

УДК 577.3

## ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО В РАСТВОРАХ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ПОЛИФОСФАТА НАТРИЯ КАК ОДНА ИЗ ПРИЧИН МЕТАХРОМАЗИИ

<sup>1</sup>Мартынюк В.С., <sup>2</sup>Громозова Е.Н., <sup>1</sup>Лукьяненко И.В., <sup>1</sup>Цейслер Ю.В.

<sup>1</sup>Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины  
e-mail: mavis@science-center.net

Поступила в редакцию 05.03.2010

Исследованы оптические свойства тиозинового красителя метиленового синего в растворах неорганических полифосфатов с разной длиной полимерной цепи и разной концентрации с целью выяснения возможного вклада внутриклеточных полифосфатов в явление метахромазии. Установлено, что основные параметры спектров поглощения метиленового синего при его взаимодействии с полифосфатами сильно варьируют в зависимости от концентрации полимера и длины полифосфатной цепи. В комплексе с полифосфатами разные формы метиленового синего характеризуются максимумом поглощения на длинах волн, лежащих в относительно широком диапазоне: мономер - 671.9-674.5 нм, димер - 620-644 нм и тример - 574.0-592.0 нм. Вариации спектров поглощения связаны с нелинейными изменениями образования моно-, ди- и тримерных форм красителя, ассоциированного с полифосфатом, при этом в растворах с низкой концентрацией полимера и с относительно малой (16-18 звеньев) длиной цепи доминируют тримерные комплексы. Основные параметры спектров поглощения метиленового синего в растворах полифосфатов флуктуируют во времени. Выявленные особенности оптических свойств метиленового синего в растворах полифосфатов могут быть одной из причин метахромазии, наблюдаемой в биологических исследованиях.

**Ключевые слова:** метахромазия, метиленовый синий, полифосфаты, спектры поглощения.

### ВВЕДЕНИЕ

Метахромазия - это широко известное явление цветовой и тональной варибельности окраски клеток и биологических тканей при использовании определенных красителей. Красители, дающие метахроматическое окрашивание, как правило, относятся к группе трифенилметановых, тиозиновых и оксазиновых органических соединений. Метахромазия может проявляться в очень широком цветовом диапазоне - от синего до красного. Это свойство красителей давно используется в биологических и медицинских исследованиях для изучения структуры клеток и тканей, а также для выявления патологических процессов.

Следует отметить, что в настоящее время нет общепринятых представлений о причинах метахромазии. Предполагают, что метахромазия обусловлена полимеризацией молекул красителя под влиянием заряженных и незаряженных полярных групп биологических молекул клеток или ткани, различиями рН и температуры среды. Имеются убедительные доказательства, что метахромазия может быть обусловлена образованием ди- и тримерных комплексов этих молекул [1,2,3]. Однако остается ряд невыясненных вопросов, например, связанных с тем, что метахромазия нередко

проявляется в популяции клеток, которые находятся в одних и тех же постоянных условиях и находящихся условно в одном и том же физиологическом состоянии, но при окрашивании все равно имеют разные цветовые и тональные особенности. Еще более загадочными являются периодические и квазипериодические вариации метахромазии во времени. На такие временные вариации окрашивания клеток впервые обратили внимание Вельхвер С.Т. и Чижевский А.Л. [4]. Причины таких вариаций разные авторы связывали с природными факторами, которые контролируются космической погодой [5-7].

В последние десятилетия такая точка зрения находит экспериментальное подтверждение, в частности обнаружена корреляция индексов метахромазии с потоком космических лучей [8]. Однако указанный феномен все еще далек от понимания его природы. Предполагается, что среди природных физических факторов, влияющих на метахроматическое окрашивание клеток и тканей, могут быть вариации электромагнитного фона Земли, связанные с земной и космической погодой, но это требует серьезной экспериментальной верификации.

