



УДК 77.352.336

© 2011

О. А. Соколик, Т. С. Дюбко, Ю. И. Козин, И. А. Федюняева,  
Л. Д. Паценкер

**Анализ влияния озона на сывороточный альбумин  
с применением флуоресцентных зондов на основе  
тозилатов 2- и 4-(4-диметиламинофенил)-1-этенил)-1-  
алкилпиридиния (ДСП)**

*(Представлено академиком НАН Украины В. И. Грищенко)*

*Досліджено нові флуоресцентні зонди на основі тозилатів 2- і 4-(4-диметиламінофеніл)-1-етеніл)-1-алкілпиридинію (ДСП) щодо визначення вмісту і конформаційного стану сироваткового альбуміну людини і тварин (бик, кінь) та оцінки ефективності процедур озонотерапії. Встановлено, що при внутрішньовенному введенні озонованої крові пацієнтів відбуваються більш істотні зміни в гідрофобних областях альбуміну плазми, ніж при введенні озонованого фізіологічного розчину. Показано, що ці зонди мають ряд переваг порівняно з іншими відомими зондами.*

Альбумин является одним из важнейших компонентов плазмы крови, ответственным за связывание и транспортировку метаболитов, лекарственных препаратов, токсинов и других низкомолекулярных веществ. Изучение изменений структурно-функциональных свойств сывороточного альбумина, вызванных различными патологическими и физико-химическими факторами, весьма важно для решения ряда биомедицинских задач, в том числе для диагностики заболеваний [1] и оценки эффективности лечения, в частности, при проведении процедур озонотерапии [2] — современного метода коррекции многих патологических состояний [3].

Одним из наиболее эффективных, информативных и высокочувствительных методов изучения структурных состояний альбумина является метод флуоресцентных зондов [4], основанный на регистрации изменений параметров флуоресценции специальных красителей (зондов) в зависимости от физико-химических свойств их микроокружения. В качестве таких зондов потенциально можно использовать любой флуоресцирующий краситель, способный нековалентно (за счет гидрофобного и/или специфического взаимодействия) связываться с биомолекулами и изменять при этом свои параметры флуоресценции, такие как интенсивность, положение спектрального максимума, квантовый выход, поляризация

или время жизни флуоресценции [4]. Изменения этих параметров служат источником важной информации о структурном и функциональном состоянии биомолекул.

Разработанные ранее зонды АВМ [5–9] и МНБИС [10, 11] показали свою пригодность при изучении конформационных изменений альбумина при патологических состояниях и при действии физико-химических факторов. Вместе с тем по мере накопления экспериментального материала стало очевидно, что эти зонды обладают рядом ограничений при связывании с белком, а именно недостаточной избирательностью, малой чувствительностью и слабой фотостабильностью. Эти недостатки становятся особенно ощутимыми при широком внедрении в исследовательскую и медицинскую практику аппаратных методов. Поэтому актуальной задачей является создание и исследование новых зондов с улучшенными характеристиками для решения конкретных биомедицинских задач.

В этой работе анализируется применимость новых флуоресцентных зондов на основе тозилатов 2- и 4-(4-диметиламинофенил)-1-этинил)-1-алкилпиридиния (ДСП- $n$ -2 и ДСП- $n$ -4) с разной длиной алкильного заместителя ( $n$ ) для исследования альбумина и его конформационных изменений, индуцированных действием озона.

**Материалы и методы.** Сывороточный альбумин человека (САЧ; фракция V) получали из “Sigma” (США) и использовали без дополнительной очистки. Кровь лошади и быка, забранную на гепарине в качестве антикоагулянта, получали из Харьковской государственной зооветеринарной академии (пос. Малая Даниловка, Харьковская обл.). Кровь пациентов с различными формами урогенитальных инфекций (цирвицит, эндометрит, аднексит, уреопроstatит, хронический калькулезно-фиброзный простатит, орхоэпидидимит) (всего 19 чел.), проходивших курс озонотерапии в течение 10–15 дней, забранную на гепарине, получали из Харьковского противоболевого центра. Плазму крови отделяли однократным центрифугированием цельной крови (800 g, 5 мин).

