

УДК 539.23, 53.082.5

PACS 78.20.-e

DOI: 10.24144/2415-8038.2016.40.41-47

I. I. Трикур, I. I. Сакалош, М. Ю. Січка, С. О. Корпош, В. М. Різак

Ужгородський національний університет, 88000, Ужгород, вул. Волошина, 54

e-mail: [ivan.trykur@teib.info](mailto:ivan.trykur@teib.info)

## ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ РІВНЯ рН ОТОЧУЮЧОГО СЕРЕДОВИЩА НА ДИНАМІКУ ФОТОІНДУКОВАНИХ ЗМІН У ПЛІВКАХ БАКТЕРІОРОДОПСИНУ

Проведено дослідження впливу рівня рН навколишнього середовища на динаміку фотоіндукованих змін у плівках бактеріородопсину. Показано що при короткочасній дії лужного середовища спостерігається зростання часу життя інтермедіату  $M_{412}$ . На основі отриманих результатів запропоновано механізм впливу рН на оптичні властивості плівкових структур на основі бактеріородопсину.

**Ключові слова:** бактеріородопсин, рН, плівкові структури, фотоіндуковані зміни, фотоцикл, інтермедіат.

### Вступ

У сучасній медицині перевага віддається малоінвазивним та безпечним і в той же час інформативним методам діагностики. Одним з таких методів може виступати прицільна рН-метрія. Показник рівня рН та динаміка його зміни для фізіологічних рідин дає точну і динамічну інформацію про функціонування окремих систем організму і гомеостазу в цілому. Альтернативою традиційним методам рН-метрії є використання біосенсорних пристроїв. Чутливим елементом такого роду датчиків може виступати нано-композитна плівка на основі фотохромних молекул бактеріородопсину (БР). Оскільки у процесі проходження фотоциклу відбувається випускання протону з одного боку молекули і захоплення його з іншого [1], очевидним є той факт, що концентрація активних іонів водню в середовищі яке оточує плівку БР буде впливати на проходження фотоциклу і, як наслідок, на її оптичні властивості. В свою чергу, контроль зміни параметрів фотоциклу у плівках БР під дією зміни кількості іонів водню може бути покладений в основу методики контролю рівня рН середовища. Дослідженню цього питання і присвячена дана публікація.

### Методи і матеріали

Для досліджень використовували плівки бактеріородопсину в желатинових матрицях без домішок, отримані методом поливу [2]. Такі плівкові структури мають високу оптичну однорідність, що дозволяє відстежувати мінімальні зміни оптичних характеристик спричинені впливом зовнішніх факторів. Для дослідження впливу рН фіксувалася чутливість плівки до збуджуючого випромінювання, вимірювалися динаміка та величина фотоіндукованої зміни пропускання на характеристичних довжинах хвиль (412 та 570 нм), напівперіод життя інтермедіату  $M_{412}$  ( $\tau$ ) [2].

Дослідження проводилися за допомогою установки на базі спектрофотометра СФ-46. Під час вимірювань зразок знаходився у кюветному відділенні, що дозволило проводити дослідження з точністю, гарантованою технічними характеристиками приладу [3]. Блок засвітки зразка складається з лампи КГМ 24-250 зі стабілізованим джерелом живлення, електромагнітної шторки, системи лінз та касети світлофільтрів, які формують збуджуюче випромінювання із заданою інтенсивністю та спектральними

характеристиками. Збуджуюче випромінювання вводилося у кюветне відділення спектрофотометра та спрямовувалося на зразок з допомогою оптичного світловоду.

Для дослідження впливу рН на властивості плівкових структур плівка занурювалася в розчин із заданим рівнем рН, висушувалися протягом 30 хвилин при кімнатних умовах після чого проводилися дослідження описаних вище характеристик. Порівняння проводилось із параметрами плівок промірених у повітрі при кімнатних умовах. Дослідження проводили для середовищ з рН=5, 7 і 8 – кисле середовище, нейтральне і лужне відповідно. Для створення лужного та кислого середовищ використовували фосфатний буфер. Як нейтральне середовище використовували дистильовану воду, оскільки поведінка плівки у фосфатному буферному розчині з рН=7 і дистиліаті не відрізнялася.