Одним из ярких примеров метахромазии является изменение цвета метиленового синего при окраске гранул полифосфатов (волютина) [9]. На этом основании гранулы волютина часто называют

метахроматическими гранулами. Неорганические полифосфаты представляют собой линейные полимеры ортофосфорной кислоты, в которой кислотные остатки связаны между собой ангидридными связями. В живых клетках размеры полифосфатных цепей варьируют в широких пределах – от 3 до 1000 звеньев [9]. Полифосфаты в клетке являются резервом фосфора и энергии, которая высвобождается при гидролизе ангидридных связей. Учитывая тот факт, что полифосфаты в клетке присутствуют в виде солей и связывают ионы  $\text{Na}$ ,  $\text{K}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , они рассматриваются как элемент буферной системы клетки и, одновременно с этим, как ионообменники, которые регулируют концентрацию свободных ионов в клетке [10]. В настоящее время полифосфаты выявлены в клетках практически у всех видов живых организмов, они принимают участие в регуляции разнообразных метаболических процессов и их состояние (длина полимерной цепи, степень разветвленности, конформационное состояние и т.д.) в определенной степени отражает функциональное состояние клеток.

В связи с вышеуказанным, целью данной работы было изучение оптических свойств тиозинового красителя метиленового синего в растворах неорганических полифосфатов с разной длиной полимерной цепи и разной концентрации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали растворы полифосфата натрия с длиной цепи 12-18 (ПФ<sub>12-18</sub>) и 200 (ПФ<sub>200</sub>) фосфорных остатков (производство компании «Sigma», США и «Реанал», Венгрия) в конечной концентрации 0.5 и 2.0 мг/мл. pH растворов доводили до нейтральных значений титрованием 0.2 М раствором NaOH. Концентрация метиленового синего в исследуемых растворах составляла 0.005 мг/мл.

Регистрацию спектров поглощения проводили на спектрофотометре относительно воды. Выявление моно-, ди- и тримерных форм метиленового синего, а также оценку их вклада в интегральный спектр поглощения, проводили методом вписывания гаусиан с помощью процедуры Fit Multiple Peak в программном пакете Origin 8 (рис. 1). В расчетах в качестве базовых значений максимумов поглощения указанных моно-, ди- и тримерных форм метиленового синего использовали рассчитанные нами средние значения этого параметра на основе данных, полученных из множества литературных источников для разных полимеров – 670, 630 и 580 нм, соответственно для моно-, ди и тримера. В этой связи важно отметить, что анализ литературы показал широкое варьирование значений максимумов поглощения разных форм метиленового синего в пределах от десятка до нескольких десятков нанометров в зависимости от типа полимерных молекул и экспериментальных условий.

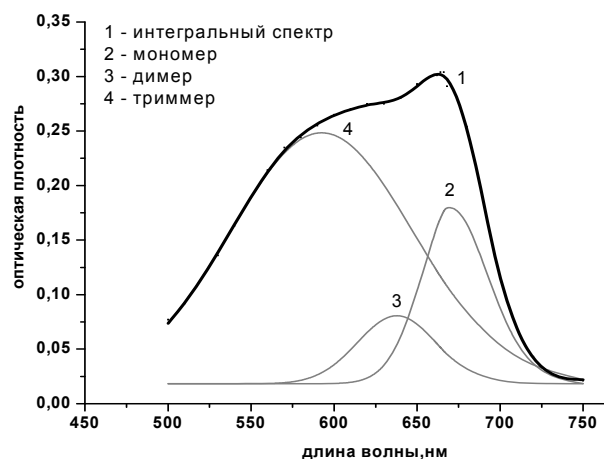


Рис. 1. Анализ спектра поглощения метиленового синего в растворе полифосфата натрия (линия 1) с целью выявления моно-, ди- и тримерных форм, соответственно линии 2, 3 и 4.

Статистическую обработку данных проводили на основе общепринятых методов вариационной статистики, а оценку достоверности различий между выборками осуществляли с помощью критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ спектров поглощения метиленового синего показал существенную вариативность их основных параметров (рис. 2, табл. 1 и 2). Одной из причин такой вариативности, как и ожидалось, является разная концентрация полимера. При этом закон Бугера-Ламберта-Бэра в случае с полифосфатами, так же как и с другими полианионами, не соблюдается, так как в исследуемой системе при изменении концентрации полимера происходит нелинейное перераспределение молекул красителя между моно-, ди- и тримерными формами (рис. 3, табл. 2). Одновременно с этим важную роль играет длина полимерной цепи.