Озон вводили пациентам внутривенно в виде предварительно озонированных физиологического раствора (ОФР) или собственной крови (процедура БАГОТ) как описано в [2]. Для озонирования применяли озono-кислородную смесь с концентрацией озона от 2,0 до 17 мг/л в зависимости от патологии и индивидуальной чувствительности пациента. Озонирование изолированного альбумина, плазмы крови человека и животных осуществляли смешиванием в соотношении 1 : 1 с озонированным физиологическим раствором.

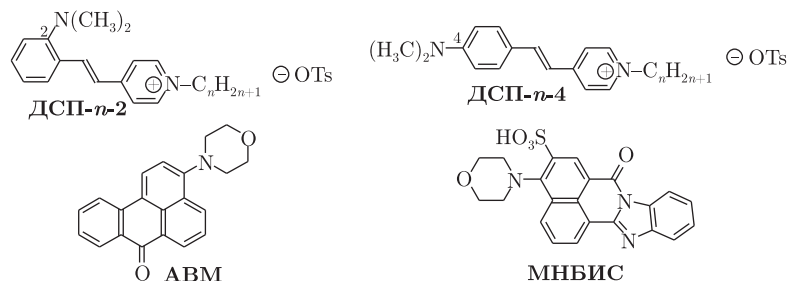
Тозилаты 2- и 4-(4-диметиламинофенил)-1-этинил)-1-алкилпиридиния с длиной алкильной цепи  $C_1$ – $C_{13}$  (ДСП-1 – ДСП-13) синтезированы в ГНУ “НТК “Институт монокристаллов” НАН Украины (Харьков). Зонд АВМ любезно предоставлен И. Э. Калниня (Рижский политехнический университет, Латвия). Краситель МНБИС любезно предоставлен Ю. А. Гуркаленко (Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины, Харьков). Зонды использовали в виде этанольных растворов с концентрацией  $(4 \div 5) \cdot 10^{-7}$  М.

Электронные спектры поглощения записывали в стандартных 1-см кварцевых кюветах на сканирующем двухлучевом спектрофотометре PerkinElmer Lambda 35. Спектры флуоресценции регистрировали в 1-см стандартных кварцевых кюветах на сканирующем спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse и исправляли с учетом коэффициентов спектральной чувствительности прибора. Точность определения максимумов спектров флуоресценции и поглощения составляла  $\pm 0,5$  нм.

Статистическую обработку проводили по методу Стьюдента–Фишера.

**Результаты и обсуждение.** *Спектральные характеристики свободных красителей.* Прежде всего мы изучили спектрально-люминесцентные свойства красителей серии ДСП, такие как положение максимумов полос поглощения ( $\lambda_{\text{макс.п}}$ ), флуоресценции

( $\lambda_{\text{макс. ф}}$ ), коэффициент экстинкции ( $\varepsilon$ ), квантовый выход флуоресценции ( $\Phi_F$ ), яркость красителей, оцененную как произведение коэффициента экстинкции на квантовый выход ( $\varepsilon \Phi_F$ ), а также изменение квантового выхода при связывании с белком (табл. 1). Полученные результаты сопоставлены с известными данными для зондов АВМ и МНБИС.



Красители ДСП- $n$ -2 в этаноле поглощают в области  $\sim 465$  нм и флуоресцируют при 590–596 нм, а ДСП- $n$ -2 — в более длинноволновой области ( $\lambda_{\text{макс. п}}$  480–484 нм и  $\lambda_{\text{макс. ф}}$  608–612 нм). С удлинением алкильного заместителя наблюдается небольшое длинноволновое смещение максимумов (до 4 нм), а также закономерное возрастание значений  $\varepsilon$  и  $\Phi_F$  (см. табл. 1). Наибольшими значениями  $\varepsilon$  и  $\Phi_F$  обладает ДСП-13-4. Перемещение диметиламиногруппы в положение 2 (серия ДСП- $n$ -2) приводит к существенному коротковолновому смещению полос поглощения (18–19 нм) и флуоресценции (16–22 нм), а также примерно двукратному снижению коэффициента экстинкции и уменьшению квантового выхода флуоресценции в 1,6–1,7 раза.

