

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ pH НА ИНТЕНСИВНОСТЬ
ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ФЕНОКСАЗИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ ПРИ
ДЕЙСТВИИ HOCl**

Reut V. E.

*аспирант кафедры биофизики физического факультета Белорусского
государственного университета, г. Минск, Беларусь
ReutVE@bsu.by;*

Григорьева Д. В.

*к. б. н., доцент кафедры биофизики физического факультета
Белорусского государственного университета, г. Минск, Беларусь
dargr@tut.by;*

Горудко И. В.

*к. б. н., доцент, доцент кафедры биофизики физического факультета
Белорусского государственного университета, г. Минск, Беларусь
irinagorudko@gmail.com*

Хлорноватистая кислота (HOCl), образующаяся в реакциях, катализируемых ферментом азурофильных гранул нейтрофилов – миелопероксидазой (МПО), является не только мощным антимикробным агентом, однако также участвует в развитии множества заболеваний. В настоящее время активно ведется поиск специфичного и чувствительного зонда для обнаружения HOCl в клеточных средах. Ранее нами сообщалось, что красители феноксазинового ряда целестиновый синий В и галлоцианин могут быть принципиально применены для идентификации активных форм кислорода и галогенов в клеточных суспензиях. Целью данной работы явилось исследование оптимума флуоресцентного ответа данных красителей в присутствии HOCl в зависимости от pH среды. Было показано, что оба красителя обладают оптимумом работы при физиологических значениях pH.

Ключевые слова: целестиновый синий В; галлоцианин; хлорноватистая кислота; миелопероксидаза; нейтрофилы; флуоресценция

**EVALUATING THE EFFECT OF pH ON FLUORESCENCE INTENSITY OF
PHENOXAZINE DYES UPON HOCl OXIDATION**

Reut V. E.

*PhD student of the Department of Biophysics of the Physics Faculty of Belarusian
State University, Minsk, Belarus
ReutVE@bsu.by;*

Grigorieva D. V.

*PhD in Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Biophysics of
the Physics Faculty of Belarusian State University, Minsk, Belarus
dargr@tut.by;*

Gorudko I. V.

*PhD in Biological Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Biophysics of the Physics Faculty of Belarusian State University, Minsk, Belarus
irinagorudko@gmail.com*

Hypochlorous acid (HOCl), formed in reactions catalyzed by the enzyme of azurophilic granules of neutrophils – myeloperoxidase (MPO), is not only a potent antimicrobial agent, but is also involved in evolution of numerous diseases. Currently, the development a specific and sensitive probe for HOCl detection in cellular media is remains the main challenge. We previously reported that celestine blue B and gallocyanine can be used in principle to identify reactive oxygen species and halogens in cell suspensions. The aim of this work is to study the pH optima of fluorescence response of these dyes in the presence of HOCl. It has been shown that both dyes to perform optimally at physiological pH values.

Keywords: *celestine blue B; gallocyanine; hypochlorous acid; myeloperoxidase; neutrophils; fluorescence*

Ключевым агентом антимикробной защиты нейтрофилов является миелопероксидаза (МПО), фермент азурофильных гранул. При физиологической концентрации Cl^- МПО катализирует образование высокорекреакционной хлорноватистой кислоты (НОСl) в присутствии пероксида водорода, одного из продуктов респираторного взрыва нейтрофилов. При действии целого ряда стимулов может происходить дегрануляция нейтрофилов, что приводит к высвобождению из клеток множества антимикробных белков, включая МПО, которая способствует эффективному устранению большого количества патогенов. Однако повышенные концентрации МПО, а также биомаркеров хлорирования (3-хлортирозин, 5-хлорурацил) наблюдаются в условиях развития окислительного/галогенирующего стресса, в том числе при таких заболеваниях как инфаркт миокарда, ревматоидный артрит, почечная недостаточность, муковисцидоз и др. [1]. Следовательно, необходимы доступные и чувствительные методы, позволяющие определять НОСl как внутри отдельных клеток, так и во внеклеточном пространстве.

Обнаружение НОСl с применением флуоресцентных зондов – востребованный метод, позволяющий непрерывно анализировать активность МПО в функционирующих нейтрофилах и обнаруживать локализацию продукции НОСl. В настоящее время ведется активный поиск селективных и чувствительных зондов для НОСl, способных обнаруживать ее в физиологических условиях. Ранее нами было показано, что перспективными зондами для регистрации НОСl являются феноксазиновые красители галлоцианин (GC) и целестиновый синий В (CB) [2,3]. В данной работе было изучено влияние pH среды на эффективность обнаружения НОСl красителями GC и CB.

Измерения спектров поглощения и флуоресценции проводились на спектрофлуориметре Solar CM-2203 (Минск, Беларусь) при комнатной

температуре. Флуоресценцию красителей исследовали при следующих параметрах: а) возбуждение флуоресценции СВ при 430 нм, регистрация – в диапазоне 460–700 нм; б) возбуждение флуоресценции GC при 360 нм, регистрация – при 390–700 нм. Для изучения рН зависимости использовали фосфат-цитратный буфер (рН 2,2–8,0). рН полученных растворов проверяли при помощи рН-метра Hanna HI 2211-02 (Hanna Instruments, Грац, Австрия). Раствор HOCl готовили путем разбавления коммерческого раствора NaOCl в деионизированной воде. Использовали такое соотношение СВ/GC и HOCl, при котором на одну молекулу красителя приходилось две молекулы HOCl. Дополнительно исследовали положение максимумов поглощения красителей в пределах длин волн 350–750 нм.

