



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 342–353

Izvestiya of Saratov University. Physics, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 342–353

<https://fizika.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1817-3020-2023-23-4-342-353>, EDN: OGMTAC

Научная статья

УДК 577.322.7:535.373:535.372



Метод люминесцентного зонда в изучении взаимодействия гликированных с негликированными сывороточными альбуминами человека

В. И. Кочубей^{1,3✉}, А. Б. Правдин¹, А. Г. Мельников², Д. А. Быков², Г. В. Мельников²

¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

²Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю. А., Россия, 410054, г. Саратов, ул. Политехническая, д. 77

³Томский национальный исследовательский государственный университет, Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, д. 36

Кочубей Вячеслав Иванович, доктор физико-математических наук, ¹профессор кафедры оптики и биофотоники; ³ведущий научный сотрудник междисциплинарной лаборатории лазерного молекулярного имиджинга и машинного обучения, saratov_gu@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7834-9067>

Правдин Александр Борисович, кандидат химических наук, доцент кафедры оптики и биофотоники, pravdinab@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3977-3521>

Мельников Андрей Геннадьевич, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры «Физика», agmelnikov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8662-3206>

Быков Денис Андреевич, аспирант кафедры «Физика», robokop2468.bykov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6681-9922>

Мельников Геннадий Васильевич, доктор химических наук, профессор, профессор кафедры «Физика», melnikov-gv@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4708-2256>

Аннотация. Развитие и функционирование всех живых существ заканчивается неизбежным процессом старения, в результате которого подавляется деятельность всех органов и организма в целом, что приводит к неминуемой смерти. Одной из причин старения считают гликирование белков. Этот процесс протекает на протяжении всей жизни, но с возрастом он усиливается. Гликирование белков – это реакция ковалентного соединения свободных аминогрупп белков и восстанавливающих углеводов, которая протекает без участия ферментов и приводит к нарушению функций белков. Этот процесс является нерегулируемым, так как происходит без участия биологических катализаторов. В результате гликирования белков у человека в организме возникают воспалительные процессы, и развивается ряд таких заболеваний, как инфаркт, инсульт, атеросклероз, катаракта, гликемия, болезнь Альцгеймера, сахарный диабет и др. В задачах медицинской диагностики необходимы методы контроля состояния белков в организме человека, сывороточного альбумина человека (САЧ). В связи с этим работа посвящена изучению процессов взаимодействия глобул сывороточного альбумина человека (САЧ) с глобулами гликированного сывороточного альбумина человека (гСАЧ). Установлено, что интенсивность и кинетика затухания замедленной флуоресценции и фосфоресценции люминесцентного зонда эозина, связанного с белками, чувствительны к соотношению гликированных и негликированных белков в растворе. Для объяснения возрастания интенсивности и времени жизни фосфоресценции эозина при переходе от раствора САЧ к смеси САЧ с гСАЧ сделано предположение, что глобулы САЧ и гСАЧ в результате диффузионных встреч образуют комплекс состава гСАЧ-САЧ, вращательная подвижность которого гораздо меньше, чем отдельно глобул САЧ и гСАЧ. Образование комплекса подтверждается возрастанием анизотропии замедленной флуоресценции и фосфоресценции эозина в смеси САЧ с гСАЧ. Полученные результаты проделанной работы можно использовать для диагностики наличия комплекса гликированных с негликированными белками в плазме крови человека.

Ключевые слова: гликированный САЧ, негликированный САЧ, глюкоза, эозин Y, фосфоресценция, анизотропия

Для цитирования: Кочубей В. И., Правдин А. Б., Мельников А. Г., Быков Д. А., Мельников Г. В. Метод люминесцентного зонда в изучении взаимодействия гликированных с негликированными сывороточными альбуминами человека // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 342–353. <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2023-23-4-342-353>, EDN: OGMTAC

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

Luminescent probe method in the study of the interaction of glycosylated human serum albumin with non-glycosylated human serum albumin

V. I. Kochubey^{1,3✉}, A. B. Pravdin¹, A. G. Melnikov², D. A. Bykov², G. V. Melnikov²

¹Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410019, Russia

© Кочубей В. И., Правдин А. Б., Мельников А. Г., Быков Д. А., Мельников Г. В., 2023



²Saratov State Technical University, 77 Polytechnicheskaya St., Saratov 410054, Russia

³Tomsk National Research State University, 36 Lenin Ave., Tomsk 634050, Russia

Vyacheslav I. Kochubey^{1,3}, saratov_gu@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7834-9067>

Aleksander B. Pravdin¹, pravdinab@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3977-3521>

Aleksander G. Melnikov², agmelnikov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8662-3206>

Denis A. Bykov², robokop2468.bykov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6681-9922>

Gennady V. Melnikov², melnikov-gv@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4708-2256>

Abstract. Background and Objectives: The development and functioning of all living beings ends with the inevitable aging process, as a result of which the activity of all organs and the body as a whole is suppressed, which leads to imminent death. Protein glycation is considered to be one of the causes of aging. This process takes place throughout life, but it intensifies with age. Protein glycation is a reaction of covalent coupling of free amino groups of proteins and reducing carbohydrates, which proceeds without the participation of enzymes and leads to disruption of protein functions. This process is unregulated, as it occurs without the participation of biological catalysts. As a result of glycation of proteins in humans, inflammatory processes occur in the body and a number of diseases such as heart attack, stroke, atherosclerosis, cataract, glycemia, Alzheimer's disease, diabetes mellitus, etc. develop. In the tasks of medical diagnostics, methods of monitoring the state of proteins in the human body are necessary. In this regard, the work is devoted to the study of the processes of interaction of human serum albumin globules (HSA) with globules of human glycosylated serum albumin (gHSA). **Materials and Methods:** In conducting a study of the spectral-kinetic characteristics of the eosin luminescent probe in solutions of glycosylated and non-glycosylated HSA, as well as in a mixture of glycosylated and non-glycosylated HSA, an exponential dependence of the second order was used to approximate the dependencies of DF (delayed fluorescence) and PHOS (phosphorescence), and an anisotropy equation was used to assume the formation of the gHSA-HSA complex. **Results:** It has been found that the intensity and kinetics of quenching of delayed fluorescence and phosphorescence of the eosin fluorescent probe associated with proteins are sensitive to the ratio of glycosylated and non-glycosylated proteins in solution. To explain the increase in the intensity and lifetime of eosin phosphorescence during the transition from a solution of HSA to a mixture of HSA and gHSA, it is assumed that the globules of HSA and gHSA form a complex of the composition of gHSA-HSA, as a result of diffusion encounters. The rotational mobility of this complex is much less than the separate globules of HSA and gHSA. The formation of the complex is confirmed by an increase in the anisotropy of delayed fluorescence and phosphorescence of eosin in a mixture of HSA and gHSA. **Conclusion:** The obtained results of the work can be used to diagnose the presence of a complex of glycosylated with non-glycosylated proteins in human blood plasma.

Keywords: glycosylated HSA, non-glycosylated HSA, glucose, eosin Y, phosphorescence, anisotropy

For citation: Kochubey V. I., Pravdin A. B., Melnikov A. G., Bykov D. A., Melnikov G. V. Luminescent probe method in the study of the interaction of glycosylated human serum albumin with non-glycosylated human serum albumin. *Izvestiya of Saratov University. Physics*, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 342–353 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2023-23-4-342-353>, EDN: OGMTAC

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC0-BY 4.0)

Введение

В настоящее время большое внимание уделяется поиску все новых способов ранней диагностики целого ряда заболеваний. Для задач медицинской диагностики ряда заболеваний, в том числе и такого как сахарный диабет, востребованы флуоресцентные методы контроля состояния транспортных белков организма, сывороточного альбумина человека (САЧ) [1, 2].

Исследования степени гликирования гемоглобинов и белков плазмы крови показали, что они являются более информативными по сравнению с определением уровня сахара в крови [3, 4]. Уровень сахара в крови является секундным показателем, зависимым от многих факторов – приема пищи, физической нагрузки, эмоционального состояния [5–8]. Показатели гликированного гемоглобина (ГГ) и гликированных белков (ГБ) плазмы крови информативны на протяжении длительного времени [9]. Из-за более короткой продолжительности жизни ГБ (12–21 день) [10–12] определение наличия

этого альбумина позволяет реализовать гликемический контроль пациента в течение 2–3 недель [13], в то время как время жизни ГГ составляет 60–120 дней [10, 11]. Сывороточный альбумин человека имеет более короткий период полураспада, чем у гемоглобина [14], поэтому для оценки эффективности лечения наиболее показательными являются ГБ [15], так как позволяют получать данные за более короткий период времени.

