

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра оптики и биофотоники

**Использование метода флуоресцентных зондов для оценки
микровязкости мембран эритроцитов**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента 4 курса 4082 группы

направления 12.03.04 «Биотехнические системы и технологии»
профиль «Медицинская фотоника»
Института физики
Мазепова Андрея Алексеевича

Научный руководитель

доц. кафедры оптики и биофотоники, к.х.н.

должность, ученая степень, уч. звание



подпись, дата

А.Б. Правдин

Инициалы Фамилия

Зав. кафедрой оптики и биофотоники

проф., д.ф.-м.н., чл.-корр. РАН

должность, ученая степень, уч. звание



подпись, дата

В.В. Тучин

Инициалы Фамилия

Саратов 2026 г.

Введение

Биологические мембраны являются универсальными структурными элементами живых клеток, обеспечивающими компартментализацию, избирательный транспорт, восприятие сигналов и энергетическое сопряжение. Функциональная активность мембран определяется не только их химическим составом, но и физическим состоянием липидного бислоя, в частности его микровязкостью – параметром, характеризующим подвижность липидных молекул и, следовательно, способность мембранных белков к конформационным перестройкам. Изменение микровязкости сопровождается такими процессами, как пролиферация, дифференцировка, апоптоз клеток, а также лежит в основе патогенеза сердечно-сосудистых, онкологических и нейродегенеративных заболеваний. Особый интерес представляет исследование мембран эритроцитов – модельной системы для биофизических исследований, доступной для получения и чувствительной к различным патологическим состояниям (сахарный диабет, гипертония, гипоксия и др.).

Среди методов оценки микровязкости наиболее информативным является метод флуоресцентных зондов, позволяющий неинвазивно измерять локальные динамические свойства мембран. Два основных подхода – измерение стационарной поляризации флуоресценции (зонд 1,8-АНС (1-анилинонафталин-8-сульфонат)) и регистрация эксимерной флуоресценции (зонд пирен) – дают взаимодополняющую информацию о вращательной и латеральной подвижностях молекул зонда в мембране, определяемых величиной вязкости среды. Однако для количественной оценки величины микровязкости по измеренным параметрам поляризованной флуоресценции зонда 1,8-АНС необходима калибровка по серии растворов с известной вязкостью, например, по водно-глицериновым смесям.

Актуальность работы определяется необходимостью расширения арсенала спектрально-оптических методик контроля изменений в клетках и тканях при развитии сахарного диабета, используемых при проведении научно-исследовательских работ на кафедре оптики и биофотоники СГУ.

Цель работы – экспериментальное освоение метода поляризационной флуориметрии с флуоресцентным зондом 1,8-АНС для проведения количественной оценки уровня микровязкости мембран эритроцитов при развитии сахарного диабета.

Объект исследования – водно-глицериновые смеси (80–92 масс.%) как модельная система с контролируемой вязкостью; суспензии эритроцитарных мембран в условиях аллоксанового диабета и нормы (контроль).

Предмет исследования – зависимость параметров флуоресценции зондов пирен и 1,8-АНС от микровязкости окружающей среды.

Методологическую основу работы составляют анализ научной литературы, приготовление серии калибровочных растворов, подготовка образцов эритроцитарных мембран, регистрация спектров флуоресценции на спектрофлуориметре Perkin Elmer LS55, расчёт поляризационных характеристик флуоресценции и коэффициента эксимеризации, построение калибровочной зависимости.

Научно-практическая значимость – построенная калибровочная зависимость может быть непосредственно использована для количественного определения микровязкости мембран эритроцитов в норме и при моделировании патологических состояний (в том числе при сахарном диабете, где наблюдаются изменения липидного состава и текучести мембран).

Структура работы – квалификационная работа состоит из введения, трёх глав (теоретическая часть, практическая часть, результаты и обсуждение), результатов и выводов и списка использованных источников из 32 наименований. Первая глава содержит обзор строения мембран эритроцитов, метода флуоресцентных зондов (пирен и АНС) и микровязкости эритроцитарных мембран в норме и при сахарном диабете. Вторая глава описывает материалы и методы проведения экспериментов, а также методы обработки результатов. Третья глава представляет полученные

калибровочные зависимости для метода поляризованной флуоресценции и результаты оценки вязкости эритроцитарных мембран в норме и при диабете.