Математический анализ спектров (табл. 2) показывает, разные формы метиленового синего, растворенного в воде, характеризуется максимумом поглощения на длинах волн, лежащих в относительно узком диапазоне: мономер - 671.3-672.0 нм, димер - 630.4-633.1 нм и тример - 570.2-576.0 нм. Однако при образовании комплексов с полифосфатами спектральные характеристики ди- и тримерных форм метиленового синего варьируют в более широких диапазонах. В зависимости от концентрации и длины цепи изучаемого полимера максимум поглощения мономера красителя может находиться в диапазоне - 671.9-674.5 нм, димера - в диапазоне 620-644 нм, а тримерных форм - в пределах 574.0-592.0 нм. При этом для тримерных форм, находящихся в комплексе с полифосфатом, характерен заметный красный сдвиг максимума поглощения в среднем на 10 нм по сравнению с тримерными комплексами красителя, находящимися в воде (табл. 2). Вероятно, данный факт указывает на существенное уменьшение полярности окружения тримерных комплексов в растворах полифосфатов, которое связано с уходом

молекул красителя из водной фазы и стабилизации данного состояния.

Данные по оптической плотности разных форм красителя (табл. 3) свидетельствуют о том, что преимущественное образование и стабилизация тримерных комплексов происходит в растворах с относительно низкой концентрацией полифосфатов, где доминирует процесс образования тримерных

комплексов. Высокое содержание тримеров придает таким растворам розоватый оттенок. Одновременно с этим, наиболее выраженные изменения характерны для растворов короткоцепочных полимеров, что, на наш взгляд, свидетельствует о важной роли пространственной структуры полимера в образовании и стабилизации комплексов красителя с фосфатной полимерной цепью.

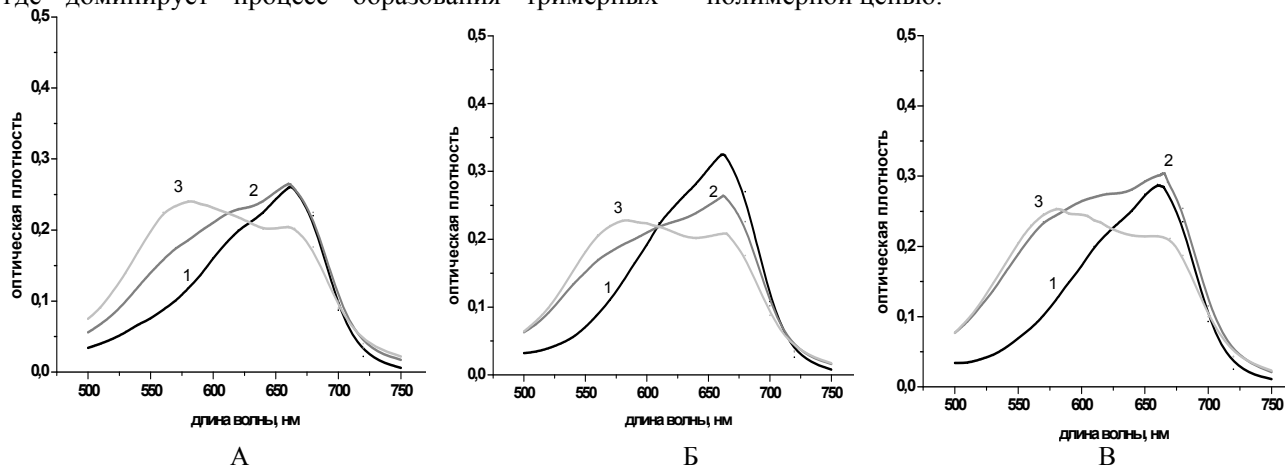


Рис. 2. Спектры поглощения растворов метиленового синего (линия 1) и его комплексов с полифосфатами: ПФ<sub>16-18</sub> (линия 2) та ПФ<sub>200</sub> (линия 3) (концентрация полифосфата 0,5 мг/мл).