Дослідження проводилися як на одному зразку, так і на різних плівках однієї серії. У першому випадку одна і та ж плівка по черзі занурювалася спочатку в воду, потім в лужне середовище (рН=8), а потім в кисле середовище (рН=5). Після кожного занурення плівку висушували і промірювали її характеристики.

У другому випадку промірювалися характеристики трьох різних плівок (плівки брали з однієї серії для того щоб їх вихідні властивості були максимально близьким). Плівки занурювали в розчини з різним рН: 1-ша в дистиліат, 2-га в лужне середовище, а 3-тя – в кисле, після чого висушували в однакових умовах і знову промірювали їх характеристики.

### Результати

Послідовність "занурення" плівок у розчини з різним рН була вибрана не випадково. Дослідження впливу вологості та води на властивості плівкових структур в різних матрицях на основі БР [4], показали що зростання вологості не приводить до суттєвих змін у плівках БР без домішок. Для таких плівок час життя інтермедіату досить малий (~ 1 с), а зростання вологості приводить до

наближення зовнішніх умов до природного середовища функціонування БР, час повного циклу фотоперетворень в яких становить близько 10 мілісекунд [5]. При таких малих часах життя інтермедіатів всі зміни спричинені дією збуджуючого випромінювання проходять дуже швидко і залежність пропускання від часу має наступний вигляд (рис. 1, крива 1).

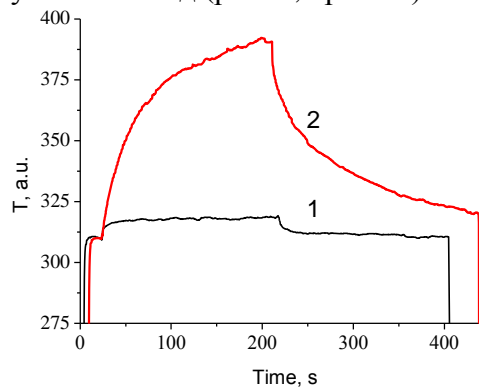


Рис. 1. Динаміка фотоіндукованої зміни пропускання для плівок БР з різними часами життя інтермедіату  $M_{412}$ : 1 -  $\tau_{1/2} \approx 2$  с, 2 -  $\tau_{1/2} \approx 20$  с.

Якщо ж час проходження фотоциклу збільшується (за рахунок зміни характеристик навколишнього середовища, зокрема зменшення вологості [6], або введення хімічних домішок у плівку [7]) крива залежності пропускання від часу при дії збуджуючого випромінювання має вигляд зображений на рис. 1 (крива 2).

В нашому випадку занурення плівки у дистиліат приводило до незначних відхилень у динаміці фотоіндукованих змін пропускання. В той же час плівки які були зовсім не чутливими після взаємодії з лужним середовищем рН=8 ставали чутливими, а після взаємодії з кислим середовищем рН=5 форма кривої поверталася до вихідного вигляду, що свідчить про значні зміни у проходженні фотоциклу. Тому саме в такій послідовності плівки піддавалися впливу середовищ з різним рН.

Результати досліджень впливу середовищ з різним рН на динаміку фотоіндукованих змін у плівках БР наведено на рис. 2. Як видно з результатів, занурення плівки у дистильовану воду не приводить до значних змін у проходженні фотоциклу. Незначне зменшення сумарної величини фотоіндукованої зміни пропускання скоріше за все пов'язане з тим,

що у гігроскопічній желатиновій матриці підвищена вологість після занурення у воду зберігається тривалий час.