Флуоресцентные зонды и принципы их применения

Неинвазивное исследование тонких структурно-динамических характеристик биологических мембран, таких как микровязкость, стало возможным благодаря разработке метода флуоресцентных зондов. Флуоресцентный зонд представляет собой молекулу-люминофор, которая способна встраиваться в исследуемую структуру (в данном случае – в липидный бислой) и чьи спектральные характеристики (интенсивность, поляризация, время жизни флуоресценции, положение максимумов спектров) оказываются чувствительными к параметрам ее микроокружения [1].

Принцип метода заключается в следующем: в суспензию клеток или липосом вносятся молекулы зонда в низкой концентрации. Благодаря своим физико-химическим свойствам (чаще всего гидрофобности) зонды спонтанно встраиваются в мембраны. Затем образец облучается светом на длине волны, соответствующей максимуму поглощения зонда. Поглотив квант света, молекула зонда переходит в возбужденное электронное состояние, из которого затем возвращается в основное, излучая квант света с большей длиной волны (флуоресценция). Регистрируя параметры этого вторичного излучения, можно получить информацию о локальных свойствах той области мембраны, где находится зонд.

Ключевым требованием к зонду является минимальное влияние на нативные свойства исследуемой системы. Концентрация зонда подбирается таким образом, чтобы соотношение зонд/липид было очень низким (например, 1/500), что позволяет избежать артефактов, связанных с нарушением структуры мембраны [2].

Флуоресцентные зонды, используемые для изучения мембран, можно классифицировать по нескольким критериям:

1. По локализации в мембране:

- Зонды, локализующиеся в гидрофобной, углеводородной области бислоя (например, пирен, дифенилгексатриен (ДФГ), перилен). Они несут информацию о вязкости внутренней части мембраны.

- Амфифильные зонды, располагающиеся в области полярных головок фосфолипидов (нильский красный, производные N-фенил-1-нафтиламина (NPN) (1,8 – АНС)). Они чувствительны к свойствам поверхностных слоев мембраны.

2. По химической природе: зонды могут быть как экзогенными (вводимыми извне), так и эндогенными (естественные люминофоры клетки, например, триптофан). Для оценки именно липидной фазы используются преимущественно экзогенные зонды.

3. По механизму чувствительности:

- Поляризационные – измерение степени поляризации флуоресценции (АНС, ДФГ).

- Эксимерные – образование возбуждённых димеров (пирен).

- Сольватохромные зонды, меняющие положение спектров поглощения и флуоресценции в зависимости от полярности и свойств растворителя.

Флуоресцентные методы позволяют оценивать микровязкость, полярность, наличие фазовых переходов, а также исследовать взаимодействие мембран с лекарственными препаратами, наночастицами и факторами окружающей среды. Выбор конкретного зонда определяется задачами исследования, поскольку разные зонды чувствительны к разным аспектам динамики и структуры мембраны.

Использование эксимерных зондов (пирен) для оценки микровязкости. Пирен — это химическое соединение с формулой $C_{16}H_{10}$, представляющее собой полициклический ароматический углеводород. Обладает интенсивной флуоресценцией в ультрафиолетовом, синем

диапазоне. Плохо растворим в воде, но хорошо растворим в органических растворителях, спиртах. Пирен концентрируется в гидрофобной части мембраны, располагаясь между жирнокислотными цепями липидов.

Метод оценки микровязкости основан на наблюдении эксимеризации пирена. В растворе этого зонда молекулы (А), перешедшие в возбужденное состояние (А*) в результате поглощения фотона, могут сталкиваться с невозбужденными молекулами зонда, в результате чего образуются короткоживущие комплексы — эксимеры (АА*), максимум флуоресценции которых отличается от максимума мономерных молекул.