Примечания: А, Б, В – 1, 2 и 3 часа после приготовления растворов, концентрация метиленового синего – 0.005 мг/мл.

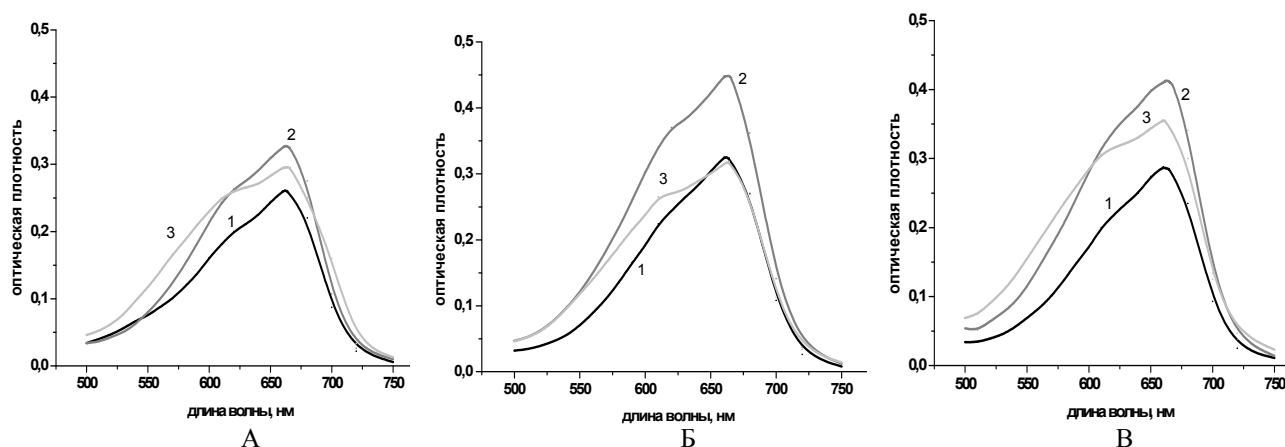


Рис. 3. Спектры поглощения растворов метиленового синего (линия 1) та его комплексов с полифосфатами: ПФ<sub>16-18</sub> (линия 2) та ПФ<sub>200</sub> (линия 3) (концентрация полифосфата 2 мг/мл).

Примечания: А, Б, В – 1, 2 и 3 часа после приготовления растворов, концентрация метиленового синего – 0.005 мг/мл.

Таблица 1.

Максимумы поглощения моно-, ди- и тримерных форм метиленового синего в растворах полифосфатов с разной длиной цепи и разной концентрации

Форма метиленового синего	Время после приготовления раствора		
	1 час	2 часа	3 часа
<b>Метиленовый синий</b>			
Мономер ( $\lambda_{\max}$ )	672,0±0,6	671,3±0,4	672,0±0,4
Димер ( $\lambda_{\max}$ )	632,5±1,6	630,4±1,1	633,1±0,8
Тример ( $\lambda_{\max}$ )	575,5±5,1	570,2±3,5	576,0±1,8
<b>ПФ<sub>16-18</sub> (концентрация 0,5 мг/мл)</b>			
Мономер ( $\lambda_{\max}$ )	673,0±0,5	674,5±0,2	674,5±0,4
Димер ( $\lambda_{\max}$ )	639,4±3,7	639,5±1,2	644,0±4,5
Тример ( $\lambda_{\max}$ )	591,8±0,9	589,1±0,5	592,0±2,4
<b>ПФ<sub>16-18</sub> (концентрация 2 мг/мл)</b>			
Мономер ( $\lambda_{\max}$ )	671,9±1,3	672,8±0,1	672,7±0,2
Димер ( $\lambda_{\max}$ )	628,4±2,1	633,5±0,2	631,4±0,6
Тример ( $\lambda_{\max}$ )	581,3±4,3	583,6±1,1	579,3±1,0

<b>ПФ<sub>200</sub> (концентрация 0,5 мг/мл)</b>			
Мономер ( $\lambda_{\max}$ )	672,7±0,4	671,0±1,1	671,3±1,5
Димер ( $\lambda_{\max}$ )	620,8±1,4	629,5±3,3	628,3±0,2
Тример ( $\lambda_{\max}$ )	578,4±0,9	583,3±0,6	580,3±0,6
<b>ПФ<sub>200</sub> (концентрация 2 мг/мл)</b>			
Мономер ( $\lambda_{\max}$ )	673,6±2,4	672,3±0,6	673,7±0,02
Димер ( $\lambda_{\max}$ )	631,6±4,4	630,5±2,6	634,3±1,0
Тример ( $\lambda_{\max}$ )	574,0±4,1	582,0±5,1	589,7±0,4

Таблица 2.