В водной среде (фосфатный буфер), обладающей большей полярностью по сравнению с этанолом, происходит характерное для донорно-акцепторных красителей длинноволновое смещение полос излучения, а также существенное, в 4,4–6,5 раз, снижение квантового выхода флуоресценции. Из-за сильно полярного строения молекул красители ДСП обладают слабой флуоресценцией в водных растворах, но квантовый выход сильно возрастает в более гидрофобных и менее полярных растворителях, таких как этанол, хлороформ и толуол, а также в биологических системах. Это дает возможность применять их для флуоресцентного зондирования белков, клеток и других высокомолекулярных биологических

Таблица 1. Спектральные характеристики исследованных красителей: максимумы полос поглощения ( $\lambda_{\text{макс. п}}$ ) и флуоресценции ( $\lambda_{\text{макс. ф}}$ ), коэффициент экстинкции ( $\varepsilon$ ), квантовый выход ( $\Phi_F$ ) и яркость свечения ( $\varepsilon \Phi_F$ )

Зонд	MW	Этанол				Водный фосфатный буфер, pH 7,4		САЧ / фосфатный буфер, pH 7,4		
		$\lambda_{\text{макс. п}}$ , нм	$\varepsilon$ , $\text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	$\lambda_{\text{макс. ф}}$ , нм	$\Phi_F$	$\lambda_{\text{макс. ф}}$ , нм	$\Phi_F$	$\lambda_{\text{макс. ф}}$ , нм	$\Phi_F$	$\varepsilon \Phi_F$ , $\text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$
ДСП-1-4	410,53	480	49500	608	0,024	616	0,004	583	0,025	1200
ДСП-2-4	424,56	481	49600	610	0,026	615	0,004	583	0,032	1600
ДСП-6-4	480,66	483	50000	611	0,030	614	0,006	587	0,052	2600
ДСП-8-4	508,72	484	50200	612	0,031	613	0,007	596	0,23	11600
ДСП-13-4	578,85	484	50500	612	0,032	610	0,007	599	0,26	13100
ДСП-8-2	508,72	466	24000	596	0,019	586	0,004	570	0,15	3600
ДСП-13-2	578,85	465	24600	590	0,020	585	0,004	571	0,21	5200
АВМ	315,37	483	12000	650	—	640	0,076	631	0,30	3600
МНБИС	435,45	$\sim 445$	7070	515	—	532	0,006	520	0,054	380

объектов. Аналогичными свойствами обладают АВМ и МНБИС, молекулы которых также представляют собой сильные донорно-акцепторные системы. Квантовый выход красителей ДСП в воде имеет примерно такие же значения ( $\Phi_F$  0,004–0,007), что и МНБИС (0,006), но почти в 10 раз меньше, чем АВМ (0,076). Тем не менее такие величины  $\Phi_F$  вполне достаточны для измерений на современных спектрофлуориметрах, что позволяет создавать надежные биоаналитические и диагностические методы анализа.

Красители ДСП-*n*-2 и, особенно, ДСП-*n*-4 обладают существенно большими значениями коэффициента экстинкции ( $\varepsilon \sim 24000\text{--}50500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) по сравнению с АВМ и МНБИС (см. табл. 1), благодаря чему эти красители пригодны для возбуждения синими светодиодами и полупроводниковыми лазерами. Преимуществом серии ДСП-*n*-4 по сравнению с ДСП-*n*-2 является ее лучшая совместимость с широко распространенным диодным лазером с длиной волны 488 нм и большая яркость (большие значения  $\varepsilon$  и  $\Phi_F$ ). Это весьма важно для современных аппаратных методов анализа — конфокальной флуоресцентной микроскопии, проточной цитофлуориметрии, флуориметрии с применением планшетных ридеров и других высокопроизводительных флуориметрических систем.

Одним из наиболее важных свойств зонда является его способность связываться с биологическими объектами — встраиваться в липидный бислой мембран или гидрофобные полости белков и проникать сквозь клеточную мембрану. Эта способность связана, в частности, с размером, формой и электронным зарядом молекул зонда. Красители ДСП имеют примерно такой же размер и молекулярную массу (MW), как АВМ и МНБИС. Тем не менее они различаются по форме: молекулы АВМ и МНБИС являются плоскими и дискообразными, с примерно одинаковыми размерами в обоих направлениях, а электронодонорный морфолиновый заместитель придает молекулам слегка вытянутую форму; молекулы ДСП имеют сильно вытянутое строение, которое становится еще более ощутимым при удлинении конформационно лабильного алкильного заместителя.

