

ФЛЮОРЕСЦЕНТИН КАК ПЕРСПЕКТИВНОЕ СОЕДИНЕНИЕ ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОГО ОБНАРУЖЕНИЯ БРОМНОВАТИСТОЙ КИСЛОТЫ

Григорьева Д.В.¹, Горудко И.В.¹, Реут В.Е.¹, Панасенко О.М.², Соколов А.В.^{2,3}

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

²ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия

³ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Среди активных форм галогенов (АФГ), образующихся в реакциях с участием гемсодержащих пероксидаз (миелопероксидазы, пероксидазы эозинофилов (ЭПО)), HOCl и HOBr являются наиболее реакционно способными. К семейству пероксидаз относится также относительно недавно открытая пероксидаза – пероксидазин 1, которая катализирует образование преимущественно HOBr , необходимой для перекрестного «сшивания» коллагена IV и стабилизации базальных мембран тканей. Однако подобно другим АФГ, чрезмерное образование HOBr сопровождается повреждением тканей и развитием воспалительной реакции. Например, концентрация ЭПО в сыворотке от больных астмой, а, следовательно, и образование HOBr , в три раза выше, чем у здоровых людей. Таким образом очевидна актуальность разработки методов избирательной регистрации HOBr в биологических системах. Ранее было показано, что при бромировании флуоресцеина (Flc) образуется эозин Y, что может быть использовано для регистрации HOBr . Отметим, что Flc используется для прижизненной ангиографии, то есть не является токсичным для организма. В работе был проведен сравнительный анализ спектрально-флуоресцентных характеристик Flc при взаимодействии с АФГ с целью оценки возможности его использования для селективной регистрации HOBr .

Показано, что для Flc (5 мкМ) в фосфатно-солевом буфере (8,3 мМ Na_2HPO_4 , 1,2 мМ KH_2PO_4 , 123 мМ NaCl , 2,7 мМ KCl ; pH 7,35) характерен спектр поглощения с максимумом на 493 нм. После внесения HOBr (60-80 мкМ) поглощение при 493 нм уменьшалось с одновременным появлением интенсивного пика поглощения при 513 нм, который соответствовал окрашенному в розовый цвет эозину Y – продукту бромирования Flc. При изучении спектров поглощения Flc, проинкубированного с другими АФГ (HOCl , HOscn), было выявлено, что оптическая плотность при 493 нм снижалась после инкубации Flc только с HOCl ; в этих же образцах был выявлен сдвиг положения максимума поглощения до значения 508 нм.

С помощью более чувствительного флуоресцентного анализа было исследовано изменение флуоресцентных свойств Flc после внесения HOBr и HOCl . Для спектра флуоресценции Flc был характерен пик при 516 нм при возбуждении светом с длиной волны 501 нм. При добавлении HOBr к Flc интенсивность флуоресценции при $\lambda_{\text{возб.}}/\lambda_{\text{рег.}} = 501/516$ нм снижалась в ~30 раз, но появлялся интенсивный пик флуоресценции при длине волны 541 нм при возбуждении светом с длиной волны 520 нм. Известно, что эозин Y представляет собой флуоресцентное соединение с пиком возбуждения при 525 нм и пиком испускания при 546 нм, что согласуется с полученными нами результатами. После инкубации Flc с HOCl интенсивность флуоресценции образца при $\lambda_{\text{возб.}}/\lambda_{\text{рег.}} = 501/516$ нм снижалась, при этом появлялся пик флуоресценции при длине волны 534 нм при возбуждении светом с длиной волны 510 нм. Известно, что при хлорировании Flc образуется ряд продуктов с флуоресцентными свойствами, сходными с полученными в данной работе.

Таким образом, можно заключить, что Flc представляет собой перспективное соединение для разработки на его основе флуоресцентного метода регистрации бромирующей активности гемсодержащих пероксидаз млекопитающих.

Работа поддержана грантами Б22МВ-023 и Ф22М-042.