Известно [16], что гликирование приводит к изменению структуры белков, в том числе и транспортных, что приводит к увеличению жесткости глобулы белка за счет увеличения поперечных сшивков внутри его глобулы.

Одним из самых чувствительных методов является люминесцентный, позволяющий осуществлять неразрушающий контроль состояний белков плазмы крови.

Для определения структурных изменений в белках с успехом применяются люминесцентные методы, основанные на наблюдении флуоресценции [17] и фосфоресценции [18] хромо-



форов белков. Однако число люминесцирующих хромофоров белков ограничено и их квантовый выход люминесценции незначителен [18], поэтому для исследования структурных перестроек в белках применяются флуоресцентные зонды [19, 20], обладающие высоким квантовым выходом свечения и способностью сорбироваться в определенных местах глобулы белка.

Кроме того, чувствительность люминесценции зондов к изменению микроокружения зондов позволяет исследовать структурные перестройки в сывороточном альбумине при переходе к гликированным САЧ. Структурные перестройки в глобулах САЧ при гликировании могут приводить к изменению микроокружения молекул люминесцентных зондов, связанных с глобулами САЧ. Поэтому изменения, вызванные гликированием альбумина, можно зарегистрировать по изменениям люминесцентных характеристик зонда, чувствительного к конформации белка. Для исследования процессов перспективно использовать долгоживущее излучение зонда – фосфоресценцию (ФОСФ) и замедленную флуоресценцию (ЗФ). Значительное время жизни ФОСФ и ЗФ зонда по сравнению с флуоресценцией позволяет изучить более медленные процессы, происходящие в структурных изменениях глобулы САЧ.

Одной из проблем, возникающих при таких исследованиях, является наличие в плазме крови одновременно гликированного и негликированного альбумина, различающихся структурой и, следовательно, характеристиками люминесценции внедренных в них зондов. Кроме того, возможно изменение люминесценции зонда вследствие взаимодействия гликированного и негликированного альбумина между собой.

С целью изучения взаимодействия люминесцентного зонда эозина с гликированным и негликированными белками нами были проведены исследования спектрально-кинетических характеристик люминесцентного зонда эозина в растворах гликированных и негликированных САЧ, а также в смеси гликированных и негликированных САЧ.

1. Материалы и методы

В качестве люминесцентного зонда нами выбран наиболее перспективный зонд – эозин Y, который обладает довольно высоким квантовым выходом флуоресценции ($\Phi_{\text{фл}} = 0.67$) [21] и фосфоресценции 0.001 [22], а также эффективно

связывается с САЧ [23], поскольку является диахионом в водных средах.

Исследуемые растворы эозина концентрацией $4 \cdot 10^{-6}$ М готовили в фосфатном буфере pH 7.4. Выбор именно этой концентрации обусловлен тем, что при этом сведено к минимуму концентрационное тушение возбужденных синглетных и триплетных состояний эозина. Для наблюдения ЗФ и ФОСФ из раствора удаляли кислород. Удаление кислорода из исследуемых растворов производилось химическим способом [24–26] при помощи сульфита натрия (производство «Реахим», Россия, «ч.д.а.»), концентрация которого в растворе составляла 0.01 М. При выбранной концентрации сульфита натрия нами не наблюдалось образование фотохимических продуктов взаимодействия эозина с сульфитом натрия, изученных в работе [27], а также изменение свойств белков [28].

Нами исследовался транспортный белок – сывороточный альбумин человека. Он является наиболее распространенным белком в организме человека, что и определяет актуальность проведения исследований с использованием САЧ. САЧ содержит гидрофильные и одну гидрофобную группу, поэтому этот белок достаточно хорошо сорбирует используемые в работе молекулы эозина как в приповерхностном слое глобулы САЧ, так и в глубинных областях [29, 30]. В работе использован САЧ (Sigma Aldrich, США, каталожный номер A8763), а также гликированный САЧ (Sigma Aldrich, США, каталожный номер A8301, с содержанием 99% основного вещества), представляющий собой кристаллизованную структуру HSA со связанной глюкозой с открытой цепью (GLO) на участке Садлоу I.

САЧ и гСАЧ растворялись в фосфатном буфере, содержащем $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.15 М, pH 7.4. Концентрации САЧ и гСАЧ были выбраны равными 1 мг/мл. Такую концентрацию обычно используют при исследовании белков люминесцентными методами [31]. Для изучения взаимодействия гликированных белков с негликированными проводилось смешивание по объему САЧ и гСАЧ в отсутствие свободной глюкозы в соотношении 1 : 1.

Спектры люминесценции, замедленной флуоресценции (ЗФ) и фосфоресценции (ФОСФ) регистрировались на флуориметре Cary Eclipse (Agilent Technologies, USA), поляризационные спектры регистрировались на флуориметре LS55 (Perkin Elmer, USA).



2. Результаты

С целью изучения взаимодействия люминесцентного зонда эозина с гликированными и негликированными белками нами были получены спектры возбуждения и флуоресценции зонда эозина в САЧ, гСАЧ и смеси гСАЧ и САЧ состава 1 : 1 (рис. 1, 2).

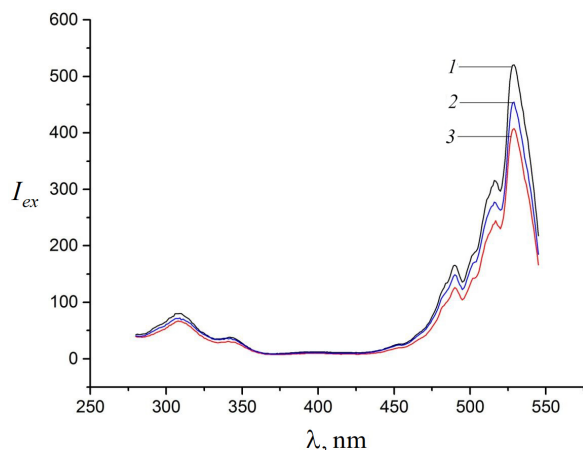


Рис. 1. Спектры возбуждения эозина ($\lambda_{\text{фл}} = 550$ нм): 1 – в смеси гСАЧ и САЧ, 2 – в САЧ и 3 – в гСАЧ

Fig. 1. Excitation spectra of eosin ($\lambda_{\text{fl}} = 550$ nm): 1 – in a mixture of gHSA and HSA, 2 – in HSA and 3 – in gHSA

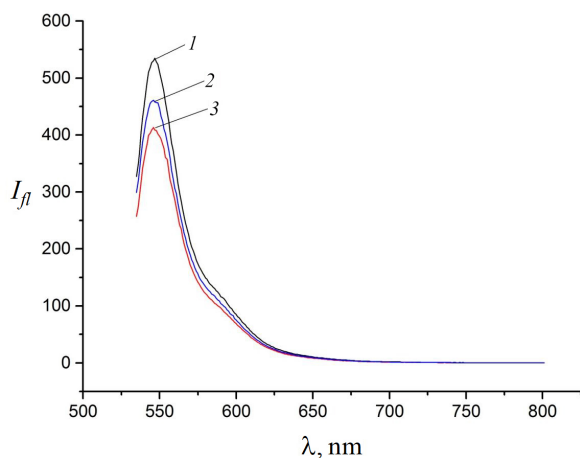


Рис. 2. Спектры флуоресценции эозина ($\lambda_{\text{возб}} = 530$ нм): 1 – в смеси гСАЧ и САЧ, 2 – в САЧ и 3 – в гСАЧ

Fig. 2. Fluorescence spectra of eosin ($\lambda_{\text{ex}} = 530$ nm): 1 – in a mixture of gHSA and HSA, 2 – in HSA and 3 – in gHSA

Из полученных спектров следует, что интенсивность флуоресценции изменяется при гликировании. В случае гликированного альбумина интенсивность уменьшается, что свидетельствует о наличии процессов тушения. В смеси альбуминов, как и следовало ожидать, наблюдается среднее значение интенсивности по отношению к исходным растворам.