Еще одно важное отличие в молекулярном строении исследованных красителей заключается в их электронном строении и растворимости в водных средах. Молекула АВМ является электронейтральной, а слабую растворимость в воде ей придает гидрофильный морфолиновый цикл. Хромофорная система молекулы МНБИС также является незаряженной, однако этот краситель гораздо лучше растворяется в водных средах, так как содержит не только морфолиновый цикл, но и сильно гидрофильную сульфогруппу, которая, к тому же, диссоциирует в водных средах, превращая электронейтральную молекулу в отрицательно заряженный ион. ДСП являются катионными красителями, в которых положительный заряд делокализован на всей хромофорной части молекулы. Таким образом, проникающая способность красителей ДСП, АВМ и МНБИС, их способность окрашивать биологические системы и специфически связываться с определенными структурными фрагментами биосистем может быть существенно различной.

**Фотостабильность зондов.** Фотостабильность является одним из наиболее важных параметров, определяющих практическую пригодность флуоресцентных красителей для их применения в качестве зондов для медико-биологических исследований и анализов. Стабильность спектральных характеристик во времени обеспечивает надежность и воспроизводимость получаемых экспериментальных данных при проведении анализов и тестов. Как видно из рис. 1, наибольшей фотостабильностью обладают красители серии ДСП: форма их спектров флуоресценции, интенсивность и положение максимумов изменяются при облучении в наименьшей степени. Спектр флуоресценции АВМ при облучении существенно меняется, а наименьшей стабильностью обладает МНБИС.

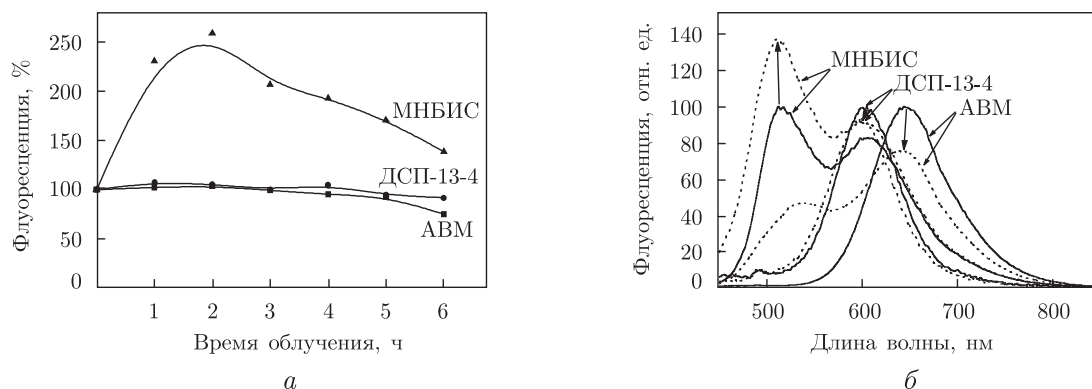


Рис. 1. Фотостабильность: изменение интенсивности (а) и спектров флуоресценции (б) этанольных растворов красителей С-13-4, МНБИС и АВМ при облучении металл-галогеновой лампой (400 Вт). Спектры до облучения показаны сплошной линией, после облучения (156 ч) — штриховой

Таким образом, преимуществами красителей ДСП являются не только их высокая яркость, чувствительность к белкам и совместимость с популярными источниками возбуждения, но и более высокая фотостабильность по сравнению с другими известными зондами для этой же спектральной области.

**Связывание зондов с альбумином человека.** Как уже отмечалось, катионные красители серии ДСП в водных растворах обладают слабой флуоресценцией. В присутствии альбумина (САЧ) — глобулярного белка плазмы крови, имеющего суммарный отрицательный заряд и гидрофобные полости, происходит существенное возрастание интенсивности свечения красителей, сопровождающееся коротковолновым (11–33 нм) смещением спектров флуоресценции (см. табл. 1). Такая закономерность является характерной для донорно-акцепторных молекул при переходе от более полярной (вода) к менее полярной среде (белок).