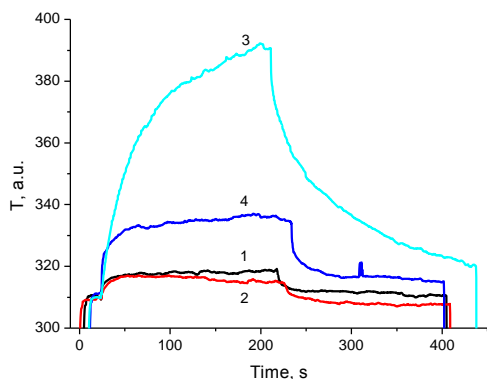


Рис. 2. Динаміка зміни пропускання плівки БР на 570 нм при дії збуджуючого випромінювання після дії середовищ з різним рН. 1 - плівка до експерименту, 2 - після дії рН=7, 3 - після дії рН=8, 4 - після дії рН=5.

Таблиця 1.

**Значення загальної величини фотоіндукованої зміни пропускання та напівперіоду життя інтермедіату  $M_{412}$  для плівки БР для різних значень рН середовища.**

	$\Delta T$ , дов. од.	$\tau_{1/2}$ , с
Повітря	<b>8,99</b>	<b>6</b>
рН=7	<b>5,14</b>	<b>5</b>
рН=8	<b>81,17</b>	<b>39</b>
рН=5	<b>24,88</b>	<b>9</b>
рН=8 + 30 хв	<b>72,58</b>	<b>43</b>
рН=8 + 45 хв	<b>70,19</b>	<b>38</b>

Занурення плівки у розчин з рН=8 приводить до суттєвого зростання величини фотоіндукованої зміни пропускання (табл. 1.). Навіть візуально видно що процеси пов'язані з проходженням фотоциклу суттєво сповільнилися, про що свідчить плавне зростання та спадання пропускання під дією зовнішнього освітлення. Даний ефект зберігається впродовж тривалого проміжку часу. Як видно з рис. 3 і таблиці 1 повторні дослідження через 30 та 45 хвилин показали, що характеристики плівки залишаються незмінними в межах похибки експерименту. Про суттєве сповільнення фотоциклу свідчать результати отримані без попереднього затемнення зразка (рис. 3., крива 1). У випадку попередніх експериментів малий

час життя інтермедіату  $M_{412}$  та низька чутливість плівки приводили до того, що інтенсивності фонового освітлення в лабораторії було недостатньо для створення фотоіндукованих змін у плівці, які можна зафіксувати. У випадку ж плівки після дії середовища з рН=8 чітко видно що після відкриття шторки спостерігається зменшення пропускання плівки на 570 нм, тобто проходять релаксаційні процеси переходу молекул із збудженого у основний стан. Про наявність молекул, які перебувають не у основному стані, на початку експерименту свідчить також той факт що пропускання після вимкнення зовнішньої засвітки зменшується нижче вихідного рівня. У випадку коли проводилися дослідження через 30 та 45 хвилин, такого ефекту не спостерігалось. Це пояснюється тим, що впродовж перебування плівки у затемненому кюветному відділенні спектрофотометра, повністю завершився процес переходу молекул із збудженого у основний стан. Необхідність тривалого проміжку часу для завершення даного процесу свідчить про зростання часу життя форми  $M_{412}$ .

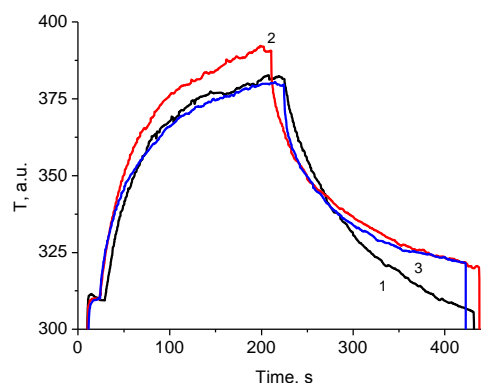


Рис. 3. Динаміка фотоіндукованих змін у плівці БР після впливу лужного середовища. 1 - одразу після висушування, 2 - через 30 хв., 3 - через 45 хв.