При регистрации спектров замедленной флуоресценции и фосфоресценции картина изменяется (рис. 3). В смеси гликированного и негликированного альбумина интенсивность растет по сравнению с исходными растворами.

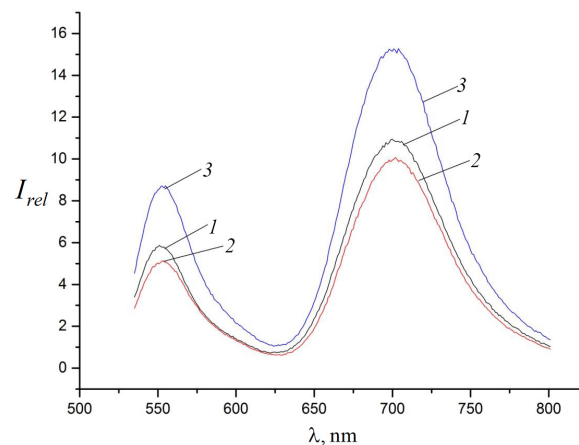


Рис. 3. Спектры замедленной флуоресценции ($\lambda_{\text{max}} = 560$ нм) и фосфоресценции ($\lambda_{\text{max}} = 700$ нм) эозина ($C = 4 \cdot 10^{-6}$ М): 1 – в САЧ ($C = 1.5 \cdot 10^{-5}$ М), 2 – в гСАЧ ($C = 1.5 \cdot 10^{-5}$ М), 3 – в смеси состава 1 : 1 САЧ ($C = 0.75 \cdot 10^{-5}$ М) и гСАЧ ($C = 0.75 \cdot 10^{-5}$ М)

Fig. 3. Spectra of delayed fluorescence ($\lambda_{\text{max}} = 560$ nm) and phosphorescence ($\lambda_{\text{max}} = 700$ nm) of eosin ($C = 4 \cdot 10^{-6}$ M): 1 – in HSA ($C = 1.5 \cdot 10^{-5}$ M), 2 – in gHSA ($C = 1.5 \cdot 10^{-5}$ M) and 3 – in a mixture of 1 : 1 HSA ($C = 0.75 \cdot 10^{-5}$ M) and gHSA ($C = 0.75 \cdot 10^{-5}$ M)

2.1. Изменения спектров образцов в результате гликирования

При гликировании наблюдаемое уменьшение интенсивности как ЗФ, так и ФОСФ эозина объясняется структурными перестройками гСАЧ, следствием которых являются изменения в первой сольватной оболочке молекул эозина, связанных с глобулами белка. Проникновение молекул воды [32] в первую координационную сферу молекул эозина, приводит к ускорению процессов дезактивации триплетных состояний молекул эозина, вследствие чего уменьшается интенсивность ЗФ и ФОСФ эозина.

Для определения констант затухания ЗФ и ФОСФ нами получены представленные на рис. 4 спектры люминесценции эозина для разных времен задержки регистрации после импульсного фотовозбуждения.

По полученным спектрам люминесценции построены зависимости интенсивности в максимуме спектров замедленной флуоресценции и фосфоресценции от времени задержки после импульсного возбуждения (рис. 5, а, б).

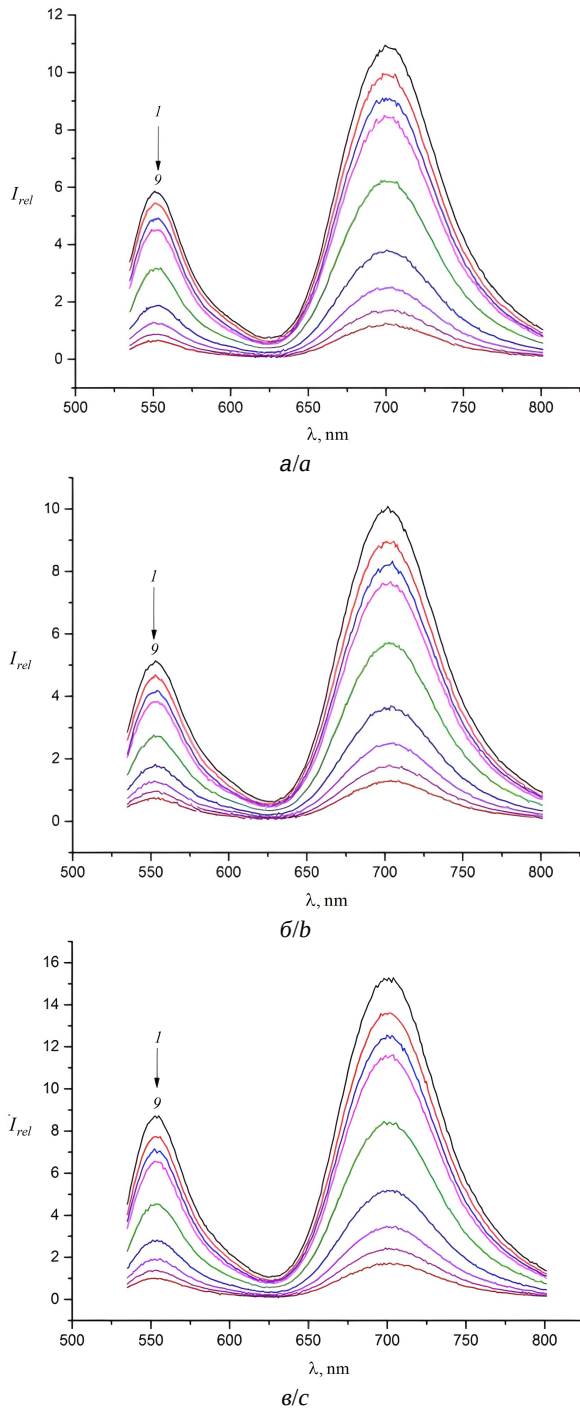


Рис. 4. Спектры замедленной флуоресценции ($\lambda_{\max} = 560$ нм) и фосфоресценции ($\lambda_{\max} = 700$ нм) эозина ($C = 4 \cdot 10^{-6}$ М) в растворах: а – в САЧ ($C = 1.5 \cdot 10^{-5}$ М); б – в гСАЧ ($C = 1.5 \cdot 10^{-5}$ М); в – в смеси состава 1 : 1 САЧ и гСАЧ при разных временах задержки после импульсного возбуждения; 1 – 0.2; 2 – 0.3; 3 – 0.4; 4 – 0.5; 5 – 1; 6 – 2; 7 – 3; 8 – 4; 9 – 5 мс

Fig. 4. Spectra of delayed fluorescence ($\lambda_{\max} = 560$ nm) and phosphorescence ($\lambda_{\max} = 700$ nm) of eosin ($C = 4 \cdot 10^{-6}$ M): а – in HSA ($C = 1.5 \cdot 10^{-5}$ M); б – in gHSA ($C = 1.5 \cdot 10^{-5}$ M); в – in a mixture of 1 : 1 HSA and gHSA at different delay times after pulse excitation; 1 – 0.2; 2 – 0.3; 3 – 0.4; 4 – 0.5; 5 – 1; 6 – 2; 7 – 3; 8 – 4; 9 – 5 ms