Образование эксимеров определяется вязкостью среды: в вязкой среде молекулы движутся медленнее, и вероятность столкновения молекул за время жизни возбужденного состояния невелика. Между степенью эксимеризации (коэффициентом эксимеризации) и вязкостью имеется обратная зависимость

$$\frac{k_3 c}{k_3^0 c_0} = \frac{\eta_0}{\eta}, \text{ причем } k_3 = \frac{I_3}{I_M}$$

где η_0 — вязкость стандартного раствора, η — микровязкость липидов в мембранах, c_0 и c — концентрация зонда в стандартном растворе и в мембране, k_3^0 и k_3 — коэффициенты эксимеризации, I_3 и I_M — интенсивность флуоресценции в максимумах эксимера и мономера.

В работе [3] пирен был успешно применён для оценки влияния апконвертирующих наночастиц на мембраны эритроцитов крыс. Показано, что изменение отношения эксимер/мономер коррелирует с нарушением структуры бислоя.

Определение микровязкости на основе измерения поляризации флуоресценции (1,8-АНС). 1-анилинонафталин-8-сульфонат (1,8-АНС) — амфифильный зонд, широко применяемый для измерения микровязкости. Его ключевое свойство — резкое (в десятки–сотни раз) увеличение квантового выхода флуоресценции при переходе из водной фазы в гидрофобное окружение, что позволяет селективно регистрировать сигнал только от зонда, встроенного в мембрану. 1,8-АНС встраивается в липидный бислой таким

образом, что его ароматическая анилинонафталиновая группа погружается в область верхних участков ацильных цепей фосфолипидов, тогда как заряженная сульфонатная группа остаётся вблизи полярных головок, контактируя с водным окружением. Такая локализация зондирует именно ту область бислоя, которая ответственна за его вязкостные свойства, и делает зонд чувствительным к подвижности жирнокислотных цепей.

Метод стационарной поляризационной флуоресценции основан на явлении фотоселекции и вращательной диффузии зонда за время жизни возбуждённого состояния (τ). При возбуждении плоскополяризованным светом избирательно возбуждаются молекулы, дипольный момент перехода которых ориентирован параллельно вектору поляризации. Если за время τ молекула успевает повернуться из-за броуновского вращения, испускаемый свет будет частично деполяризован. Вращательная деполяризация с одной стороны определяется параметрами, характеризующие саму люминесценцию молекул: длительность возбужденного состояния τ и молекулярным объёмом V , с другой стороны, параметрами, характеризующие среду: вязкостью η и температурой T .

Измеряемым параметром служит степень поляризации флуоресценции P (или анизотропия A). Данные о степени поляризации служат показателем вращательной подвижности зонда и отражают эффективную микровязкость окружающей его среды. Количественное описание связи между поляризацией и вязкостью даёт уравнение Перрена-Яблонского.

$$\frac{1}{P} - \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \left(1 + \frac{RT}{V\eta} \tau \right),$$

где P_0 – предельная поляризация в среде с бесконечно большой вязкостью, R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура, τ – время жизни флуоресценции, V – вращательный объём зонда, η – вязкость.

В терминах анизотропии флуоресценции:

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_0} \left(1 + \frac{RT\tau}{V\eta} \right),$$

где A_0 – предельная анизотропия (в отсутствии вращения), R – газовая постоянная, T – абсолютная температура, τ – время жизни флуоресценции, V – вращательный объём зонда, η – вязкость.

Уравнения показывают, что при постоянной температуре и неизменном τ величина $R(A)$ (измеряемая экспериментально) определяется исключительно η . Однако на практике параметры R_0 , τ и V для зонда в мембране точно неизвестны, поэтому вместо прямого расчёта η по результатам измерения $R(A)$ используют калибровку по растворителям с табличной вязкостью, однако такой метод годится, если время жизни возбужденного состояния зонда не зависит от вязкости. В противном случае надо измерить во всех образцах не только анизотропию (или поляризацию), но и время жизни возбужденного состояния.

Эритроцитарные мембраны

Клеточные мембраны – это субклеточные образования, толщиной в несколько молекулярных слоев, локализирующие цитоплазму и большинство структур внутри клетки, их толщина составляет 7 – 10 нм.

