микроскопа состоит из объектива с числовой апертурой 0.30 (тубус „бесконечность“, фокусное расстояние 13.89 mm) и тубусной линзы с фокусным расстоянием 150 mm (LA1433, Thorlabs Inc, США). Регистрация сигнала производилась с помощью CMOS-камеры (асA1920-40uc, Basler AG, Германия). Разрешение камеры составляет 1920×1200 пикселей и максимальная частота кадров 41 fps в режиме полнокадровой съемки. Масштаб изображения составлял

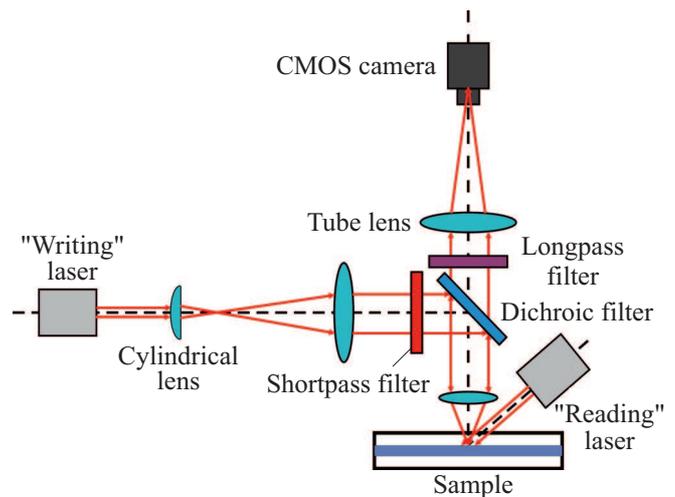


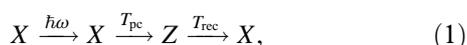
Рис. 1. Экспериментальная установка.

$0.5 \mu\text{m}$ в плоскости предмета на один пиксель. Раствор красителя вводился в цилиндрическую стеклянную капиллярную трубочку с наружным диаметром $700 \mu\text{m}$ и внутренним диаметром $100 \mu\text{m}$. Лазерный диодный модуль (50000463, Laserlands.net, Китай), с выходной мощностью 160 mW и длиной волны 635 nm использовался для возбуждения флуоресценции красителя, т.е. в качестве „считывающего“ источника света. Коллимированный пучок лазерного модуля направлялся в предметную плоскость микроскопа под углом 45° относительно оптической оси микроскопа. Диаметр пучка 3 mm обеспечивал квазиравномерное освещение в пределах поля зрения микроскопа размером $0.8 \times 0.6 \text{ mm}$. Чтобы уменьшить облучение образца, лазер был синхронизирован с триггером камеры и включался только в период регистрации изображения. Плотность мощности „считывающего“ лазера в предметной плоскости микроскопа составляла 0.8 W/cm^2 . Для наблюдения флуоресценции использовался набор флуоресцентных фильтров (49019-ET-Cy5 Longpass, Chroma Technology Corp., США). Второй лазерный диодный модуль, идентичный „считывающему“ (50000463, Laserlands.net, Китай), с выходной мощностью 160 mW и длиной волны 638 nm использовался в качестве „пишущего“ источника света для фотоиндуцированного усиления флуоресценции молекул ЕВ. „Пишущий“ лазер с его оптической системой был установлен в порт осветителя микроскопа. Его излучение фокусировалось цилиндрической линзой ($f' = 70 \text{ mm}$) и сферической линзой $f' = 75 \text{ mm}$ (Thorlabs, LA1608-A) в линию, оптически сопряженную с предметной плоскостью микроскопа. Затем излучение лазера проходило через фильтр возбуждения и направлялось в зрачок объектива микроскопа при помощи дихроичного зеркала. Линия, проецируемая „пишущим лазером“ в предметную плоскость микроскопа, имела размер $200 \times 3 \mu\text{m}$ по уровню падения интенсивности в e раз. Капиллярная

трубочка располагалась на предметном столе микроскопа таким образом, чтобы ее ось пересекала спроецированную линию приблизительно посередине и под прямым углом. Средняя плотность мощности излучения „пишущего“ лазера в предметной плоскости микроскопа составляла $2.05 \cdot 10^5 \text{ W/cm}^2$. Измерение производилось с помощью измерителя мощности (Optical power meter Model 1815-C, Newport Corp. USA).