Наступне занурення плівки у кисле середовище приводить до суттєвого зменшення  $\Delta T$  та  $\tau_{1/2}$  порівняно з значеннями для тієї ж плівки після дії середовища з рН=8. (табл. 1.) Слід відмітити що характеристики плівки не повертаються до вихідних значень, що може бути зумовлено різними факторами і потребує подальших досліджень. Зменшенням часу можна пояснити

відсутність чутливості плівки до фонового освітлення яке спостерігалось у випадку взаємодії з лужним середовищем.

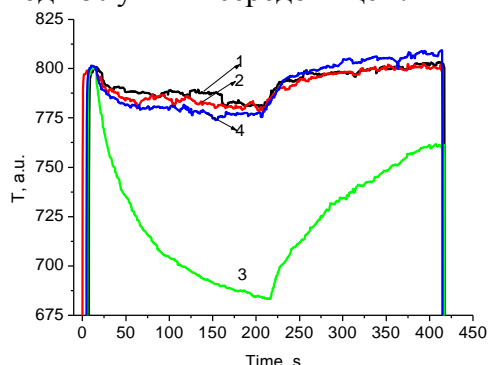


Рис. 4. Динаміка зміни пропускання плівки BR на 412 нм при дії збуджуючого випромінювання після дії середовищ з різним рН.

По аналогічному алгоритму були проведені дослідження впливу рН на динаміку фотоіндукованих змін у плівці BR на 412 нм. Результати наведено на рис. 4.

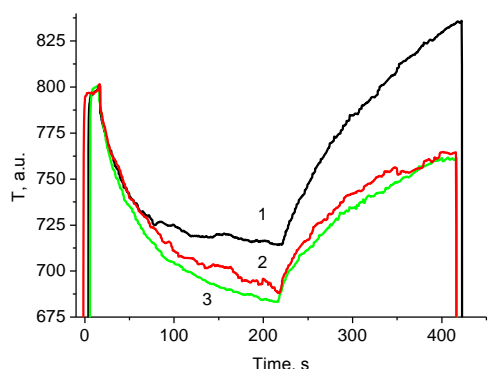


Рис. 5. Динаміка фотоіндукованих змін пропускання на 412 нм у плівці BR після впливу лужного середовища. 1 - одразу після висушування, 2 - через 30 хв., 3 - через 45 хв.

Як видно з кривих, вплив середовищ з різним рН теж відображається на пропусканні плівки на 412 нм симетрично до змін на 570. Так само як і на 570 нм спостерігається чутливість плівки навіть до фонового освітлення в лабораторії (рис. 5).

Одочасні зміни на обох довжинах хвиль, які відповідають поглинанню молекул BR на ключових стадіях фотоциклу, служать доказом того що зміна кількості активних іонів водню впливає саме на проходження фотоциклу, що й приводить до виникнення зафіксованих в експерименті змін.

На другому етапі проводилися дослідження впливу рН на різні плівки BR взяті з однієї серії. Як і в попередньому випадку реєструвалася динаміка фотоіндукованих змін плівок до впливу середовища із заданим рН, потім плівка занурювалася в розчин, висушувалася і дослідження проводилися ще раз. Результати досліджень наведено на рис. 6.

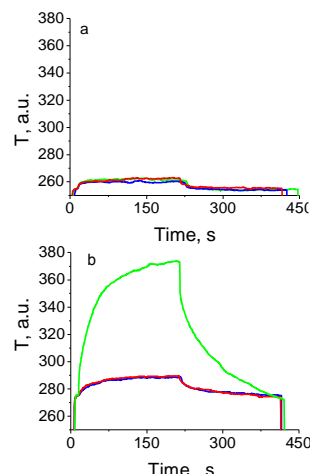


Рис. 6. Плівки PM1-3 у повітрі з увімкненням підсвітки до (а) та після (б) впливу різних рН.

Як видно з отриманих результатів, розчини з нейтральним та кислим середовищем, як і у попередньому випадку, приводять до незначних змін  $\Delta T$  та  $\tau_{1/2}$ . В той же час лужне середовище приводить до збільшення  $\Delta T$  та  $\tau_{1/2}$  майже на порядок. Розраховані значення для плівок до та після впливу рН наведено у таблиці 2.