Плазматическая мембрана эритроцита является классическим объектом биофизических исследований благодаря доступности и относительной простоте выделения. В состав клеточных мембран входят белки, пептиды и углеводы, причем белки и пептиды занимают самый большой процент от сухой массы клетки. Липидный состав представлен фосфолипидами (фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин, сфингомиелин, фосфатидилсерин), гликолипидами и холестеринном в молярном соотношении примерно 1:1. Важной особенностью является трансмембранная асимметрия липидов: наружный монослой обогащён фосфатидилхолином и сфингомиелином, внутренний – фосфатидилэтанолламином и фосфатидилсерином.

Мембранные липиды состоят из малой полярной или заряженной головки и длинных незаряженных углеводородных цепей. Полярные головки глицерофосфатидов (фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин и

сфингомиелин) могут нести положительный и отрицательный заряд и при нейтральном рН являются электронейтральными (цвиттерионные липиды).

Белки мембраны эритроцита делятся на интегральные (пронизывающие бислои) и периферические (расположенные на поверхности). Основные белки: спектрин – периферический белок, образующий сеть на цитоплазматической стороне мембраны, обеспечивает механическую стабильность и эластичность; гликофорин – интегральный гликопротеин, несущий отрицательный заряд на внешней поверхности; участвует в предотвращении агрегации эритроцитов; белок полосы 3 – интегральный белок, обеспечивающий трансмембранный транспорт анионов (хлоридов и бикарбонатов), а также служащий местом прикрепления цитоскелета.

Согласно современной жидкостно-мозаичной модели (Сингер и Николсон, 1972), липидный бислой находится в жидкокристаллическом состоянии, а белки диффундируют в плоскости мембраны. Такая динамичность необходима для выполнения транспортных и сигнальных функций. Микровязкость мембраны эритроцита определяет подвижность липидов и белков, влияя на деформируемость клетки, активность ионных насосов и рецепторов.

Микровязкость липидного бислоя. Микровязкость – это эффективная вязкость микроокружения флуоресцентного зонда, отражающая локальную подвижность липидных молекул. Для внутренней области мембран эритроцитов при физиологической температуре (37 °С) типичные значения составляют 1–3 Пуаз (0,1–0,3 Па·с), что в 100–300 раз выше вязкости воды. Микровязкость является интегральным показателем, определяющим текучесть мембраны, скорость латеральной диффузии липидов и белков, а также функциональную активность мембранных ферментов.

Факторы, влияющие на микровязкость мембран:

температура – повышение температуры снижает микровязкость, при понижении возможен фазовый переход из жидкокристаллического состояния в гель-подобное с резким ростом вязкости; длина и

ненасыщенность жирнокислотных цепей – длинные насыщенные цепи увеличивают микровязкость, двойные связи (ненасыщенные цепи) создают изгибы, нарушающие упаковку, и снижают вязкость; холестерин – выполняет роль «регулятора текучести»: при температурах выше фазового перехода он ограничивает подвижность цепей, увеличивая вязкость, при низких температурах препятствует кристаллизации, уменьшая вязкость; соотношение белок/липид – крупные интегральные белки могут создавать вокруг себя область «застывших» липидов с повышенной вязкостью; pH среды, ионная сила, наличие осмотически активных веществ – изменяют электростатическое взаимодействие полярных головок.

Изменение микровязкости мембран эритроцитов наблюдается при многих заболеваниях и экстремальных состояниях. Применение зондов (пирена, АНС,ДФГ) позволяет выявлять эти изменения на ранних стадиях. Гипотермия приводит к повышению вязкости мембран эритроцитов. Зонд АНС показывает рост степени поляризации при гипотермии, что коррелирует с уменьшением текучести. Воспалительные процессы (например, при сепсисе) сопровождаются активацией фосфолипаз и изменением липидного состава мембран, что снижает микровязкость; при этом эксимерный зонд пирен регистрирует увеличение отношения I_{470}/I_{393} . Физическая нагрузка – после интенсивной мышечной работы в эритроцитах повышается содержание лактата и снижается pH, что может влиять на микровязкость. В экспериментах на крысах показано временное снижение микровязкости (увеличение текучести) после нагрузки, что связывают с изменением заряда полярных головок.