1.2. Модель наблюдаемых процессов

Модель наблюдаемых процессов можно представить в виде последовательности четырех трансформаций:



где X — молекула ЕВ, находящаяся в *транс*-изомерном состоянии, при поглощении фотона с некоторой вероятностью $P(\hbar\omega)$ переходит в состояние Y , при котором молекула красителя находится в *цис*-изомерном состоянии. После этого происходит переход в состояние Z и нарастание флуоресценции (эффект запаздывания усиленной флуоресценции) со временем T_{pc} (рис. 3). Далее следует спонтанная реконверсия в изначальное состояние X со временем T_{rec} . Характерные значения параметров модели приведены в таблице.

1.3. Подготовка растворов красителя Evans Blue

Выделение плазмы осуществлялось из крови самца крысы линии Wistar возрастом 4 месяца. Перед забором крови в кровоток через полиэтиленовый катетер диаметром 0.58 mm (Smiths Medical International, США) в сонную артерию вводили 0.5 ml 0.1% раствора ЕВ. Раствор циркулировал в кровотоке 1 h с момента введения. Далее собирали кровь путем пункции сердца. Собранную в пробирку с антикоагулянтом кровь центрифугировали в течение 30 min при частоте вращения 2000 rpm. Отделяли плазму от форменных элементов микропипеткой в стерильную пробирку эппендорфа, таким образом, концентрация ЕВ в случае полной связи с белками плазмы и полном объеме циркулирующей крови 5.5 ml предположительно составила 0.09%. Фактическая концентрация ЕВ отличается от этого значения в меньшую сторону по причине связывания части красителя в организме. Для приготовления раствора ЕВ и альбумин смешали 1 ml 10%-раствора альбумина (Sigma Сент-Луис, Миссури, США) в физиологическом растворе с 1 ml 0.1% раствора Evans Blue (Sigma Сент-Луис, Миссури, США) в физиологическом растворе. Концентрация ЕВ в готовом растворе составляла 0.05%.

2. Результаты и обсуждение

Измерение интенсивности флуоресценции исследуемого раствора, помещенного в капиллярную трубочку,

Характерные времена нарастания флуоресценции и реконверсии

Параметр, s	Система с ЕВ	
	Альбумин+ЕВ	Плазма+ЕВ
T_{pc}	0.045	0.3
T_{rec}	1.32	2

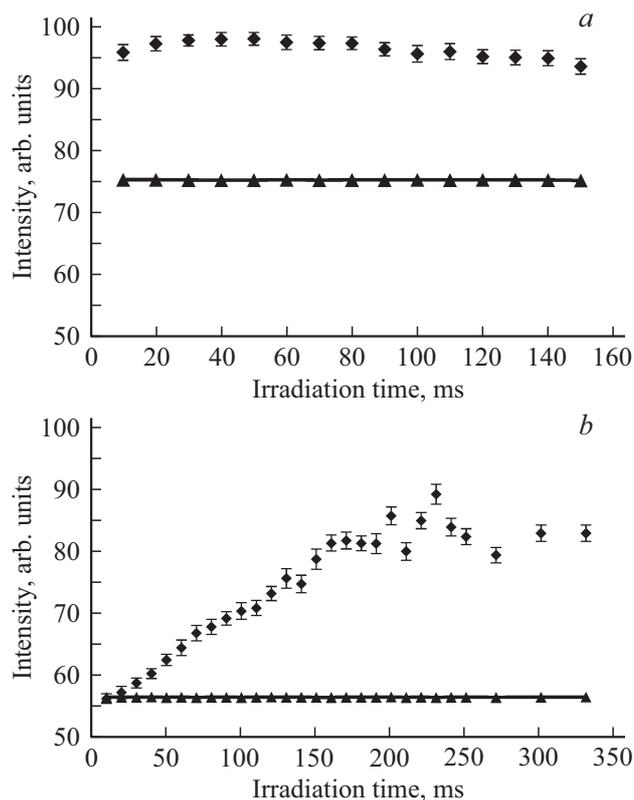


Рис. 2. Максимальные значения интенсивности флуоресценции (\blacklozenge) в зависимости от продолжительности воздействия „пишущего“ лазера; (a) для раствора ЕВ и альбумина, (b) раствор ЕВ и плазма. Треугольником (\blacktriangle) обозначена интенсивность флуоресценции области без воздействия „пишущего“ лазера.