Таблиця 2.

**Значення загальної величини фотоіндукованої зміни пропускання та напівперіоду життя інтермедіату  $M_{412}$  для плівок BR у середовищах з різним рН.**

PM1 (pH=8)	$\Delta T$ , дов. од.	$\tau_{1/2}$ , с	PM2 (pH=5)	$\Delta T$ , дов. од.	$\tau_{1/2}$ , с	PM3 (pH=7)	$\Delta T$ , дов. од.	$\tau_{1/2}$ , с
до	<b>7,69</b>	<b>3</b>	до	<b>7,09</b>	<b>2</b>	до	<b>5,02</b>	<b>3</b>
після	<b>97,95</b>	<b>22</b>	після	<b>13,68</b>	<b>14</b>	після	<b>14,5</b>	<b>15</b>

### Аналіз та обговорення результатів

Як видно з отриманих результатів рН середовища суттєво впливає на оптичні властивості плівок БР. Дослідження спектральних характеристик затемнених зразків показало, що ніяких зсувів спектральних смуг під дією різних рН не відбувається. Всі зафіксовані зміни стосуються часових характеристик динамічних процесів, які відбуваються у молекулі БР після поглинання кванту світла і запуску фотоциклу.

Отримані результати можна пояснити в рамках моделі фотоциклу. Зростання часу життя основного проміжного інтермедіату при дії лужного середовища і відсутність змін при дії середовища з нейтральним або кислим рН може відбуватися через відсутність вільних іонів водню у середовищі. Наявність великої кількості негативно заряджених іонів ОН<sup>-</sup> приводить до зв'язування вільних протонів з утворенням води. Як добре відомо, перший етап фотоциклу завершується випуском протону з зовнішньоклітинної сторони молекули. Для того щоб молекула могла перейти зі збудженого в основний стан відповідним амінокислотним залишком (Asp96) з цитоплазматичної сторони повинен бути захоплений інший протон [1]. Відсутність вільних протонів у лужних середовищах, приводить до блокування даного процесу і, як наслідок, зростання часу впродовж якого молекула перебуває у формі інтермедіату M<sub>412</sub>. В той же час для нейтральних або кислих середовищ концентрація вільних іонів водню достатня для нормального завершення фотоциклу. Підтвердженням даної теорії може служити той факт що занурення плівки у кисле середовище приводить до нейтралізації змін, які виникли під дією лужного.

Зростання чутливості плівок до освітлення при впливі на них лужного середовища теж можна пояснити в рамках даної моделі.

### Висновки

В результаті проведених досліджень показано що рівень рН середовища

Стаття надійшла до редакції 05.07.2016 р.

(розчину), в контакт з яким знаходиться плівка БР, суттєво впливає на фотоцикл молекул чим визначає оптичні властивості плівки. З отриманих результатів можемо зробити висновок, що такого роду плівки можуть бути використані для виготовлення сенсорів рівня рН на основі бактеріородопсину. Механізм впливу рН на властивості плівки передбачає швидку зміну її властивостей, практично необмежену реверсивність та можливість моніторингу в режимі реального часу. Характер залежності параметрів від величини рН дозволяє припустити що найбільшою чутливістю та селективністю такі датчики будуть володіти для лужних середовищ.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Lanyi J. K. Mechanism of ion transport across membranes // The Journal of Biological Chemistry - Vol. 272., 1997.
2. Плівкові структури фотохромного матеріалу бактеріородопсину (ФХМБР). ТУ У 02070832.008 – 97. від 25.12.1997.
3. Спектрофотометр СФ-26. Технічний опис та інструкція по експлуатації. С. 20, 1983 р.
4. Трикур І.І., Корпош О.І., Фролова Н.П., Різак В.М., "Вплив вологості на фотоіндуковані процеси у плівках бактеріородопсину." Науковий вісник Ужгородського університету, серія Фізика, 2006 р. в. 19, с. 68-74.
5. Hampp N., Bacteriorhodopsin as a Photochromic Retinal Protein for Optical Memories // Chem. Rev. 2000, 100, 1755-1776.
6. Varo G., Lanyi J.K., Distortions in the photocycle of bacteriorhodopsin at moderate dehydration // Biophysical Journal, Vol 59., 1991 р., 313-322.
7. Бандровська І.К., Баторі-Тарці З.І., Корпиш О.І., Фролова Н.П. Модифікація кінетики фотоциклу бактеріородопсину. //Український фізичний журнал.- 2001, т. 46, № 2, с.161-164.