Влияние сахарного диабета на микровязкость мембран эритроцитов. Сахарный диабет сопровождается хронической гипергликемией, окислительным стрессом и изменениями липидного состава мембран. В условиях повышенного содержания глюкозы происходит неферментативное гликирование мембранных белков, в том числе спектрина

и белка полосы 3. Такие изменения уменьшают подвижность белково-липидных комплексов и увеличивает микровязкость эритроцитарных мембраны. Кроме того, при диабете активируется перекисное окисление липидов (ПОЛ), что также повышает вязкость бислоя. Для эритроцитов это проявляется снижением деформируемости, ухудшением реологических свойств крови и уменьшением текучести липидного бислоя.

В частности, в работе [4] исследовано влияние сахарного диабета первого типа на микровязкость эритроцитарных мембран. Было установлено снижение среднего значения коэффициента эксимеризации пирена у больных сахарным диабетом в сравнении с контрольной группой, что указывает на возрастание упорядоченности липидных молекул и на повышение микровязкости как суммарной липидной фазы, так и прибелкового липидного окружения в мембране эритроцита. Авторы предполагают, что увеличение микровязкости липидного участка мембраны может быть причиной нарушения латеральной диффузии белковых и липидных молекул, трансмембранного флип-флоп переноса липидов.

Материалы и методы

Приготовление калибровочных водно-глицериновых смесей. Для количественного определения микровязкости по измеренной степени поляризации (анизотропии) флуоресценции зонда 1,8-АНС необходима калибровка – установление функциональной связи степени поляризации или анизотропии флуоресценции зонда с величиной вязкости среды (в координатах Перрена такая зависимость будет линейной) с использованием сред, вязкость которых точно известна. В качестве таких сред в данной работе выбраны водно-глицериновые смеси. Глицерин обладает рядом преимуществ: полностью смешивается с водой в любых соотношениях, позволяя плавно изменять вязкость от 1 до 1000 мПа·с; вязкость его водных растворах при различных концентрациях и температурах может быть надёжно определена из литературных источников; смеси прозрачны в области возбуждения и испускания АНС (370 нм и 480 нм) и не дают собственной флуоресценции;

полярность водно-глицериновых растворов близка к полярности области липидного бислоя, в которую встраивается АНС, что минимизирует влияние полярности на время жизни τ зонда.

Для построения калибровочной зависимости степени поляризации флуоресценции от вязкости были приготовлены водно-глицериновые смеси в диапазоне концентраций 80–92 масс.%. Исходный глицерин марки «ХЧ» («Реахим») имел концентрацию 99,3 мас.%. Для получения ряда растворов с заданной массовой концентрацией (80, 83, 85, 87, 90, 92 масс.%) навеску концентрированного глицерина разбавляли дистиллированной водой.

Для расчета вязкости готовящихся водно-глицериновых смесей при 25 °С использовали уточнённые эмпирические формулы из [5]. Полученные значения вязкости перекрывают диапазон от 44 до 220 мПа·с, который, согласно литературным данным, характерен для микровязкости биологических мембран.

Приготовление раствора флуоресцентных зондов. Исходный раствор 1,8-АНС (1-анилинонафталин-8-сульфонат, натриевая соль) готовили растворением точной навески в абсолютном этаноле. Концентрация исходного раствора составляла 1×10^{-3} моль/л. Раствор хранили в тёмной стеклянной посуде при температуре 4 °С не более двух недель. Перед каждым измерением в калибровочную смесь вносили 20 мкл исходного раствора зонда, что обеспечивало конечную концентрацию АНС в образце около 1,5 мкМ. (Такую же концентрацию зонда создавали в образцах суспензии эритроцитарных мембран). Столь низкая концентрация зонда необходима для исключения концентрационной деполяризации флуоресценции; предотвращения агрегации молекул зонда; минимизации влияния зонда на вязкость раствора.