Квантовый выход красителей с коротким алкилом (ДСП-1-4 и ДСП-2-4) при связывании с белком увеличивается всего в 6–8 раз, в то время как для красителей с длинным алкилом (ДСП-8-4 и ДСП-13-4) — в 33–37 раз, а для ДСП-8-2 и ДСП-13-2 это возрастание еще более существенное и достигает соответственно 37,5 и 52,5 раз. Для сравнения: возрастание квантового выхода для АВМ и МНБИС составляет всего 4 и 9 раз, т.е. красители серии ДСП существенно более чувствительны к изменениям концентраций САЧ. Таких изменений флуоресцентного сигнала вполне достаточно для надежного количественного определения белка. При этом важно отметить, что с удлинением алкильного заместителя  $C_nH_{2n+1}$  повышается избирательность (селективность) зонда к белку. Так, для красителей с коротким алкилом (ДСП-1-4 и ДСП-2-4) квантовый выход в водном растворе белка мало отличается от такового в этаноле, а с удлинением алкила (ДСП-8-4, ДСП-13-4, ДСП-8-2 и ДСП-13-2) квантовый выход в присутствии белка уже в 8–10 раз превышает таковой, измеренный в этаноле. Интересно, что в то время как при удлинении алкильного заместителя квантовый выход свободных красителей в воде слабо и плавно увеличивается, квантовый выход комплексов с САЧ скачкообразно возрастает при переходе от ДСП-6-4 к ДСП-8-4 (рис. 2). Это может быть связано с улучшением встраивания более длинных алкильных производных в гидрофобные полости так называемых лекарственных центров альбумина. Это “варфариновый” центр I, имеющий глубину 19 Å, и “бензодиазепамовый” центр II с глубиной 12–16 Å [1].

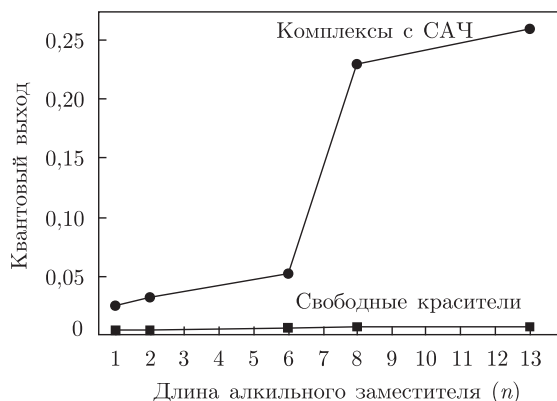


Рис. 2. Зависимость квантовых выходов свободных красителей ДСП- $n$ -4 и их комплексов с САЧ от длины алкильного заместителя

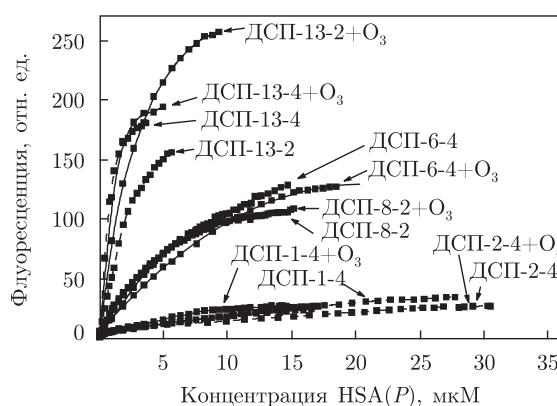


Рис. 3. Кривые флуоресцентного титрования красителей ДСП ( $c = 0,5$  мкМ) озонированным (штриховая линия) и неозонированным (сплошная линия) раствором САЧ. Концентрация озона 4,6 мг/л

Яркость красителей ДСП после полного связывания с белком (см. табл. 1) составляет  $1200\text{--}13100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  и существенно возрастает с удлинением алкильного заместителя и при перемещении диметиламиногруппы из положения 2 в положение 4. При этом яркость МНБИС в 3 раза хуже, чем для наименее яркого из исследованных зондов — ДСП-1-4, а яркость АВМ соответствует таковой для ДСП-8-2, что в 3,6 раза хуже, чем для ДСП-13-4.

Для выяснения нижней и верхней границ определения белка мы провели флуоресцентное титрование красителей ДСП раствором САЧ. Данная концентрация красителя выбиралась таким образом, чтобы обеспечить надежную регистрацию флуоресцентного сигнала и в то же время исключить агрегацию молекул красителя. Кроме того, при низкой концентрации краситель связывается исключительно с сильными центрами связывания белка [12], представляющими наибольший интерес для рассмотрения, но не образует комплексов со “слабыми” центрами, обладающими меньшей афинностью к красителю и другим соединениям, таким как, например, фармакологические препараты.