Вначале исследовали собственную интенсивность флуоресценции красителя СВ (20 мкМ). Было показано, что фоновый уровень интенсивности флуоресценции СВ крайне мал в исследуемом диапазоне длин волн и практически не зависел от рН в пределах рН 2,2–8,0. Далее исследовали влияние рН на интенсивность флуоресценции продукта реакции СВ с HOCl. Для этого в кювету, содержащую буферный раствор добавляли краситель и окислитель как описано выше и через 5 минут снимали спектры флуоресценции продукта реакции. Интенсивность флуоресценции продукта реакции СВ с HOCl не отличалась от фонового уровня при рН 2,2–4,0. При увеличении рН наблюдалось усиление свечения продукта реакции с максимумом при рН 7,0–7,5, однако дальнейшее увеличение рН приводило к снижению интенсивности флуоресценции до фоновых значений. Максимум в спектрах поглощения СВ при рН 2,2 наблюдали при длине волны 536 нм. При увеличении рН до 4,0 в спектре отчетливо выделялись две полосы с максимумами при 536 и 648 нм. При рН 6,0–7,5 максимум спектра поглощения красителя соответствовал длине волны 648 нм. При увеличении рН до 8,0 наблюдали размытие спектра поглощения: преобладала полоса поглощения при 648 нм и слабый пик при 536 нм. Таким образом, уменьшение эффективности СВ в обнаружении HOCl при малых и высоких значениях рН можно отнести к изменению собственных физико-химических свойств красителя.

Аналогичные измерения были проведены для GC (5 мкМ). Фоновый уровень интенсивности флуоресценции GC оказался незначительным в исследуемом диапазоне рН. Интенсивность флуоресценции продукта реакции GC с HOCl линейно возрастала с увеличением рН, достигая максимума в диапазоне рН 6,0–8,0. В спектрах поглощения GC при рН 2,2 максимум приходился на длину волны 532 нм. При увеличении рН до 4,0 спектр становился размытым с максимумом при 622 нм и ярко выраженной полосой поглощения при 532 нм. При рН 6,0–8,0 максимум спектра поглощения красителя соответствовал длине волны 626 нм. Таким образом, уменьшение эффективности GC в обнаружении HOCl при малых значениях рН можно отнести к изменению собственных физико-химических свойств красителя, а при высоких – к уменьшению доступного для реакции HOCl.

Стоит отметить, что рК HOCl составляет $\sim 7,4-7,5$, и в условиях, близких к физиологическим обе формы HOCl и OCl^- присутствуют примерно в равных количествах, однако их соотношение сильно зависит от рН среды. Константа скорости реакции HOCl/OCl^- с различными соединениями возрастает по мере снижения рН и образования HOCl [4]. Таким образом, снижение эффективности красителей по обнаружению HOCl при низких значениях рН связано с изменением их физико-химических свойств, что можно наблюдать по значительному сдвигу (более 90 нм) максимумов поглощения красителей при рН 2,2 и 4,0.

Обнаружение HOCl в различных компартментах клетки в последнее время становится важным аспектом, учитываемым при разработке зондов, нацеленных на органеллы [5]. Поэтому особенно важно соотносить рабочий диапазон рН зонда с рН клеточных компартментов. Оптимумы работы исследуемых нами красителей позволяют принципиально обнаруживать HOCl в большинстве компартментов клетки (цитоплазма, пероксисомы, ядро, эндоплазматический ретикулум, в межмембранном пространстве митохондрий). Тем не менее, обнаружение HOCl в лизосомах, секреторных везикулах и матриксе митохондрий будет все еще затруднено.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что СВ и GC способны регистрировать HOCl в диапазоне рН, соответствующем физиологическим значениям и могут быть использованы в качестве доступного инструмента обнаружения HOCl и регистрации активности МПО.

Работа поддержана грантом БРФФИ (Б20Р-215).

Список литературы

1. Panasenکو, O. M. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems / O. M. Panasenکو, I. V. Gorudko, A. V. Sokolov // Biochemistry (Moscow). – 2013. – Vol. 78, № 13. – P. 1466–1489.
2. Луценко, В. Е. Целестиновый синий В – зонд для регистрации продукции хлорноватистой кислоты и HOCl -модифицированных белков / В. Е. Луценко [и др.] // Медицинский академический журнал. – 2019. – Т. 19, № 2. – С. 63–71.
3. Луценко, В. Е. Взаимодействие активных форм кислорода с галлоцианином при активации нейтрофилов / В. Е. Луценко [и др.] // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2020. – Т. 63, № 6. – С. 730-735.
4. Pattison, D. I. Absolute Rate Constants for the Reaction of Hypochlorous Acid with Protein Side Chains and Peptide Bonds / D. I. Pattison, M. J. Davies // Chemical Research in Toxicology. – 2001. – Vol. 14, № 10. – P. 1453–1464.
5. Gao, P. Fluorescent probes for organelle-targeted bioactive species imaging / P. Gao [et al.] // Chemical Science. – 2019. – Vol. 10, № 24. – P. 6035–6071.