**Оптическая плотность моно-, ди- и тримерных форм метиленового синего в растворах полифосфатов с разной длиной цепи и разной концентрации**

Форма метиленового синего	Время после приготовления раствора		
	1 час	2 часа	3 часа
<b>Метиленовый синий</b>			
Мономер ( $D_{\lambda_{\max}}$ )	0,190±0,020	0,200±0,010	0,160±0,020
Димер ( $\lambda_{\max}$ )	0,220±0,050	0,220±0,010	0,180±0,003
Тример ( $\lambda_{\max}$ )	0,070±0,009	0,050±0,004	0,060±0,004
<b>ПФ<sub>16-18</sub> (концентрация 0,5 мг/мл)</b>			
Мономер ( $\lambda_{\max}$ )	0,140±0,010	0,160±0,005	0,140±0,02
Димер ( $\lambda_{\max}$ )	0,080±0,007	0,090±0,004	0,090±0,01
Тример ( $\lambda_{\max}$ )	0,190±0,010	0,190±0,008	0,210±0,02
<b>ПФ<sub>16-18</sub> (концентрация 2 мг/мл)</b>			
Мономер ( $\lambda_{\max}$ )	0,200±0,020	0,210±0,006	0,210±0,002
Димер ( $\lambda_{\max}$ )	0,190±0,070	0,270±0,01	0,270±0,001
Тример ( $\lambda_{\max}$ )	0,110±0,030	0,100±0,002	0,090±0,003
<b>ПФ<sub>200</sub> (концентрация 0,5 мг/мл)</b>			
Мономер ( $\lambda_{\max}$ )	0,140±0,007	0,140±0,007	0,140±0,006
Димер ( $\lambda_{\max}$ )	0,040±0,010	0,030±0,005	0,040±0,001
Тример ( $\lambda_{\max}$ )	0,230±0,010	0,210±0,004	0,210±0,010
<b>ПФ<sub>200</sub> (концентрация 2 мг/мл)</b>			
Мономер ( $\lambda_{\max}$ )	0,120±0,020	0,170±0,002	0,160±0,001
Димер ( $\lambda_{\max}$ )	0,100±0,060	0,180±0,010	0,170±0,003
Тример ( $\lambda_{\max}$ )	0,190±0,008	0,110±0,010	0,150±0,006

Обращает на себя внимание тот факт, что оптические свойства растворов немного изменяются так же и во времени (рис. 2, табл. 2 и 3). Эти изменения мало заметны при зрительном восприятии, но достоверно регистрируются аппаратно. Причины такой вариабельности пока малопонятны, однако данный факт указывает на то, что исследуемая, на первый взгляд, простая модельная система «краситель-полимер» в процессе экспериментальных наблюдений находится в неравновесном состоянии и является чувствительной к действию разнообразных факторов, в том числе и неконтролируемым в эксперименте (акустический и электромагнитный фон в широком диапазоне частот, градиенты постоянного магнитного и электрического полей и др.). Например, давно известны факты влияния слабых электромагнитных полей на поведение органических молекул в растворах. В частности, под действием слабых переменных магнитных полей изменяется растворимость бензола и его сорбция белками [11] изменяется растворимость и из агрегационные свойства фосфолипидов и гликозидов [12,13] изменяются скорости химических реакций [14]. Не смотря на то, что все эти факты еще не получили общепринятого теоретического объяснения, они

должны учитываться в экспериментальной работе. Вероятно, вариации атмосферного давления и связанные с ними изменения концентрации растворенного кислорода тоже могут рассматриваться в качестве таких неконтролируемых факторов, которые влияют на спектральные характеристики растворенных веществ [15,16]. В связи с этим, следует отметить, что метахромазия в биологических исследованиях является нетривиальным явлением, которое зависит от множества разнообразных условий, начиная с особенностей пространственной структуры и концентрации полимера, с которым связываются красители, заканчивая действием разнообразных внешних факторов, которые могут влиять на процесс сорбции красителя с полианионными матрицами полимерных молекул.