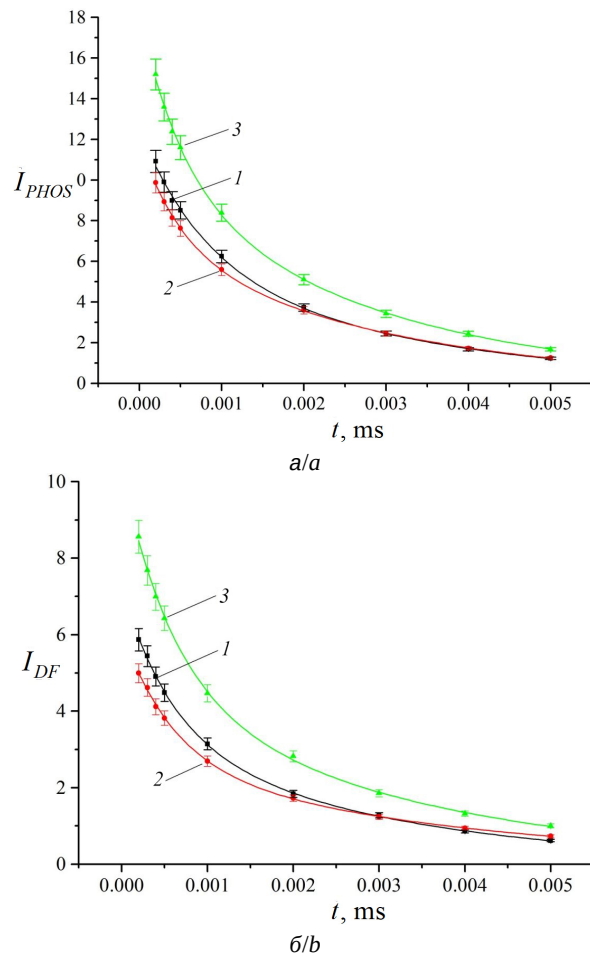


Рис. 5. Кинетика затухания: а – фосфоресценции, б – замедленной флуоресценции эозина в растворах: 1 – САЧ, 2 – гСАЧ и 3 – смеси состава 1 : 1 САЧ – гСАЧ. I_{PHOS} и I_{DF} – интенсивность в максимуме спектров фосфоресценции и ЗФ эозина

Fig. 5. Kinetics of attenuation of phosphorescence (а) and delayed eosin fluorescence (б) in solutions: 1 – HSA, 2 – gHSA, 3 – in a mixture of 1 : 1 HSA and gHSA. I_{PHOS} and I_{DF} are the intensity at the maximum of the phosphorescence and DF spectra of eosin

Полученные зависимости замедленной флуоресценции и фосфоресценции были аппроксимированы биэкспоненциальной зависимостью согласно уравнению

$$I_{PHOS, DF} = A_1 e^{-t/\tau_1} + A_2 e^{-t/\tau_2}, \quad (1)$$

где A_i – интенсивность люминесценции i -й компоненты при $t = 0$, τ_i – время затухания экспонент, соответствующее времени жизни соответствующего возбужденного состояния эозина, t – задержка регистрации после возбуждения флуоресценции. Для оценки относительного вклада экспонент результаты нормировались таким образом, чтобы $A_1 + A_2 = 1$.



Существует возможность того, что не весь эозин связан с молекулами альбуминов. Однако это не может повлиять на анализ полученных результатов. Согласно нашим данным, время затухания фосфоресценции эозина в фосфатном буфере равно 0.8 ± 0.4 мс. Но при той же концентрации эозина начальная интенсивность кривой затухания такой фосфоресценции составляет всего 4% от интенсивности фосфоресценции образцов с САЧ или гСАЧ. Учитывая, что часть эозина провзаимодействовала с молекулами альбумина, можно считать, что вклад фосфоресценции эозина в фосфатном буфере существенно меньше 4% от общей интенсивности и не должна приниматься во внимание.

Полученные результаты сведены в табл. 1.

Для объяснения биэкспоненциальной зависимости затухания люминесценции нами проведен анализ мест связывания эозина и глюкозы в глобуле альбумина.

В глобуле САЧ ($C = 1.8 \cdot 10^{-5}$ М), по аналогии с бенгальской розой [33], могут располагаться несколько молекул красителя эозина ($C = 4 \cdot 10^{-6}$ М). Согласно [34], при значениях рН 3.5–8.0 в связывании эозина с глобулой белка участвуют остатки лизина (через гидроксильную и карбоксильную группы группы эозина), также участвуют остатки треонина (через гидроксильную группу эозина) и глутаминовой кислоты (через гидроксильную и карбоксильную группы эозина). К участкам связывания с САЧ малых органических молекул, таких как эозин, относят сайт I и II [34, 35]. Расположенный в гидрофобной области сайт I находится в домене II альбумина САЧ, в него входят лизин (195, 199), треонин (125, 243), глутаминовая кислота (167, 244), глутамин (196), серин (202), аргинин (197, 218, 222, 257). Сайт II

находится в домене III молекулы САЧ, в него входит тирозин (411) и прилежащие к нему лейцин (413) и валин (415, 418). Эти аминокислоты расположены преимущественно в гидрофильном приповерхностном слое глобулы белка.

В работе [36] по результатам изучения триплет-триплетного переноса энергии между гидрофобным пиреном и эозином показано, что эозин может проникать в глубинные области САЧ, связываясь с лизином, находящимся вблизи гидрофобной области.

Таким образом, эозин при связывании с глобулой САЧ может локализоваться в доступном приповерхностном слое глобулы, связываясь с полярными аминокислотами, а также может проникать и в труднодоступные глубинные области, связываясь с аминокислотами вблизи гидрофобной области. При этом микроокружение молекул эозина будет разным. Это должно проявиться в спектрально-кинетических характеристиках эозина.

Наиболее вероятно, что быстрозатухающая компонента люминесценции обусловлена вкладом молекул, расположенных в приповерхностном слое глобулы. Наличие большого количества полярных аминокислот в гидрофильной области белка обеспечивает сосредоточение молекул эозина в приповерхностной гидрофильной области белка. Малое время жизни фосфоресценции и ЗФ локализованных в этой области молекул эозина свидетельствует об эффективной дезактивации триплетных состояний вследствие высокой полярности микроокружения, а также из-за проникновения молекул воды в гидрофильную область белка.

Нами сделано предположение, что в этих условиях возможен процесс переноса валентного

Таблица 1 / Table 1

Значения коэффициентов A_1 и A_2 для затухания интенсивностей ЗФ и ФОСФ эозина ($C = 4 \cdot 10^{-6}$ М) в фосфатном буфере; τ_1, τ_2 – времена затухания компонент ЗФ и ФОСФ после импульсного фотовозбуждения в САЧ, гСАЧ ($C = 1.5 \cdot 10^{-5}$ М) и их смеси 1 : 1

Values of coefficients A_1 and A_2 for quenching the intensities of DF and PHOS of eosin ($C = 4 \cdot 10^{-6}$ М) in the phosphate buffer; τ_1, τ_2 – lifetimes of the components of DF and PHOS after pulsed photoexcitation in HSA, gHSA ($C = 1.5 \cdot 10^{-5}$ М) and their mixture 1 : 1

Образец/ Sample	ФОСФ/PHOS				ЗФ/DF			
	A_1 ± 0.05	τ_1 $\pm 0.2,$ мс/мс	A_2 ± 0.04	τ_2 $\pm 0.1,$ мс/мс	A_1 ± 0.05	τ_1 $\pm 0.2,$ мс/мс	A_2 ± 0.04	τ_2 $\pm 0.1,$ мс/мс
САЧ/HSA	0.34	1.1	0.66	2.6	0.28	1.1	0.72	2.5
гСАЧ/gHSA	0.22	1.0	0.78	2.4	0.15	1.0	0.85	2.3
САЧ+гСАЧ/ HSA+gHSA	0.23	1.2	0.77	2.9	0.34	1.1	0.66	2.9



электрона с эозина в синглетном фотовозбужденном состоянии на молекулы воды, расположенные вблизи эозина в глобуле САЧ. Это предположение находится в соответствии с гипотезой, представленной в [37, 38], согласно которой вблизи аминогруппы ANS (N-phenyl-1-amino-8-sulphonaphthalene) образуется кластер из 3–4 молекул воды, и электрон возбужденного ANS переносится в водный кластер. В результате флуоресценция гасится. Н-связь является связующим звеном для такой передачи заряда. Подтверждением этого предположения является показанное нами равенство времен затухания короткоживущей компоненты люминесценции эозина, растворенного в буфере и в САЧ.

Малое значение времени жизни фосфоресценции и ЗФ эозина в гидрофильной области можно объяснить также высокой проницаемостью этой приповерхностной области глобулы САЧ для молекул остаточного кислорода после фотохимического обескислороживания которые являются эффективными тушителями триплетных состояний эозина.