Характер полученных кривых титрования в значительной мере зависит от строения молекул красителя: удлинение алкильного заместителя приводит к значительному возрастанию интенсивности флуоресценции, причем красители серии ДСП- $n$ -4 демонстрируют более существенный и более крутой рост, чем ДСП- $n$ -2 (рис. 3). С увеличением концентрации

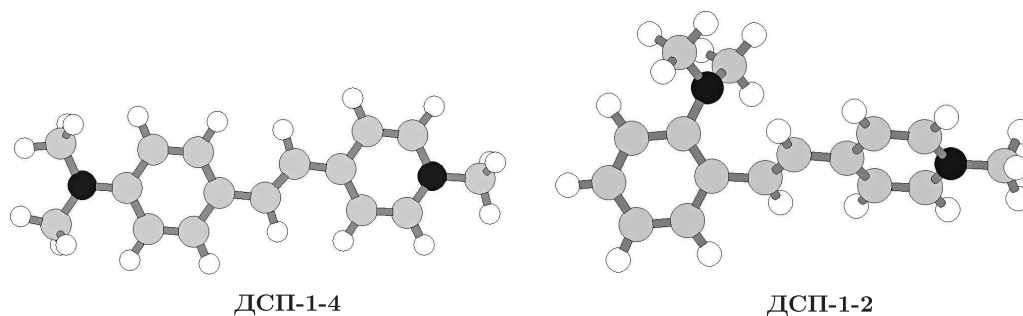


Рис. 4. Пространственное строение молекул ДСП-1-4 и ДСП-1-2

белка кривые титрования достигают насыщения, причем концентрационный порог этого насыщения обратно пропорционален скорости возрастания интенсивности флуоресценции, т. е. чем круче возрастает кривая титрования, тем раньше наступает насыщение (см. рис. 3). Поэтому красители ДСП-1-4 и ДСП-2-4, обладающие при связывании с белком наименьшей яркостью флуоресценции, имеют наибольший концентрационный диапазон изменений интенсивностей и позволяют определять концентрации САЧ до  $\sim 25$  мкМ. Эти зонды наилучшим образом подходят для исследования свойств поверхностных центров связывания, поскольку являются наименее специфичными [12, 13]. Красители ДСП-13-2 и ДСП-13-4 имеют наибольшую интенсивность флуоресценции в присутствии белка, но насыщение наступает уже при концентрациях порядка 2,5 и 5 мкМ. Красители ДСП-6-4 и ДСП-8-2 позволяют надежно определять концентрации САЧ до 15 и 10 мкМ соответственно. Данные зонды являются наиболее специфичными [12] и подходят для исследования свойств гидрофобных (“лекарственных”) центров связывания.

**Действие озона на альбумин.** Известно, что озон действует преимущественно на индольные кольца аминокислотных остатков и способен окислять их двойные связи, что приводит к конформационным изменениям белка [1].

Для выяснения чувствительности новых красителей, в сравнении с известными, к конформационным изменениям изолированного альбумина под действием озона нами проанализированы кривые флуоресцентного титрования красителей неозонированным и озонированным САЧ (рис. 4). Известно, что при завершении титрования, т. е. при достижении избытка белка, флуоресцентный зонд начинает выступать в качестве маркера структурного состояния САЧ [12]. Как видно из рис. 3, ДСП-13-2 по сравнению с другими зондами проявляет аномально высокую чувствительность к структурным изменениям САЧ, вызванным озонированием. Скорее всего, это связано с тем, что данный зонд имеет наиболее благоприятное электронное и пространственное строение, которое делает его особенно чувствительным к конформационным изменениям белка. Действительно, в то время как, например, молекула ДСП-13-4 является планарной, молекула ДСП-13-2 сильно разуплощена за счет стерических препятствий, создаваемых *орто*-диметиламиногруппой (см. рис. 4). Оптимальный баланс гидрофобно-гидрофильных свойств этого зонда, обеспечиваемый полярным строением хромофорной части и гидрофобным алкильным заместителем, позволяет ему, по-видимому, концентрироваться именно в тех участках белка, которые наиболее чувствительны к действию озона.