## ВЫВОДЫ

1. Основные параметры спектров поглощения метиленового синего при его взаимодействии с полифосфатами сильно варьируют в зависимости от концентрации полимера и длины полифосфатной цепи. В комплексе с полифосфатами разные формы метиленового синего характеризуются максимумом

поглощения на длинах волн, лежащих в относительно широком диапазоне: мономер - 671.9-674.5 нм, димер - 620-644 нм и тример - 574.0-592.0 нм. Для тримерных форм, находящихся в комплексе в полифосфатом, характерен, как правило, красный сдвиг максимума поглощения в среднем на 10 нм по сравнению с тримерными комплексами красителя, находящимися в воде.

2. Вариации спектров поглощения связаны с нелинейными изменениями образования моно-, ди- и тримерных форм красителя, ассоциированного с полифосфатом, при этом в растворах с низкой концентрацией полимера и с относительно малой (16-18 звеньев) длиной цепи доминируют тримерные комплексы.

3. Основные параметры спектров поглощения метиленового синего в растворах полифосфатов флуктуируют во времени. Причины таких флуктуаций малопонятны и возможно связаны с влиянием на исследуемые растворы неконтролируемых в эксперименте внешних фоновых физико-химических факторов.

#### Литература

1. Пирс Э. Гистохимия., М. Из-во ин. лит., 1962, с. 962.
2. McKay R.B. Red form of Methylene Blue // Nature. -1966. - Vol. 210, N. 16. - P. 296-297.
3. Hillson P.J., McKay R.B. Metachromasy // Nature. -1966. - V. 210, N. 16. - P. 297.
4. Вельховер С.Т. Годовой ход метахромузии воллютина коринебактерийной клетки // Микробиология, 1936, т. XV, вып. 5. с. 731-736. Чижевский А.Л. Некоторые микроорганизмы, как индикаторы солнечной активности и предвестники солнечных вспышек /Сб. Авиационная и космическая медицина /, М. «Медицина», 1963 г. с. 485-487.
5. Вельховер С.Т. О некоторых функциональных свойствах коринебактерий // Журнал микробиологии, эпидемиологии и инфекции. - 1935. - Т. XY, в. 6. - С. 869-877.
6. Чижевский А.Л. Земное эхо солнечных бурь. - М.: Из-во «Мысль», 1976. - 349 с.
7. Краткий справочник по космической биологии и медицине. - М.: Медицина, 1967. - 296 с.
8. Громозова Е.Н., Григорьев П.Е., Качур Т.Л., Войчук С.И. Влияние космических факторов на реакцию метахромузии воллютиновых гранул *Saccharomyces cerevisiae*/ Геофизические процессы и биосфера, 2010, т. 9., №2. С. 67-76 .
9. Кулаев И.С., Вагабов В.М., Кулаковская Т.В. Высокомолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. - М.: «Научный мир» 2005.- 216 с
10. Кулаев И.С. Неорганические полифосфаты и их роль на разных этапах клеточной эволюции // СОЖ. - 1996. - №2. - С. 28-35.
11. Мартынюк В.С., Шадрин О.Г. Влияние переменного магнитного поля крайне низкой частоты на растворимость бензола в воде и растворах белка // Биомедицинская радиоэлектроника. - 1999. - № 2. - С. 61-63.]
12. Мартынюк В.С., Панов Д.А., Цейслер Ю.В. Влияние магнитного поля крайне низкой частоты на критическую концентрацию мицеллообразования в воде и водных растворах электролитов // Физика живого. - 2008. - № 2. - С. 78 - 84.
13. Панова Е.П., Алексаикин А.В., Мартынюк В.С., Кацева Н.Г. Влияние магнитных полей на физико-химические свойства гликозидов // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И.Вернадского. Серия Биология, химия». - 2001. - Т. 12(51), № 2. - С. 95 - 98.
14. Электромагнитные поля в биосфере. Т.1. Электромагнитные поля в атмосфере Земли их биологическое значение. - М.: Наука, 1984. - 377 с.
15. Пивоваренко Ю.В., Мартынюк В.С. Зависимость терморезистентности и растворимости ДНК от содержания воздуха в водных растворах // Физика живого. - 2009. - Т. 17, № 1. - С. 54 - 55.
16. Doshi R., Day P.J.R., Carampin P., Blanch E., Stratford I.J., Tirelli N. Spectrofotometric analysis of nucleic acids: oxygenation-dependent hyperchromism of DNA // Anal. Bioanal. Chem. - 2010. - Vol. 396. - P. 2331-2339.

#### ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ОПТИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЬОГО В РОЗЧИНАХ НЕОРГАНИЧНИХ ПОЛІФОФАТІВ НАТРІЮ ЯК ОДНА З ПРИЧИН МЕТАХРОМАЗІЇ

Мартынюк В.С., Громозова Е.Н., Лукьяненко І.В., Цейслер Ю.В.

Досліджено оптичні властивості тіозінового барвника метиленового синього в розчинах неорганічних поліфосфатів з різною довжиною полімерного ланцюга і різної концентрації з метою з'ясування можливого внеску внутрішньоклітинних поліфосфатів у явище метахромузії. Встановлено, що основні параметри спектрів поглинання метиленового синього при його взаємодії з поліфосфатом варіюють залежно від концентрації полімеру і довжини поліфосфатного ланцюга. У комплексі з поліфосфатом різні форми метиленового синього характеризуються максимумом поглинання на довжинах хвиль, що лежать у відносно широкому діапазоні: мономер - 671.9-674.5 нм, димер - 620-644 нм і тример - 574.0-592.0 нм. Варіації спектрів поглинання пов'язані з нелінійними змінами утворення моно-, ди- і тримерних форм барвника, асоційованого з поліфосфатами, при цьому в розчинах з низькою концентрацією полімеру і з відносно малою (16-18 ланок) довжиною ланцюга домінують тримерні комплекси. Основні параметри спектрів поглинання метиленового синього в розчинах поліфосфатів флуктуюють у часі. Виявлені особливості оптичних властивостей метиленового синього в розчинах поліфосфатів можуть бути однією з причин метахромузії, що спостерігається в біологічних дослідженнях.

**Ключові слова:** метахромузія, метиленовий синій, поліфосфати, спектри поглинання.

**VARIABILITY OF OPTICAL PROPERTIES OF METHYLENE BLUE IN INORGANIC SODIUM POLYPHOSPHATE SOLUTIONS AS ONE OF THE REASONS METACHROMASIA****Martyniuk V.S., Hromozova E.N, Lukyanenko I.V., Tseislyer Yu.V.**

The optical properties of thiosine dye methylene blue in solutions of inorganic polyphosphates with different polymer chain length and varying concentrations were studied to determine the possible contribution of intracellular polyphosphates in metachromasia phenomenon. Revealed basic parameters of the absorption spectra of methylene blue in its interaction with polyphosphate vary depending on the concentration and length of the polymer chain of polyphosphate. In conjunction with polyphosphate various forms of methylene blue are characterized by a maximum absorption at wavelengths that lie within a relatively wide range: monomer - 671.9-674.5 nm, dimer - 620-644 nm and trimmer - 574.0-592.0 nm. Variations of absorption spectra associated with nonlinear changes in the formation of mono-, di- and trimernykh forms of dye associated with polyphosphate, while in solutions with low concentration of the polymer with a relatively small (16-18 units) chain dominated trimerni complexes. The main parameters of the absorption spectra of methylene blue in solution polyphosphates fluctuate during the time. The features of the optical properties of methylene blue in solutions of polyphosphates may be one reason of metachromasia observed in biological research.

**Key words:** metachromasia, methylene blue, polyphosphates, absorption spectra.

---