После добавления зонда образцы тщательно перемешивали и выдерживали в темноте при комнатной температуре не менее 15 минут для

завершения процесса сольватации (или входа молекул зонда в липидный бислой).

При оценке изменений микровязкости эритроцитарных мембран при развитии аллоксанового диабета по флуоресценции эксимеров пирена использовали спиртовой раствор зонда. Суспензию мембран объёмом 2 мл титровали спиртовым раствором пирена с концентрацией 8 мкмоль/л. Низкая концентрация зонда необходима для того, чтобы не нарушать структуру мембраны и регистрировать изменение флуоресценции, связанное именно с подвижностью молекул в липидном окружении. После добавления пирена образцы выдерживали для равномерного распределения зонда в мембранной фазе.

Подготовка образцов эритроцитарных мембран. Изучение эритроцитарных мембран проводилось на белых лабораторных крысах, здоровых и с двухмесячным развитым сахарным диабетом (модельного типа). Работу с лабораторными животными осуществляли согласно протоколу исследований, не противоречащих Женевской Конвенции 1985 г. о «Международных принципах биомедицинских исследований с использованием животных» и Хельсинкской декларацией 2000 г. о гуманном отношении к животным.

Стабилизированную гепарином при взятии от лабораторного животного кровь центрифугировали в лабораторной центрифуге ОП-8 при 3000 об/мин в течение 10 минут. Плазму и верхний слой лейкоцитов аккуратно отбирали пипеткой и удаляли. Эритроциты три раза промывали раствором изотоническим раствором трис-НСl буфера, каждый раз осаждая клетки в том же режиме. Мембраны эритроцитов получали с помощью гипоосмотического гемолиза. Гемолизат центрифугировали на центрифуге при 8000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок мембран промывали гипотоническим раствором трис-НС буфера (рН 7,6 при 20°C) до тех пор, пока не отмоеся гемолизат, каждый раз осаждая

мембраны в том же режиме [6]. В экспериментах по измерению зондовой флуоресценции использовали свежеприготовленную суспензию мембран.

Методика и порядок проведения измерений флуоресценции. Все измерения флуоресценции 1,8-АНС выполняли на спектрофлуориметре Perkin Elmer LS55, оснащённом поляризационными фильтрами (два призмы Глана-Томпсона). Измерения проводились при помощи термостатируемого кюветодержателя с циркуляцией воды от внешнего термостата и контролем температуры. Использовалась стандартная кварцевая кювета с длиной оптического пути 1 см.

Для поляризационных измерений применялись два положения поляризаторов в каналах возбуждения и испускания: вертикальное в канале возбуждения - вертикальное в канале испускания (регистрация I_{\parallel}) и вертикальное в канале возбуждения - горизонтальное в канале испускания (регистрация I_{\perp}). Поляризатор на возбуждении всегда устанавливался в вертикальное положение. Условия записи спектров: длина волны возбуждения: $\lambda_{\text{возб}} = 360$ нм (щель 10 нм); диапазон длин волн регистрации испускания: 400-600 нм (щель 7,5 нм); температура в кювете: $25,0 \pm 0,2$ °С .

Спектры флуоресценции меченных пиреном мембран регистрировали на спектрофлуориметре Perkin Elmer LS55 без использования поляризаторов. Условия записи спектров: длина волны возбуждения: $\lambda_{\text{возб}} = 282$ нм (щель 15 нм); длина волны возбуждения: $\lambda_{\text{возб}} = 334$ нм (щель 15 нм); спектральный диапазон регистрации испускания при щели 3 нм: 350-600 нм.; температура в кювете: $25,0 \pm 0,20$ °С.

