

УДК 535.371/547.681:547.458.68

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА АНИОННОГО ПРОИЗВОДНОГО ТИОФЛАВИНА Т

А. А. МАСКЕВИЧ¹⁾

¹⁾Гродненский государственный университет им. Янки Купалы,
ул. Ожешко, 22, 230023, г. Гродно, Беларусь

Исследуются спектральные свойства нового бензтиазолового красителя – производного тиофлавина Т – 3-сульфопропил-5-метокси-2-[3-(3,5-диэтил-2-бензотиазолидене)-1-пропиенил]-бензотиазолия (Th-C11). Квантово-химические расчеты показали, что молекула в основном состоянии имеет плоскую структуру. В возбужденном состоянии молекулы минимуму энергии соответствует скрученная конформация, при которой ароматические фрагменты молекулы расположены ортогонально. Поскольку скрученное состояние является нефлуоресцирующим, то переход в него (торсионная релаксация) есть тушащий процесс. Краситель Th-C11 демонстрирует свойства флуоресцентного молекулярного ротора. В результате экспериментальных исследований установлено, что торсионная релаксация фрагментов молекулы – основной процесс, определяющий сильную зависимость квантового выхода и длительности затухания флуоресценции от вязкости растворителя. Характерной особенностью данного красителя является чувствительность параметров флуоресценции – квантового выхода, длительности затухания и положения спектра не только к вязкости, но и к полярности среды. Показано, что положение спектров поглощения и флуоресценции, зависящее от полярности и вязкости растворителя, обусловлено результатом проявления процессов торсионной и сольватной релаксаций хромофора и молекул растворителя.

Ключевые слова: производные тиофлавина Т; квантово-химические расчеты; молекулярные роторы; амилоидные фибриллы.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке Министерства образования Республики Беларусь (государственная программа научных исследований «Фотоника и электроника для инноваций», задание 1.5). Автор выражает благодарность доценту Белорусского государственного университета А. А. Луговскому за синтез нового красителя Th-C11, а также доценту Гродненского государственного университета имени Я. Купалы А. В. Лавышу за проведение квантово-химических расчетов нового соединения.

Образец цитирования:

Маскевич АА. Флуоресцентные свойства анионного производного тиофлавина Т. *Журнал Белорусского государственного университета. Физика.* 2021;2:4–14.
<https://doi.org/10.33581/2520-2243-2021-2-4-14>

For citation:

Maskevich AA. Fluorescent properties anionic derivative of thioflavin T. *Journal of the Belarusian State University. Physics.* 2021;2:4–14. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2520-2243-2021-2-4-14>

Автор:

Александр Александрович Маскевич – доктор физико-математических наук, доцент; заведующий кафедрой общей физики физико-технического факультета.

Author:

Alexander A. Maskevich, doctor of science (physics and mathematics), docent; head of the department of general physics, physico-technical faculty.
amaskevich@grsu.by



FLUORESCENT PROPERTIES ANIONIC DERIVATIVE OF THIOFLAVIN T

A. A. MASKEVICH^a

^aYanka Kupala State University of Grodno, 22 Ažėška Street, Hrodna 230023, Belarus

We have investigated the spectral properties of a new benzothiazole dye – a thioflavin T derivative – 3-sulfopropyl-5-methoxy-2-[3-(3,5-diethyl-2-benzothiazolidene)-1-propienyl]-benzothiazolium (Th-C11). Based on quantum-chemical calculations, it is shown that the molecule in the ground state has a flat structure. In an excited state, the minimum energy corresponds to a twisted conformation, in which the aromatic fragments are arranged orthogonally. Since the twisted state is non-fluorescent, the transition to this state (torsion relaxation) is a quenching process. Th-C11 dye exhibits the properties of a fluorescent molecular rotor. As a result of experimental studies, it was found that torsion relaxation of molecular fragments is the main process that determines the strong dependence of the quantum yield and the duration of fluorescence decay on the viscosity of the solvent. A characteristic feature of this dye is the sensitivity of the fluorescence parameters – the quantum yield, the decay duration and the position of the spectrum not only to the viscosity, but also to the polarity of the medium. The paper also explains the dependence of the position of the absorption and fluorescence spectra on the polarity and viscosity of the solvent as a result of the manifestation of the processes of torsion and solvation relaxation of the chromophore and solvent molecules.

Keywords: derivatives of thioflavin T; quantum-chemical calculations; fluorescent molecular rotor; amyloid fibrils.