Для того чтобы выяснить, насколько адекватно красители ДСП-13-2 и ДСП-13-4 способны отражать изменения конформационного состояния альбумина плазмы, нами проведено

сравнение показателей относительного квантового выхода и положения спектров в условиях, моделирующих процентное содержание в плазме крови человека альбумина и иммуноглобулинов. Оказалось, что в смеси этих белков зонды ДСП-13-2 и ДСП-13-4 преимущественно (на  $90 \pm 5\%$ ) связываются с альбумином, а спектры этих зондов при связывании с изолированным САЧ сдвинуты по сравнению с таковыми во фракции иммуноглобулинов соответственно на 18 и 13 нм. Это означает, что данные красители могут быть использованы для изучения свойств альбумина не только в изолированном состоянии, но и в составе плазмы.

Анализ влияния озона на конформационное состояние альбумина плазмы человека и животных (лошади и быка) с помощью зондов ДСП-13-2 и ДСП-13-4 показал, что несмотря на некоторые отличия в исходной интенсивности и положении максимумов спектров, обусловленные разницей в видовом составе белков плазмы, данные красители проявляют высокую чувствительность к конформационным изменениям альбумина плазмы при озонировании. После процедуры ОФР интенсивность флуоресценции красителей снижается на 25–30%. Однако эти изменения нельзя объяснить только уменьшением содержания альбумина [2], поскольку они сопровождаются также длинноволновым смещением спектров и свидетельствуют, по нашему мнению, о конформационных изменениях белков под влиянием озона. Благодаря длинным алкильным заместителям молекулы ДСП-13-2 и ДСП-13-4 легко встраиваются в малополярные области белка, что является причиной их высокой чувствительности к конформационным изменениям гидрофобных полостей альбумина, вызванным действием озона. По-видимому, данный эффект можно отнести к общим закономерностям действия озона на сывороточные альбумины плазмы крови человека и животных.

Красители серии ДСП обнаруживают также высокую чувствительность к состоянию альбумина плазмы пациентов, проходивших процедуры озонотерапии. В частности, с помощью зонда ДСП-13-4 обнаружено, что после процедуры БАГОТ происходят более выраженные изменения в гидрофобных областях альбумина плазмы по сравнению с введением ОФР. Так, после БАГОТ отмечается уменьшение интенсивности флуоресценции в среднем на 49%, в то время как после ОФР — всего на 7%. К причинам наблюдаемого эффекта можно отнести как более сильное влияние озона и продуктов его распада на белки плазмы при процедуре БАГОТ [2], так и, возможно, большую степень “очистки” молекул альбумина от связанных низкомолекулярных токсических лигандов [1].

Таким образом, проведенные исследования показали пригодность новых флуоресцентных зондов серии ДСП для решения медико-биологических задач, связанных с определением содержания и структурного состояния альбумина человека и животных и их преимущества перед известными зондами, такими как АВМ и МНБИС.

Установлено, что варьирование положения диметиламиногруппы и длины алкильного заместителя позволяет оптимизировать зонды для решения конкретной задачи при анализе конформационных изменений альбумина. Удлинение алкильного заместителя в молекулах зондов и перемещение диалкиламиногруппы из положения 2 (ДСП-13-2) в положение 4 (ДСП-13-4) приводит к усилению флуоресцентного сигнала при связывании зондов с белком. Показана пригодность зондов ДСП-13-2 и ДСП-13-4 для определения концентрации альбумина в растворе в диапазоне концентраций САЧ от 0,5 до ~25 мкМ.

Зонды серии ДСП в зависимости от длины алкильного радикала обнаруживают различную чувствительность и специфичность по отношению к сывороточному альбумину. Это может быть использовано как в диагностических целях, так и для корректировки



и прогнозирования результатов терапевтического воздействия озона. Красители ДСП-13-2 и ДСП-13-4 проявляют высокую чувствительность к структурным изменениям гидрофобных областей молекул альбумина человека и животных, индуцированных действием озона как в модельных условиях (изолированный альбумин), так и в составе плазмы. В результате действия озона происходит не только увеличение полярности микроокружения зондов, но и, по-видимому, “разрыхление” гидрофобных полостей молекулы белка. Установлено, что при внутривенном введении озонированной крови пациентов (процедура БАГОТ) изменения в гидрофобных областях альбумина плазмы более выражены, чем при введении ОФР.