Методы обработки результатов. Микровязкость среды, в которой находится флуоресцентный зонд, связана уравнением Перрена — Яблонского с поляризационными параметрами его стационарной флуоресценции, степенью поляризации (P) и анизотропия (A) флуоресценции, которые рассчитываются из непосредственно измеряемых величин I_{\parallel} (интенсивность на длине волны 480 нм в спектре флуоресценции АНС при параллельных поляризаторах в каналах возбуждения и испускания) и I_{\perp} (интенсивность при

скрещенных поляризаторах). Степень поляризации определяется разностью ($I_{\parallel} - I_{\perp}$), нормированной на сумму $I_{\parallel} + I_{\perp}$ (суммарную интенсивность, падающую на детектор):

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

Полная интенсивность флуоресценции определяется суммой $I_{\parallel} + I_{\perp} + I_{\perp}$. На основе этого рассчитывается анизотропия флуоресценции:

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

Коэффициенты эксимеризации пирена определяли по зарегистрированным спектрам флуоресценции пирена в образцах мембран эритроцитов. Интенсивность в зарегистрированном спектре на длине волны 393 нм принимали за интенсивность флуоресценции мономера пирена. Интенсивность на длине волны 470 нм относили к флуоресценции эксимеров. Коэффициент эксимеризации определяли как отношение интенсивности флуоресценции эксимера к интенсивности флуоресценции мономера:

$$K_3 = \frac{I_{470}}{I_{393}}$$

Результаты и обсуждение

Получение калибровочной кривой (вязкость – степень поляризации) для 1,8-АНС. По спектрам поляризованной флуоресценции образцов концентрационного ряда водно-глицериновых смесей для каждой концентрации глицерина были рассчитаны величины степени поляризации (P) и анизотропии (A) при $\lambda=480$ нм.

С ростом концентрации глицерина и динамической вязкости раствора величина P последовательно увеличивалась от 0,263 до 0,343. Такая монотонная зависимость соответствует теоретическим представлениям о вращательной диффузии зонда: более вязкая среда ограничивает вращение молекулы 1,8-АНС и уменьшает деполяризацию испускания.

Эти данные позволили построить для диапазона вязкости среды нахождения флуоресцентного зонда 1,8-АНС (от 44 до 220 мПа·с) калибровочную кривую, связывающую измеренные значения

поляризационных параметров флуоресценции зонда с величиной микровязкости среды. Представляется наиболее удобным и наглядным построение такой кривой в координатах Перрена - $\frac{1}{P}$ от $\frac{1}{\eta}$.

Экспериментальные точки (для 80 - 90 мас.% глицерина) удовлетворительно ложатся на прямую. Методом наименьших квадратов получено уравнение линейной регрессии (калибровочное уравнение):

$$\frac{1}{P} = 21,566 \frac{1}{\eta} + 2,809,$$

и величина коэффициента детерминации $R^2 = 0,997$ свидетельствует о выполнении уравнения Перрена и постоянстве времени жизни τ зонда 1,8-АНС в водно-глицериновых смесях данного концентрационного интервала.

Полученные калибровочные кривая и уравнение позволяют по измеренным степени поляризации и анизотропии флуоресценции зонда 1,8-АНС в мембранах эритроцитов рассчитывать эффективную микровязкость эритроцитарных мембран в мПа·с.

Сравнение вязкости эритроцитарных мембран при развитии диабета. Качественная оценка изменений микровязкости мембран эритроцитов при сахарном диабете выполнялась по спектрам эксимеризации пирена в мембранах эритроцитов крови лабораторных крыс с развитым аллоксановым диабетом и крыс контрольной группы.

В диабетических мембранах отношение интенсивности флуоресценции мономера пирена к интенсивности эксимерной флуоресценции увеличивается, что совпадает с результатами по сравнению текучести мембран при диабете и в норме, цитируемыми в [7].

По результатам серии измерений были рассчитаны коэффициенты эксимеризации пирена для контрольных и диабетических образцов. Показано, что при переходе от нормы к аллоксановому диабету коэффициент снижается более, чем в полтора раза. Полученный характер изменения величины коэффициента эксимеризации в диабетических мембранах означает повышение их микровязкости: латеральная диффузия зонда уменьшается,

поэтому отношение I_z/I_m снижается. Следовательно, при сахарном диабете мембраны эритроцитов становятся менее текучими, что может быть связано с гликированием белков, окислительным стрессом и изменением липидного состава бислоя.