Медленно затухающую компоненту следует отнести к люминесценции молекул эозина, находящихся в глубинных областях глобулы. Известно [39], что молекулы эозина могут располагаться в сайтах с высоким сродством к белку и относительно низкой микрополярностью (сайт I). Это возможно, если эозин связывается с лизином вблизи гидрофобной области САЧ. В пользу этого свидетельствуют результаты, полученные нами по наблюдению синглет-синглетного (триптофанил-эозин) и триплет-триплетного (антрацен-эозин, в глобуле белка) переноса энергии [36]. Окружающая среда, создаваемая участком сайт I, менее полярна и значительно менее доступна как для воды, так и для кислорода [39]. Вследствие этого время жизни фосфоресценции имеет большее значение по сравнению с временем жизни фосфоресценции и ЗФ эозина в воде и гидрофильной области САЧ (см. табл. 1).

Времена жизни замедленной флуоресценции и фосфоресценции эозина уменьшаются при переходе от САЧ к гликированным САЧ. Это можно объяснить изменением микроокружения молекул эозина вследствие изменения структуры белка под влиянием процесса гликирования. В результате изменения структуры САЧ ионы эозина становятся более доступными для молекул воды раствора, что приводит к увеличению вероятности процессов безызлучательной дезактивации энергии триплетных состояний молекул

эозина, ответственных за излучения ЗФ и ФОСФ. Наличие в областях связывания глюкозы заряженных участков в гидрофобных областях глобулы САЧ приводит к возможности локализации эозина в непосредственной близости от связанной с белком глюкозы [40].

Установлено [41], что изменения в спектре флуоресценции, наблюдаемые в гликозилированном человеческом сывороточном альбумине, отражают изменения в микроокружении триптофанила, который находится в поддоменах ПА и/или IB, IBV и IIIA вблизи лизина. Можно предположить, что это же приводит к изменению интенсивности наблюдаемой нами замедленной флуоресценции и фосфоресценции ионов эозина, расположенных в этих же поддоменах.

2.2. Спектры эозина в смеси альбуминов

Если раствор содержит смесь гСАЧ и САЧ, нами наблюдалось возрастание интенсивности и времени жизни ЗФ и фосфоресценции эозина по сравнению с результатами в САЧ и гСАЧ. Для объяснения этого нами предложена модель их связывания с образованием комплексов состава гСАЧ-САЧ.

Спектральные приборы с дифракционной решеткой, в том числе и используемые нами, поляризуют проходящий через них свет. В флуориметрах таких устройств два: монохроматоры для возбуждающего света и для люминесценции. В результате исследуемый образец облучается поляризованным вертикально светом, а монохроматор для анализа спектров люминесценции является анализатором, ось поляризации которого тоже расположена вертикально. Молекулы эозина и САЧ в растворе могут свободно перемещаться, в том числе и вращаться. Вследствие этого интенсивность регистрируемой люминесценции зависит от угла поворота оси возбужденного диполя, на который он повернулся от момента возбуждения до момента люминесценции. Чем больше угол поворота, тем меньше регистрируемая люминесценция. В случае флуоресценции время жизни возбужденного состояния эозина настолько мало, что можно считать угол поворота пренебрежимо малым. В результате наблюдаются истинные концентрационные зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации, типа и состояния флуорофора. Время жизни триплетных состояний существенно больше, поэтому угол поворота увеличивается, и интенсивности спектров замедленной флуоресценции и фосфоресценции зависят от угла поворота диполя. Вра-



щательная подвижность предполагаемого нами комплекса САЧ-гСАЧ гораздо меньше, чем отдельно глобул САЧ и гСАЧ, поэтому угол поворота меньше. Это приводит к тому, что интенсивность полос в спектрах смеси альбуминов выше, чем в САЧ или гСАЧ.

Наличие биэкспоненциальной зависимости в кинетике затухания люминесценции свидетельствует о том, что эозин также локализуется в двух местах связывания, описанных выше. Однако из-за больших размеров подвижность этого комплекса меньше, чем глобул САЧ и гСАЧ, и, следовательно, уменьшается вероятность встреч эозина с молекулами тушителя триплетных состояний – остаточного кислорода по сравнению с водным раствором эозина, а также САЧ и гСАЧ. Этим можно объяснить увеличение времени жизни люминесценции эозина в смеси (см. табл. 1).

С целью подтверждения предположения образования комплекса гСАЧ-САЧ нами были определены значения анизотропии ЗФ и ФОСФ эозина в САЧ, гСАЧ и смеси гСАЧ-САЧ при разных положениях поляризаторов. Для расчета значений анизотропии было использовано уравнение [42, 43].

$$r = \frac{I_{vv} - k \cdot I_{vh}}{I_{vv} + 2 \cdot k \cdot I_{vh}}, \quad (2)$$

где коэффициент k определяется отношение $k = I_{hv}/I_{hh}$; I_{vv} – интенсивность максимума люминесценции эозина при вертикальной ориентации поляризаторов в канале возбуждения и в канале регистрации излучения эозина; I_{hv} – интенсивность максимума люминесценции эозина при горизонтальной ориентации поляризатора в канале возбуждения и вертикальной ориентации поляризатора в канале регистрации люминесценции; I_{vh} – интенсивность максимума люминесценции эозина при вертикальной ориентации поляризатора в канале возбуждения и горизонтальной ориентации поляризатора в канале регистрации

излучения; I_{hh} – интенсивность максимума люминесценции эозина при горизонтальной ориентации поляризаторов возбуждения и излучения. Результаты представлены в табл. 2.

Погрешность определения анизотропии люминесценции составляет 0.05.

Из табл. 2 следует, что при переходе от растворов, содержащих САЧ, к смеси гСАЧ и САЧ наблюдается возрастание анизотропии ЗФ и фосфоресценции эозина, связанного с комплексом гСАЧ-САЧ. Полученные результаты подтверждают меньшую вращательную подвижность комплекса по сравнению с САЧ и гСАЧ

Нами также экспериментально получено значение анизотропии флуоресценции эозина в водном растворе pH 7.4, которое оказалось равным 0.004, что хорошо согласуется с данными, полученными в работе [44].

Выводы

1. Получены спектрально-кинетические характеристики люминесцентного зонда – эозина, нековалентно связанного с глобулами САЧ и гСАЧ. Установлено, что при переходе от САЧ к гСАЧ наблюдается уменьшение интенсивности и времени жизни замедленной флуоресценции и фосфоресценции эозина. Показано, что это объясняется увеличением вероятности безызлучательных процессов дезактивации энергии электронного возбуждения эозина, вследствие структурных перестроек САЧ при гликировании.

2. Обнаружено значительное возрастание интенсивности и времени жизни фосфоресценции эозина в растворе, содержащем смесь гликированного и негликированного САЧ. Предположено, что это связано с образованием комплекса состава гСАЧ-САЧ. Таким образом, увеличение интенсивности люминесценции эозина свидетельствует о связывании гликированного САЧ с негликированным. Полученную зависимость интенсивности и времени жизни люминесценции можно

Таблица 2 / Table 2

Значения анизотропии ЗФ (r_{DF}) и ФОСФ (r_{PHOS}) эозина ($C = 4 \cdot 10^6$ М) в растворе САЧ, смеси гСАЧ-САЧ (состава 1 : 1) и в растворе гликированного САЧ (гСАЧ)
Values of the anisotropy of DF (r_{DF}) and PHOS (r_{PHOS}) of eosin ($C = 4 \cdot 10^6$ M) in a solution of HSA, a mixture of gHSA-HSA (composition 1 : 1) and in a solution of glycosylated HSA (gHSA)

Среда/Solution	r_{DF}	r_{PHOS}
САЧ/HSA	0.43	0.37
гСАЧ/gHSA	0.47	0.62
САЧ+гСАЧ/HSA + gHSA	0.52	0.69



использовать для обнаружения наличия комплекса гликированных с негликированными белками в плазме крови человека.