1. *Альбумин* сыворотки крови в клинической медицине / Под ред. Ю. А. Грызунова, Г. Е. Добрецова. Кн. 2. – Москва: ГЭОТАР, 1998. – 440 с.
2. *Козин Ю. И., Ромасько Н. В., Дюбка Т. С. и др.* Изучение методом флуоресцентной спектроскопии влияния озонирования крови больных с различной патологией на белки сыворотки // Эксперим. и клинич. медицина. – 2005. – № 2. – С. 81–88.
3. *Нижегородский медицинский журнал. Прил. Озонотерапия.* – Нижний Новгород, 2003. – 340 с.
4. *Добрецов Г. Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. – Москва: Наука, 1989. – 277 с.
5. *Kalnina I., Meirovics I.* A new fluorescent probe, ABM: Properties and application in clinical diagnostics // J. Fluoresc. – 1999. – **9**, No 1. – P. 27–32.
6. *Gorbenko G., Trusova V., Kirilova E. et al.* New fluorescent probes for detection and characterization of amyloid fibrils // Chem. Phys. Letters. – 2010. – **495**, Iss. 4–6. – P. 275–279.
7. *Kalnina I., Kirilova E., Klimkane L., Kirilov G.* Altered plasma albumin characteristics and lymphocyte populations in gastrointestinal cancer patients: Detection using modified fluorescence responses // J. Immunotoxicol. – 2009. – **6**, No 4. – P. 293–300.
8. *Kalnina I., Zvagule T., Bruvere R., Meirovics I.* Fluorescent characteristics of rheumatoid arthritis patients blood lymphocytes // J. Fluoresc. – 2005. – **15**, No 2. – P. 105–110.
9. *Kalnina I., Bruvere R., Zvagule T. et al.* Fluorescent probe ABM and estimation of immune state in patients with different pathologies (Review Article) // Ibid. – 2010. – **20**, No 1. – P. 9–17.
10. *Дистанов В. Б., Ромоданова Э. А., Рошаль А. Д. и др.* Перспективы использования производных нафталевой кислоты в научных исследованиях и промышленных технологиях // Вост.-европ. журн. передов. технологий. – 2004. – № 5(11). – С. 43–48.
11. *Ромоданова Э. А., Дюбка Т. С., Рошаль А. Д., Дистанов В. Б.* МНБИС как маркер изменений макроструктуры белка // Вісн. ХНУ ім. В. Н. Каразіна. № 570. – Сер. Радіофізика та електроніка. – 2002. – Вип. 2. – С. 302–307.
12. *Гаврилов В. Б.* Характеристика чувствительности и специфичности флуоресцентных маркеров структурного состояния и связывающей способности белков // Биофизика. – 2000. – **45**, вып. 5. – С. 421–426.
13. *Окладной Ю. Г., Дюбка Т. С.* Унификация подхода к оценке чувствительности и специфичности новых красителей и потенциальных флуоресцентных зондов для белков // Функц. материалы. – 2005. – **12**, № 3. – С. 583–586.

Государственное научное учреждение НТК “Институт  
монокристаллов” НАН Украины, Харьков  
Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, Харьков  
Харьковский национальный медицинский университет

Поступило в редакцию 13.12.2010

O. O. Sokolyk, T. S. Dyubko, Yu. I. Kozin, I. A. Fedyunyayeva, L. D. Patsenker

**Investigation of the ozone impact on serum albumin using the fluorescent probes based on 2- and 4-(4-dimethylaminophenyl)-1-ethenyl)-1-alkylpyridinium tosylates (DSP)**

*The advantages of the new fluorescent probes based on 2- and 4-(4-dimethylaminophenyl)-1-ethenyl)-1-alkylpyridinium tosylates (DSP) to determine the content and the conformational state of human and animal (bovine and horse) serum albumin and to estimate the effectiveness of ozonotherapy are demonstrated. An intravenous injection of patient's ozonated blood is found to cause a more pronounced impact on the serum albumin hydrophobic regions as compared to the injection of the ozonated physiological solution.*