осуществлялось при помощи камеры микроскопа. Зависимость фотоиндуцированного усиления флуоресценции от продолжительности воздействия „пишущего“ лазера исследовалась при постоянной длительности экспозиции 5 ms. Поскольку „считывающий“ лазер был синхронизирован с камерой микроскопа, длительность импульсов его излучения также составляла 5 ms.

Для измерения интенсивности флуоресценции регистрировались две серии по 100 кадров, с частотой кадров 100 fps. Первая серия регистрировалась до, а вторая после облучения раствора красителя „пишущим“ лазером. Интенсивность флуоресценции раствора, измеренная по кадрам первой серии, использовалась в качестве базового уровня флуоресценции. Максимальное значение интенсивности флуоресценции в области,

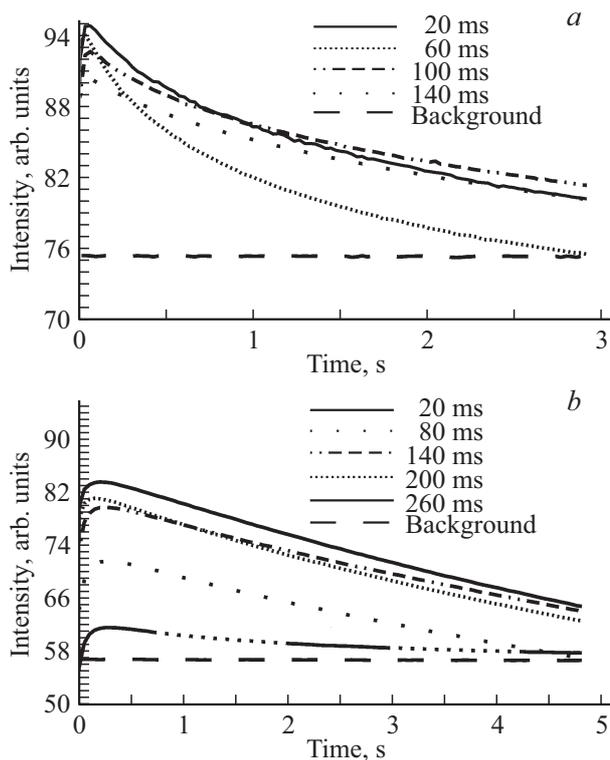


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции от времени после воздействия „пишущего“ лазера; (а) раствор альбумин и ЕВ; (b) раствор плазма и ЕВ.

облученной „пишущим“ лазером, вычислялось по кадрам второй серии. На рис. 2 представлена зависимость максимального значения флуоресценции раствора в области воздействия „пишущего“ лазера в зависимости от продолжительности воздействия (ромбы), для раствора ЕВ и альбумина (а) и для раствора ЕВ и плазмы крови (b). Базовая интенсивность флуоресценции на рис. 2 обозначена треугольниками.

В связи с конструктивными особенностями системы управления „пишущим“ лазером минимально возможная продолжительность облучения образца не могла быть менее 10 ms. Для каждой точки на рис. 2 производилась прокачка раствора на объем, соответствующий полной смене раствора в поле зрения микроскопа, чтобы исключить возможность переоблучения раствора.

Из рис. 2, а видно, что эффект не зависит от продолжительности воздействия. Это может быть объяснено насыщением фотоиндуцированного усиления флуоресценции даже при минимальной продолжительности воздействия 10 ms. Фотоиндуцированное усиление флуоресценции составляет 28% от интенсивности флуоресценции раствора до облучения его „пишущим“ лазером. Для раствора плазмы крови (рис. 2, b) наблюдается устойчивое увеличение интенсивности фотоиндуцированной флуоресценции при увеличении продолжительности воздействия в пределах от 10 ms до 150 ms. При дальнейшем увеличении продолжительности воздействия из-

лучения „пишущего“ лазера на раствор плазмы крови в пределах от 160 до 330 ms максимальный прирост интенсивности остается неизменным и составляет приблизительно 36%.

Эффект насыщения фотоиндуцированной флуоресценции раствора ЭС с плазмой крови сохраняется в пределах длительностей включения пишущего лазера до 350 ms. В случае раствора альбумина наблюдается небольшой спад интенсивности при увеличении длительности воздействия „пишущего“ лазера более 50 ms. В случае наблюдения водного раствора ЭС, свободного от белков, флуоресценция не наблюдалась, и был виден лишь шумовой сигнал от матрицы камеры порядка 2 относительных единиц.