Список литературы

1. Xu J. F., Yang Y. S., Jiang A. Q., Zhu H. L. Detection Methods and Research Progress of Human Serum Albumin // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2022. Vol. 52, № 1. P. 72–92. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1789835>
2. Waiwinya W., Putnin T., Pimalai D., Chawjiraphan W., Sathirapongsasuti N., Japrunng D. Immobilization-Free Electrochemical Sensor Coupled with a Graphene-Oxide-Based Aptasensor for Glycated Albumin Detection // *J. Biosensors.* 2021. Vol. 11, iss. 3. Article number 85. <https://doi.org/10.3390/bios11030085>
3. Soboleva A., Mavropulo-Stolyarenko G., Karonova T., Thieme D., Hoehenwarter W., Ihling C., Stefanov V., Grishina T., Frolov A. Multiple Glycation Sites in Blood Plasma Proteins as an Integrated Biomarker of Type 2 Diabetes Mellitus // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, № 9. Article number 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms20092329>
4. Wang S. H., Wang T. F., Wu C. H., Chen S. H. In-Depth Comparative Characterization of Hemoglobin Glycation in Normal and Diabetic Bloods by LC-MSMS // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2014. Vol. 25, № 5. P. 758–766. <https://doi.org/10.1007/s13361-014-0830-2>
5. Wolever T. M., Miller J. B. Sugars and blood glucose control // *Am. J. Clin. Nutr.* 1995. Vol. 62, iss. 1. P. 212S–221S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/62.1.212S>
6. Belaya Z. E., Smirnova O. M., Dedov I. I. Role of exercises in health and in diabetes mellitus // *Problems of Endocrinology.* 2005. Vol. 51, № 2. P. 28–37. <https://doi.org/10.14341/probl200551228-37>
7. Porte D., Sherwin R., Baron A., Ellenberg M., Rifkin H. Ellenberg and Rifkin's Diabetes Mellitus. Theory and Practice // *Medicine, Biology.* 1992. Vol. 2, № 2. P. 139–140. <https://doi.org/10.1097/00019616-199203000-00013>
8. Muijs L. T., Racca R., Wit M., Brouwer A., Wieringa T. H., Vries R., Serné E. H., Raalte D. H., Rutters F., Snoek F. J. Glucose variability and mood in adults with diabetes: A systematic review // *Endocrinol Diabetes Metab.* 2020. Vol. 4, № 1. Article number edm2.152. <https://doi.org/10.1002/edm2.152>
9. Данилова Л. А. Гликированные протеины // *Педиатр.* 2019. Т. 10, № 5. С. 79–86. <https://doi.org/10.17816/PED10579-86>
10. Roohk H. V., Zaidi A. R. A review of glycated albumin as an intermediate glycation index for controlling diabetes // *J. Diabetes Sci. Technol.* 2008. Vol. 2, № 6. P. 1114–1121. <https://doi.org/10.1177/193229680800200620>
11. Guerin-Dubourg A., Catan A., Bourdon E. Structural modifications of human albumin in diabetes // *Diabetes Metab.* 2012. Vol. 38, № 2. P. 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2011.11.002>
12. Cohen M. Perspective: Measurement of circulating glycated proteins to monitor intermediate term changes in glycaemic control // *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1992. Vol. 30, № 12. P. 851–859.
13. Anguizola J., Matsuda R., Barnaby O. S., Hoy K. S., Wa C., DeBolt E., Koke M., Hage D. S. Review: Glycation of human serum albumin // *Clin. Chim. Acta.* 2013. Vol. 425. P. 64–76. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.07.013>
14. Takahashi S., Uchino H., Shimizu T., Kanazawa A., Tamura Y., Sakai K., Watada H., Hirose T., Kawamori R., Tanaka Y. Comparison of Glycated Albumin (GA) and Glycated Hemoglobin (HbA1c) in Type 2 Diabetic Patients: Usefulness of GA for Evaluation of Short-term Changes in Glycemic Control // *J. Endocrine.* 2007. Vol. 54, № 1. P. 139–144 <https://doi.org/10.1507/endocrj.K06-103>
15. Welsh K. J., Kirkman M. S., Sacks D. B. Role of Glycated Proteins in the Diagnosis and Management of Diabetes: Research Gaps and Future Directions // *Diabetes Care.* 2016. Vol. 39. P. 1299–1306. <https://doi.org/10.2337/dc15-2727>
16. Снасов А. А., Раценко А. И. Терапевтический потенциал разрывателей поперечных сшивок гликированных белков // *Вестник ВолГМУ.* 2016. Вып. 1, № 57. С. 12–15.
17. Демченко А. П. Люминесценция и динамика структуры белков / АН УССР, Ин-т биохимии им. А. В. Палладина. Киев : Наук. думка, 1988. 276 с.
18. Mazhul V. M., Zaitseva E. M., Shcherbin D. G. Intramolecular dynamics and functional activity of proteins // *Biophysics.* 2000. Vol. 45, № 6. P. 965–989.
19. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. М. : Наука, 1989. 277 с. <https://elibrary.ru/item.asp?id=25827223>
20. Baranov A. N., Vlasova I. M., Mikrin V. E., Saletskii A. M. Laser correlation spectroscopy of the processes of serum albumin denaturation // *Journal of Applied Spectroscopy.* 2004. Vol. 71, № 6. P. 911–915. <https://doi.org/10.1007/s10812-005-0021-9>
21. Seybold P. G., Gouterman M., Callis J. B. Calorimetric, photometric and lifetime determinations of fluorescence yields of fluorescein dyes // *Photochemistry and Photobiology.* 1969. Vol. 9, № 3. P. 229–242. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1969.tb07287.x>
22. Cherry R. J., Cogoli A., Oppliger M., Schneider G., Semenza G. A spectroscopic technique for measuring slow rotational diffusion of macromolecules. 1: Preparation and properties of a triplet probe // *Biochemistry.* 1976. Vol. 15, № 17. P. 3653–3656. <https://doi.org/10.1021/bi00662a001>
23. Котельников А. И., Кузнецов С. Н., Фогель В. Р., Лихтенштейн Г. И. Исследование микроструктуры биологических систем методом триплетных меток // *Молекулярная биология.* 1979. Т. 13, № 1. С. 152–159.
24. Мажуль В. М., Зайцева Е. М., Щербин Д. Г. Фосфоресценция при комнатной температуре триптофановых остатков белков // *Журнал прикладной спектроскопии.* 2002. Т. 69, № 2. С. 186–191.
25. Perez-Ruiz T., Martinez-Lozano C., Tomas V., Martin J. Determination of allopurinol by micelle-stabilised room-temperature phosphorescence in real samples // *Journal of*



- Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2003. Vol. 32, № 2. P. 225–231.
26. Мажуль В. М., Зайцева Е. М., Мицкевич Л. Г., Федуркина Н. В., Курганов Б. И. Фосфоресцентный анализ внутри молекулярной динамики мышечной гликогенфосфорилазы b // Биофизика. 1999. Т. 44, № 6. С. 1010–1016.
 27. Иванов В. Л., Артюхин А. Б., Ляшкевич С. Ю. Фотозамещение атомов галогена в галогенозамещенных ксантеновых красителях в водном растворе сульфата натрия // Вестник Московского университета. Химия. 1999. Т. 40, № 3. С. 198–200.
 28. Кананович С. Ж., Мажуль В. М. Люминесцентный анализ структурно-динамического состояния щелочной фосфатазы Escherichia coli // Журн. прикл. спектроскопии. 2003. Т. 70, № 5. С. 673–677.
 29. Mishra V., Heath R. J. Structural and Biochemical Features of Human Serum Albumin Essential for Eukaryotic Cell Culture // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22, № 16. Article number 8411. <https://doi.org/10.3390/ijms22168411>
 30. Ghuman J., Zunszain P. A., Petitpas I., Bhattacharya A. A., Otagiri M., Curry S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin // J. Mol. Biol. 2005. Vol. 353. P. 38–52. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.075>
 31. Xu J., Wang M., Zheng Y., Tang L. Spectroscopic Technique-Based Comparative Investigation on the Interaction of Theaflavins with Native and Glycated Human Serum Albumin // J. Molecules. 2019. Vol. 24, № 17. Article number 3171. <https://doi.org/10.3390/molecules24173171>
 32. Кецле Г. А., Левшин Л. В., Мельников Г. В., Салецкий А. М. Спектрально-люминесцентное исследование сольватации молекул эозина в водно-спиртовых растворах // Журн. прикл. спектроскопии. 1987. Т. 46, № 5. С. 746–750.
 33. Alarcón E., Edwards A. M., Aspée A., Borsarelli C. D., Lissi A. D. Photophysics and photochemistry of rose bengal bound to human serum albumin Photochem // Photobiol. Sci. 2009. Vol. 8, № 7. P. 933–943. <https://doi.org/10.1039/B901056D>
 34. Vlasova I. M., Polyansky D. V., Saletsky A. M. Investigation of mechanism of binding of molecular probe eosin to human serum albumin by Raman spectroscopy method // Laser Physics Letters. 2007. Vol. 4, № 5. P. 390–395.
 35. Yang Q., Zhou X., Chen X. Combined molecular docking and multi-spectroscopic investigation on the interaction between Eosin B and human serum albumin // Journal of Luminescence. 2011. Vol. 131, № 4. P. 581–586. <https://doi.org/10.1016/j.jlum.2010.10.033>
 36. Melnikov A. G., Pravdin A. B., Kochubey V. I., Kuptsova A. V., Melnikov G. V. Interglobular Diffusion of an Energy Donor in Triplet-Triplet Energy Transfer in Proteins // Journal of Spectroscopy. 2013. Vol. 2013. Article ID 261874. <https://doi.org/10.1155/2013/261874>
 37. Dobretsov G. E., Syrejschikova T. I., Smolina N. V., Uzbekov M. G. CAPIDAN, a fluorescent reporter for detection of albumin drug-binding site changes: monograph. Chapter 7. In: Human Serum Albumin (HSA): Functional Structure, Synthesis and Therapeutic Uses / ed. Travis Stokes. New York : Nova Science Publishers, Inc., 2015. P. 129–271.
 38. Romanov A. N., Gularyan S. K., Polyak B. M., Sakovich R. A., Dobretsov G. E., Sarkisov O. M. Electronically excited states of membrane fluorescent probe 4-dimethylaminochalcone. Results of quantum chemical calculations // Phys. Chem. Chem. Phys. 2011. Vol. 13, № 20. P. 9518–9524. <https://doi.org/10.1039/c0cp02880k>
 39. Alarcón E., Edwards A. M., Aspee A., Moran F. E., Borsarelli C. D., Lissi A. E., Gonzalez-Nilo D., Poblete H., Scaiano J. C. Photophysics and photochemistry of dyes bound to human serum albumin are determined by the dye localization // Photochem. Photobiol. Sci. 2010. Vol. 9, iss. 1. P. 93–102. <https://doi.org/10.1039/b9pp00091g>
 40. Ranganarayanan P., Thanigesan N., Ananth V., Jayaraman V. K., Ramakrishnan V. Identification of Glucose-Binding Pockets in Human Serum Albumin Using Support Vector Machine and Molecular Dynamics Simulations // IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform. 2016. Vol. 13, № 1. P. 148–157. <https://doi.org/10.1109/TCBB.2015.2415806>
 41. Szkudlarek A., Maciążek-Jurczyk M., Chudzik M., Równicka-Zubik J., Sułkowska A. Alteration of human serum albumin tertiary structure induced by glycation. Spectroscopic study // Spectrochim. Acta. A Mol. Biomol. Spectrosc. 2016. Vol. 153. P. 560–565. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.09.018>
 42. Lakowicz J. R. Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd ed. Berlin : Springer, 2006. 673 p. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>
 43. Feinstein E., Deikus G., Rusinova E., Rachofsky E. L., Alexander Ross J. B., Laws W. R. Constrained Analysis of Fluorescence Anisotropy Decay: Application to Experimental Protein Dynamics // J. Biophys. 2003. Vol. 84, № 1. P. 599–611. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74880-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74880-2)
 44. Volkova O. I., Kuleshova A. A., Korvatovskii B. N., Saletsky A. M. Photophysical Processes in Molecules of Halogenated Fluorescein Derivatives in Anionic Reverse Micelles // Optics and Spectroscopy. 2020. Vol. 128, № 12. P. 1970–1977. <https://doi.org/10.1134/S0030400X2012108X>

References

1. Xu J. F., Yang Y. S., Jiang A. Q., Zhu H. L. Detection Methods and Research Progress of Human Serum Albumin. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2022, vol. 52, no. 1, pp. 72–92. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1789835>
2. Waiwinya W., Putnin T., Pimalai D., Chawjiraphan W., Sathirapongsasuti N., Japrunng D. Immobilization-Free Electrochemical Sensor Coupled with a Graphene-Oxide-Based Aptasensor for Glycated Albumin Detection. *J. Biosensors*, 2021, vol. 11, iss. 3, article no. 85. <https://doi.org/10.3390/bios11030085>
3. Soboleva A., Mavropulo-Stolyarenko G., Karonova T., Thieme D., Hoehenwarter W., Ihling C., Stefanov V.,



- Grishina T., Frolov A. Multiple Glycation Sites in Blood Plasma Proteins as an Integrated Biomarker of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 20, no. 9, article no. 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms20092329>
4. Wang S. H., Wang T. F., Wu C. H., Chen S. H. In-Depth Comparative Characterization of Hemoglobin Glycation in Normal and Diabetic Bloods by LC-MSMS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2014, vol. 25, no. 5, pp. 758–66. <https://doi.org/10.1007/s13361-014-0830-2>
 5. Wolever T. M., Miller J. B. Sugars and blood glucose control. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1995, vol. 62, iss. 1, pp. 212S–221S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/62.1.212S>
 6. Belaya Z. E., Smirnova O. M., Dedov I. I. Role of exercises in health and in diabetes mellitus. *Problems of Endocrinology*, 2005, vol. 51, no. 2, pp. 28–37. <https://doi.org/10.14341/probl200551228-37>
 7. Porte D., Sherwin R., Baron A., Ellenberg M., Rifkin H. Ellenberg and Rifkin's Diabetes Mellitus. Theory and Practice. *Medicine, Biology*, 1992, vol. 2, no. 2, pp. 139–140. <https://doi.org/10.1097/00019616-199203000-00013>
 8. Muijs L. T., Racca R., Wit M., Brouwer A., Wieringa T. H., Vries R., Serné E. H., Raalte D. H., Rutters F., Snoek F. J. Glucose variability and mood in adults with diabetes: A systematic review. *Endocrinol Diabetes Metab.*, 2020, vol. 4, no. 1, article no. edm2.152. <https://doi.org/10.1002/edm2.152>
 9. Danilova L. A. Glycated proteins. *Pediatrician (St. Petersburg)*, 2019, vol. 10, no. 5, pp. 79–86 (in Russian). <https://doi.org/10.17816/PED10579-86>
 10. Roohk H. V., Zaidi A. R. A review of glycated albumin as an intermediate glycation index for controlling diabetes. *J. Diabetes Sci. Technol.*, 2008, vol. 2, no. 6, pp. 1114–1121. <https://doi.org/10.1177/193229680800200620>
 11. Guerin-Dubourg A., Catan A., Bourdon E. Structural modifications of human albumin in diabetes. *Diabetes Metab.*, 2012, vol. 38, no. 2, pp. 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2011.11.002>
 12. Cohen M. Perspective: Measurement of circulating glycated proteins to monitor intermediate term changes in glycaemic control. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1992, vol. 30, no. 12, pp. 851–859.
 13. Anguizola J., Matsuda R., Barnaby O. S., Hoy K. S., Wa C., DeBolt E., Koke M., Hage D. S. Review: Glycation of human serum albumin. *Clin. Chim. Acta*, 2013, vol. 425, pp. 64–76. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.07.013>
 14. Takahashi S., Uchino H., Shimizu T., Kanazawa A., Tamura Y., Sakai K., Watada H., Hirose T. Kawamori R., Tanaka Y. Comparison of Glycated Albumin (GA) and Glycated Hemoglobin (HbA1c) in Type 2 Diabetic Patients: Usefulness of GA for Evaluation of Short-term Changes in Glycemic Control. *J. Endocrine*, 2007, vol. 54, no. 1, pp. 139–144. <https://doi.org/10.1507/endocrj.K06-103>
 15. Welsh K. J., Kirkman M. S., Sacks D. B. Role of Glycated Proteins in the Diagnosis and Management of Diabetes: Research Gaps and Future Directions. *Diabetes Care*, 2016, vol. 39, pp. 1299–1306. <https://doi.org/10.2337/dc15-2727>
 16. Spasov A. A., Rashchenko A. I. Therapeutic potential of crosslink breakers. *Journal of Volgograd State Medical University*, 2016, iss. 1, no. 57, pp. 12–15 (in Russian).
 17. Demchenko A. P. *Lyminestsentsiya i dinamika struktury belkov* [Luminescence and Dynamics of Protein Structure]. Kiev, Naukova Dumka, 1988. 276 p. (in Russian).
 18. Mazhul V. M., Zaitseva E. M., Shcherbin D. G. Intramolecular dynamics and functional activity of proteins. *Biophysics*, 2000, vol. 45, no. 6, pp. 965–989.
 19. Dobretsov G. E. *Fluorestsentnye zondy v issledovanii kletok, membran i lipoproteinov* [Fluorescent probes in the study of cells, membranes and lipoproteins]. Moscow, Nauka, 1989. 277 p. (in Russian).
 20. Baranov A. N., Vlasova I. M., Mikrin V. E., Saletskii A. M. Laser correlation spectroscopy of the processes of serum albumin denaturation. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2004, vol. 71, no. 6, pp. 911–915. <https://doi.org/10.1007/s10812-005-0021-9>
 21. Seybold P. G., Gouterman M., Callis J. B. Calorimetric, photometric and lifetime determinations of fluorescence yields of fluorescein dyes. *Photochemistry and Photobiology*, 1969, vol. 9, no. 3, pp. 229–242. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1969.tb07287.x>
 22. Cherry R. J., Cogoli A., Oppliger M., Schneider G., Semenza G. A spectroscopic technique for measuring slow rotational diffusion of macromolecules. 1: Preparation and properties of a triplet probe. *Biochemistry*, 1976, vol. 15, no. 17, pp. 3653–3656. <https://doi.org/10.1021/bi00662a001>
 23. Kotelnikov A. I., Kuznetsov S. N., Vogel V. R., Likhtenshtein G. I. Investigation of the microstructure of biological systems by the method of triplet labels. *Molecular Biology*, 1979, vol. 13, no. 1, pp. 152–159 (in Russian).
 24. Mazhul V. M., Zaitseva E. M., Shcherbin D. G. Phosphorescence at room temperature of tryptophan residues of proteins. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2002, vol. 69, no. 2, pp. 186–191 (in Russian).
 25. Perez-Ruiz T., Martinez-Lozano C., Tomas V., Martin J. Determination of allopurinol by micelle-stabilised room-temperature phosphorescence in real samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003, vol. 32, no. 2, pp. 225–231.
 26. Mazhul V. M., Zaitseva E. M., Mickiewicz L. G., Fedurkina N. V., Kurganov B. I. Phosphorescent analysis of the intramolecular dynamics of the muscle glycogen phosphorylase b. *Biophysics*, 1999, vol. 44, no. 6, pp. 1010–1016 (in Russian).
 27. Ivanov V. L., Artyukhin A. B., Lyashkevich S. Yu. Photo substitution of halogen atoms in halogen-substituted xanthene dyes in an aqueous solution of sodium sulfite. *Bulletin of the Moscow University. Chemistry*, 1999, vol. 40, no. 3, p. 198–200. (in Russian).
 28. Kananovich S. Zh., Mazhul V. M. Luminescent analysis of the structural and dynamic states of alkaline phosphatase *Escherichia coli*. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2003, vol. 70, no. 5, pp. 673–677 (in Russian).