Оценка величины вязкости эритроцитарных мембран в норме и патологии. С использованием калибровочной кривой и калибровочного уравнения была количественно оценена микровязкость эритроцитарных мембран как при развитии аллоксановом диабете, так и в контроле. Рассчитанные из поляризационных спектров флуоресценции 1,8-АНС в суспензии мембран эритроцитов величины $1/P$ попадают в интервал, охватываемый калибровочной кривой и калибровочным уравнением, и дают значения микровязкости мембран: в норме - 91 мПа·с, а при сахарном диабете - 159 мПа·с. Эти количественные оценки находятся в хорошем согласии с результатами, приводимыми в литературе.

Согласованность результатов двух подходов - эксимеризации пирена и поляризации флуоресценции 1,8-АНС - подтверждает правильность интерпретации результатов. Эксимеризация пирена показывает качественное снижение текучести мембраны при диабете, а регистрация поляризованной флуоресценции 1,8-АНС позволяет выразить это изменение в абсолютных значениях вязкости.

Заключение

При выполнении выпускной квалификационной работы изучены и апробированы флуоресцентные методы оценки микровязкости клеточных мембран с использованием зондов различного типа (пирен и 1,8-АНС).

Показано, что метод эксимеризации пирена применим для качественной оценки изменений текучести эритроцитарных мембран при развитии сахарного диабета. При сахарном диабете коэффициент эксимеризации снижается, что соответствует повышению микровязкости мембран.

Приготовлены водно-глицериновые калибровочные смеси с концентрациями 80-92 мас.%. Их динамическая вязкость при 25 °С составила от 44,0 до 219,9 мПа·с, что перекрывает известный из литературы диапазон микровязкости клеточных мембран.

Построена калибровочная кривая, связывающая измеренные значения поляризационных параметров флуоресценции зонда 1,8-АНС с величиной микровязкости среды; методом наименьших квадратов получено уравнение линейной аппроксимации (калибровочное уравнение) $\frac{1}{P} = 21,566 \frac{1}{\eta} + 2,809$. Величина коэффициента R^2 свидетельствует о выполнении уравнения Перрена и постоянстве времени жизни τ возбужденного состояния зонда 1,8-АНС в водно-глицериновых смесях использованного концентрационного интервала.

С использованием калибровочной кривой оценена микровязкость мембран эритроцитов: в норме - 91 мПа·с, при сахарном диабете - 159 мПа·с, что хорошо согласуется с имеющимися литературными данными.

Результаты выполнения работы будут использованы при разработке задач специального лабораторного практикума кафедры оптики и биофотоники.

1. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. – М.: Наука, 1980. – 320 с
2. Геворгизов М.Ю., Федорова Е.С., Марданова А.М., Шарипова М.Р. Методы исследования физико-химических свойств клеточных мембран // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. – 2017. – Т. 159, кн. 1. – С. 110–127.
3. Doronkina A.A., Pravdin A.V., Mylnikov A.M., Kochubey V.I., Yanina I.Yu. Effect of Upconversion Nanoparticles on Erythrocytes // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. – 2024. – № 2. 020309.
4. Кравец Е.Б., Рязанцева Н.В., Яковлева Н.М., Бутусова В.Н., Тухватулин Р.Т., Новикова Л.К. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при сосудистых осложнениях сахарного диабета 1 типа. Сахарный диабет. 2006; 9(1):10-14.
5. Ляшков В. И., Потапочкин В.В. Вязкость водных растворов глицерина. // Вестник ТГУ, т2, вып.3, 1997, с. 337-339.
6. Артюхов В.Г., Наквасина М.А. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами: Учеб. пособие. Воронеж: Издательство Воронежского государственного университета, 2000. 296 с
7. Новицкий В.В., Колосова М.В., Кравец Е.Б., Степовая Е.А., Самойлова Ю.Г. Структурно-метаболический статус и функциональная активность клеток красной крови при лечении детей, больных сахарным диабетом 1 типа. Сахарный диабет. 2006; 9(2):29-33.