Из рис. 3 видно, что время затухания эффекта фотоиндуцированного увеличения флуоресценции для раствора плазмы (рис. 3, b) в 1.5 раза больше, чем для раствора альбумина (рис. 3, a). Время затухания фотоиндуцированной флуоресценции до половины интенсивности от максимальной для раствора плазмы крови составило 2 s, а для раствора альбумина 1.32 s. Также из графика видно, что эффект проявляется не сразу, а лишь спустя некоторое время. Данное время запаздывания не зависит от длительности облучения „пишущего“ лазера и соответствует для плазмы крови 300 ± 10 ms, а для раствора альбумина 45 ± 15 ms.

Спектр флуоресценции раствора плазмы крови и ЕВ (рис. 4) смещен относительно спектра флуоресценции альбумина и ЕВ (рис. 4) на 17 nm в длинноволновую область. Данное изменение спектра флуоресценции можно объяснить присутствием других флуоресцирующих комплексов, таких как комплексы глобулина и ЕВ. Эффект фотоиндуцированного усиления флуоресценции ЕВ проявляется в растворах плазмы крови и альбумина. Эффект обладает свойством насыщения. В случае с использованием раствора альбумина насыщение имеет место даже при минимальных дозах воздействия, осуществимых в нашей экспериментальной установке. Для раствора ЕВ в плазме крови минимальная продолжительность облучения для проявления эффекта насыщения

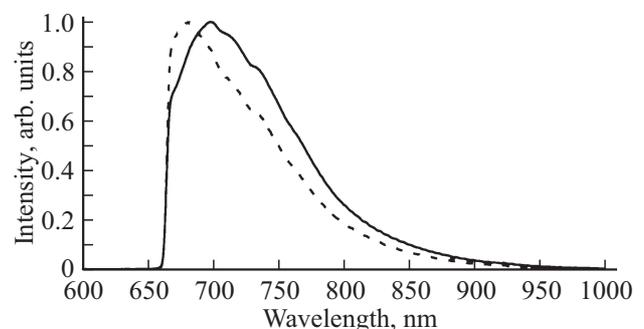


Рис. 4. Спектры флуоресценции раствора альбумина и ЕВ (штриховая линия), раствора плазма крови и ЕВ (сплошная линия). Резкая граница спектра около 660 nm обусловлена присутствием барьерного светофильтра в системе. Длина волны возбуждения 635 nm.

составила 160 ms. Данное различие можно объяснить различной концентрацией красителя ЕВ в растворах, поскольку максимальный прирост интенсивности при достижении порога насыщения в обоих случаях остается практически одинаковым относительно базового уровня флуоресценции 28% у раствора альбумина и 36% у раствора плазмы крови. Но базовый уровень интенсивности для раствора альбумина на 36% больше, чем для плазмы крови.

В ходе работы были установлены следующие экспериментальные факты:

1) Интенсивность флуоресценции возрастает по мере увеличения дозы и достигает некоторого значения насыщения, которое остается практически неизменным при дальнейшем увеличении дозы.

2) Значения этого насыщения практически совпадают и для плазмы, и для альбумина.

3) Насыщение в плазме достигается при дозе 10 раз больше, чем в альбумине.

Из первого и второго можно предположить, что концентрация светящихся комплексов примерно одинакова и в плазме, и в альбумине. Из третьего следует, что доза для комплексов в плазме в 10 раз ниже, чем в альбумине. Из этого следует, что в плазме присутствуют какие-то соединения, которые поглощают излучение лазера, и эффективная доза из-за этого оказывается в плазме в 10 раз меньше. Например, не флуоресцирующие комплексы ЕВ или свободный ЕВ. Впрочем, последнее маловероятно с учетом высокой аффинности ЕВ к белкам плазмы. Данная гипотеза требует дальнейшей экспериментальной проверки.

Время релаксации до половины от максимума интенсивности раствора альбумина составило 1.32 s и в растворе плазмы крови 2 s при одинаковых значениях времени облучения. Был обнаружен эффект запаздывания фотоиндуцированного усиления флуоресценции, ранее не описанный для данного красителя. При этом в растворе альбумина процесс занимал в восемь раз меньше времени, чем в плазме крови. Спектр флуоресценции водного раствора альбумина и ЕВ полностью соответствует ранее опубликованному в литературе спектру с максимумом на 680 nm. В данной работе нами обнаружено, что максимум спектра флуоресценции ЕВ в растворе плазмы крови наблюдается на длине волны 697 nm, то есть сдвинут на 17 nm в длинноволновую область.