29. Mishra V., Heath R. J. Structural and Biochemical Features of Human Serum Albumin Essential for Eukaryotic Cell Culture. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, no. 16, article no. 8411. <https://doi.org/10.3390/ijms22168411>
30. Ghuman J., Zunszain P. A., Petitpas I., Bhattacharya A. A., Otagiri M., Curry S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J. Mol. Biol.*, 2005, vol. 353, pp. 38–52. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.075>
31. Xu J., Wang M., Zheng Y., Tang L. Spectroscopic Technique-Based Comparative Investigation on the Interaction of Theaflavins with Native and Glycated Human Serum Albumin. *J. Molecules*, 2019, vol. 24, no. 17, article no. 3171. <https://doi.org/10.3390/molecules24173171>
32. Ketsle G. A., Levshin L. V., Melnikov G. V., Saletsky A. M. Spectral-luminescent investigation of solvation of eosin molecules in aqueous-alcoholic solutions. *Journal of Applied Spectroscopy*, 1987, vol. 46, no. 5, pp. 746–750 (in Russian).
33. Alarcón E., Edwards A. M., Aspée A., Borsarelli C. D., Lissi A. D. Photophysics and photochemistry of rose bengal bound to human serum albumin. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2009, vol. 8, no. 7, pp. 933–943. <https://doi.org/10.1039/B901056D>
34. Vlasova I. M., Polyansky D. V., Saletsky A. M. Investigation of mechanism of binding of molecular probe eosin to human serum albumin by Raman spectroscopy method. *Laser Physics Letters*, 2007, vol. 4, no. 5, pp. 390–395.
35. Yang Q., Zhou X., Chen X. Combined molecular docking and multi-spectroscopic investigation on the interaction between Eosin B and human serum albumin. *Journal of Luminescence*, 2011, vol. 131, no. 4, pp. 581–586. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2010.10.033>
36. Melnikov A. G., Pravdin A. B., Kochubey V. I., Kuptsova A. V., Melnikov G. V. Interglobular Diffusion of an Energy Donor in Triplet-Triplet Energy Transfer in Proteins. *Journal of Spectroscopy*, 2013, vol. 2013, article ID 261874. <https://doi.org/10.1155/2013/261874>
37. Dobretsov G. E., Syrejschikova T. I., Smolina N. V., Uzbekov M. G. CAPIDAN, a fluorescent reporter for detection of albumin drug-binding site changes: monograph. Chapter 7. In: Travis Stokes, ed. *Human Serum Albumin (HSA): Functional Structure, Synthesis and Therapeutic Uses*. New York, Nova Science Publishers, Inc., 2015, pp. 129–271.
38. Romanov A. N., Gularyan S. K., Polyak B. M., Sakovich R. A., Dobretsov G. E., Sarkisov O. M. Electronically excited states of membrane fluorescent probe 4-dimethylaminochalcone. Results of quantum chemical calculations. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, vol. 13, no. 20, pp. 9518–9524. <https://doi.org/10.1039/c0cp02880k>
39. Alarcón E., Edwards A. M., Aspee A., Moran F. E., Borsarelli C. D., Lissi A. E., Gonzalez-Nilo D., Poblete H., Scaiano J. C. Photophysics and photochemistry of dyes bound to human serum albumin are determined by the dye localization. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2010, vol. 9, no. 1, pp. 93–102. <https://doi.org/10.1039/b9pp00091g>
40. Ranganarayanan P., Thanigesan N., Ananth V., Jayaraman V. K., Ramakrishnan V. Identification of Glucose-Binding Pockets in Human Serum Albumin Using Support Vector Machine and Molecular Dynamics Simulations. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.*, 2016, vol. 13, iss. 1, pp. 148–157. <https://doi.org/10.1109/TCBB.2015.2415806>
41. Szkudlarek A., Maciążek-Jurczyk M., Chudzik M., Równicka-Zubik J., Sułkowska A. Alteration of human serum albumin tertiary structure induced by glycation. Spectroscopic study. *Spectrochim Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2016, vol. 153, pp. 560–565. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.09.018>
42. Lakowicz J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. Springer, Berlin, 2006. 673 p. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>
43. Feinstein E., Deikus G., Rusinova E., Rachofsky E. L., Alexander Ross J. B., Laws W. R. Constrained Analysis of Fluorescence Anisotropy Decay: Application to Experimental Protein Dynamics. *J. Biophys.*, 2003, vol. 84, no. 1, pp. 599–611. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74880-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74880-2)
44. Volkova O. I., Kuleshova A. A., Korvatovskii B. N., Saletsky A. M. Photophysical Processes in Molecules of Halogenated Fluorescein Derivatives in Anionic Reverse Micelles. *Optics and Spectroscopy*, 2020, vol. 128, no. 12, pp. 1970–1977. <https://doi.org/10.1134/S0030400X2012108X>

Поступила в редакцию 04.07.2023; одобрена после рецензирования 30.09.2023; принята к публикации 12.10.2023
The article was submitted 04.07.2023; approved after reviewing 30.09.2023; accepted for publication 12.10.2023