И. И. Трикур, И. И. Сакалош, М. Ю. Сичка, С. О. Корпош, В. М. Ризак  
Ужгородский национальный университет, 88000, Ужгород, ул. Волошина, 54

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ УРОВНЯ pH ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ДИНАМИКУ ФОТОИНДУЦИРОВАННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ПЛЕНКАХ БАКТЕРИОРОДОПСИНА

Проведено исследование влияния уровня pH окружающей среды на динамику фотоиндуцированных изменений в пленках бактериородопсина. Показано, что при кратковременном воздействии щелочной среды наблюдается рост времени жизни интермедиата  $M_{412}$ . На основе полученных результатов предложен механизм влияния pH на оптические свойства пленочных структур на основе бактериородопсина.

**Ключевые слова:** бактериородопсин, pH, пленочные структуры, фотоиндуцированные изменения, фотоцикл, интермедиат.

I. I. Trikur, I. I. Sakalosh, M. Y. Sichka, S. O. Korposh, V. M. Rizak  
Uzhhorod National University, 88000, Uzhhorod, Voloshina Str., 54

## INVESTIGATION OF THE INFLUENCE OF pH LEVEL OF THE ENVIRONMENT ON THE DYNAMICS OF PHOTOINDUCED CHANGES IN BACTERIORHODOPSIN FILMS

Investigation of the influence of pH level of the environment on the dynamics of photoinduced changes in bacteriorhodopsin films was carried out. The studies were carried out with consequent impact of environments with different pH on one film and with parallel impact of environments with different pH on different films of one series. It is shown that at short-term action of alkaline environment an increase in the lifetime of intermediate  $M_{412}$  is observed. In neutral and acidic environments no such effect was observed. Immersion of the film exposed to alkaline environment influence, into the acid one leads to time reduction in photocycle passage and reverse recovery of the film original characteristics. Based on the obtained results, a mechanism of pH impact on optical properties of film structures on the basis of bacteriorhodopsin has been suggested.

**Key words:** bacteriorhodopsin, pH, film structures, photo-induced changes, photocycle, intermediate.

### REFERENCES

1. Lanyi J. K. Mechanism of ion transport across membranes // The Journal of Biological Chemistry - Vol. 272., 1997.
2. Плівкові структури фотохромного матеріалу бактериородопсину (ФХМБР). ТУ У 02070832.008 – 97. від 25.12.1997.
3. Спектрофотометр СФ-26. Технічний опис та інструкція по експлуатації. С. 20, 1983 р.
4. Трикур І.І., Корпош О.І., Фролова Н.П., Ризак В.М., "Вплив вологості на фотоіндуковані процеси у плівках бактериородопсину." Науковий вісник

Ужгородського університету, серія  
Фізика, 2006 р. в. 19, с. 68-74.

5. Hampp N., Bacteriorhodopsin as a Photochromic Retinal Protein for Optical Memories // Chem. Rev. 2000, 100, 1755-1776.
6. Varo G., Lanyi J.K., Distortions in the photocycle of bacteriorhodopsin at moderate dehydration // Biophysical Journal, Vol 59., 1991 p., 313-322.
7. Бандровська І.К., Баторі-Тарці З.І., Корпиш О.І., Фролова Н.П. Модифікація кінетики фотоциклу бактеріородопсину. //Український фізичний журнал.- 2001, т. 46, № 2, с.161-164