Эффект фотоиндуцированного усиления флуоресценции ЕВ по своим свойствам схож с эффектом фотообесцвечивания для классических флуоресцентных красителей, который применяется для измерений скорости жидкостей и газов методом молекулярной метки (MTV). Однако ЕВ имеет ряд характерных отличий. После воздействия „пишущего“ лазера комплексы не разрушаются и поэтому могут быть повторно использованы в дальнейшем исследовании. Большая часть классических флуоресцентных красителей, таких как флуоресцеин, родамин и их производные требуют коротковолнового

возбуждения, что в случае прижизненных исследований оказывает фотоинтоксикацию на окружающие ткани. Спектр возбуждения ЕВ находится в длинноволновой области 630–640 nm, в этой части поглощения биологических тканей минимально, что позволяет увеличивать дозы и продолжительность воздействия без вреда для организма.

Заключение

В настоящей работе нами экспериментально исследовано проявление эффекта фотоиндуцированного усиления флуоресценции для растворов ЕВ с плазмой крови и альбумина. В результате нами впервые установлены эффект насыщения фотоиндуцированной флуоресценции, эффект запаздывания усиленной флуоресценции и расхождения в спектрах флуоресценции растворов. На основе полученных результатов нами предложена гипотеза о присутствии не флуоресцирующих комплексов с участием ЕВ в плазме крови.

Дальнейшее исследование эффекта фотоиндуцированного усиления флуоресценции является значимым для прикладных и фундаментальных направлений в микроскопии, цитометрии и флоуметрии. Одно из возможных направлений для развития данного эффекта является использование в качестве красителя тканей для конфокальной микроскопии, так как ЕВ не обесцвечивается, обладает высоким сродством к различным белкам, что открывает перспективу для разработки метода многоточного контроля движения молекул красителя как в кровеносном сосуде, так и в межклеточном пространстве вокруг него. Детальное изучение эффекта фотоиндуцированного усиления флуоресценции и структуры красителя, обуславливающей его проявление, может послужить ключом к разработке принципиально новых флуоресцентных маркеров, в том числе и на основе флуоресцентных белков, обладающих уникальными свойствами и устойчивых к обесцвечиванию.

Финансирование работы

Исследования поддержаны грантом РНФ № 17-75-20069, И.В. Федосов благодарит Минобрнауки РФ за поддержку в рамках проекта № 3.550.2017/6.7.

Соблюдение этических стандартов

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Список литературы

- [1] *Freedman F.B., Johnson J.A.* // *Am. J. Physiol. Content. American Physiological Society.* 1969. V. 216. N 3. P. 675.681.

- [2] *LeVeen H.H., Fishman W.H.* // Am. J. Physiol. Content. American Physiological Society. 1947. V. 151. N 1. P. 26–33.
- [3] *Gaff D.F., Okongo-ogola O.T.* // J. Exp. Bot. 1971. V. 22. N 3. P. 756–758.
- [4] *Gibson J.G., Evans W.A.* // J. Clin. Invest. 1937. V. 16. N 3. P. 301–316.
- [5] *Hamer P.W. et al.* // J. Anat. 2002. V. 200. N 1. P. 69–79.
- [6] *Jacyn Baker C., Mock N.M.* // Plant Cell. Tissue Organ Cult. 1994. V. 39. N 1. P. 7–12.
- [7] *Rogers D.F., Boschetto P., Barnes P.J.* // J. Pharmacol. Methods. 1989. V. 21. N 4. P. 309–315.
- [8] *McDonald D.M., Blewett R.W.* // J. Neurocytol. 1981. V. 10. N 4. P. 607–643.
- [9] *Patterson C.E., Rhoades R.A., Garcia J.G.* // J. Appl. Physiol. 1992. V. 72. N 3. P. 865–873.
- [10] *El'Sayed H., Goodall S.R., Hainsworth R.* // Clin. Lab. Haematol. 1995. V. 17. N 2. P. 189–194.
- [11] *Michalicova A. et al.* // J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 2017. V. 40. N 9. P. 442–448.
- [12] *Hartley G.* // Nature. 1937. V. 140. N 3537. P. 281.
- [13] *Haruta O., Matsuo Y., Jiro K.* // Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. Elsevier, 2008. V. 313. P. 595–599.
- [14] *Smitha P., Asha S.K.* // J. Phys. Chem. B. 2007. Vol. 111. N 23. P. 6364–6373.
- [15] *Namykin A.A. et al.* // J. Biophotonics. 2018. P. e201700343.