Acknowledgements. This research was supported by Ministry of Education of Belarus (state program of scientific researches «Photonics and electronics for innovation», task 1.5). The author is grateful to associate professor of the Belarusian State University A. A. Lugovskiy for the synthesis of the new dye Th-C11, as well as associate professor at the Yanka Kupala State University of Grodno A. V. Lavysh for carrying out quantum-chemical calculations of the new compound.

Введение

Флуоресцентные молекулярные зонды широко используются в биофизических исследованиях. Одними из таких зондов являются молекулярные роторы (МР), у которых после поглощения кванта света происходит изменение конформации молекулы путем поворота одного фрагмента относительно второго, сопровождаемое внутримолекулярным переносом заряда (*twisted intramolecular charge transfer*, ТИСТ) [1–3]. Внутримолекулярное вращение в значительной мере обусловлено растворителем. Особенностью МР является сильная зависимость квантового выхода и длительности затухания флуоресценции от вязкости или жесткости, а в некоторых случаях и полярности микроокружения. По этой причине подобные красители считаются удобными сенсорами (зондами) для определения вязкости растворов [4].

МР широко используются для исследования процессов агрегации белков. Известно, что образование и накопление упорядоченных белковых агрегатов, амилоидных фибрилл (АФ), приводят к ряду тяжелых заболеваний, таких как нейродегенеративные заболевания Альцгеймера и Паркинсона, катаракта, злокачественная миелома, прионные болезни и др. [5].

«Золотым» для исследования и детекции АФ является флуоресцентный зонд тиофлавин Т (ТhТ), образующий с АФ интенсивно флуоресцирующий комплекс [6; 7], в этом случае квантовый выход его флуоресценции увеличивается почти на три порядка [8; 9]. При наличии в растворе белков в нативном или денатурированном состоянии интенсивность свечения возрастает не более чем на один порядок [10; 11]. Благодаря уникальным флуоресцентным свойствам ThТ служит прекрасным средством для диагностики возникновения АФ в условиях *in vitro*. Тем не менее использовать краситель *in vivo* затруднительно. Дело в том, что спектры поглощения и флуоресценции красителя расположены в сине-зеленой области спектра, где поглощение и рассеяние биологического материала являются существенными. В связи с этим синтез и исследование новых красителей, проявляющих свойства молекулярных роторов и флуоресцирующих в длинноволновой (красной) области спектра, представляются актуальными задачами.

К одному из таких красителей относится новый бензтиазоловый краситель – производное тиофлавина Т – 3-сульфопропил-5-метокси-2-[3-(3,5-диэтил-2-бензотиазолидене)-1-пропиенил]-бензотиазолий (Th-C11). Ранее были изучены спектры поглощения красителя в растворителях различной полярности [12]. Установлено, что в воде уже при концентрации более 1 мкмоль/л имеет место агрегация молекул с получением димеров и более сложных структур. Внесение в раствор катионного полиэлектролита – полиаллиламина – усиливает процесс его агрегации и способствует образованию различных форм агрегатов. На основании этого был сделан вывод о том, что данный краситель, в отличие от других производных тиофлавина Т, при нейтральных значениях рН в водных растворах существует в виде аниона.



В настоящей работе исследованы особенности поглощения и флуоресценции нового красителя в растворителях различной полярности и вязкости. Показано, что он проявляет свойства сольватохромного молекулярного ротора, т. е. его спектральные свойства зависят не только от вязкости, но и от полярности растворителя.

Материалы и методы исследования

Спектры поглощения растворов регистрировали с помощью спектрофотометра Specord 200 PC (*Carl Zeiss*, Германия), а спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции – посредством спектрофлуориметра SM 2203 («Солар», Беларусь). Математическая обработка полученных спектров производилась с использованием пакетов *PeakFit 4.12* и *Origin 7.5*.

Измерение длительности затухания свечения производили на импульсном флуорометре [13] с применением метода времякоррелированного счета одиночных фотонов [14]. Для возбуждения флуоресценции использовали излучение импульсного лазерного диода (*PicoQuant*, Германия) с длиной волны 467 нм, длительностью 70 пс и частотой следования импульсов 10 МГц. Система регистрации включала в себя фотоприемный блок PMA-182, а также устройство для времякоррелированного счета одиночных фотонов TimeHarp 200 (*PicoQuant*, Германия). Временное разрешение импульсного флуорометра составляет 60 пс [12]. Анализ кинетики затухания с учетом длительности возбуждающих импульсов и функции отклика системы регистрации выполняли с помощью программного обеспечения, разработанного в Гродненском государственном университете имени Янки Купалы [15; 16].

Функцию $f(t)$, представленную суммой экспонент $f(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i e^{-\frac{t}{\tau_i}}$, использовали для анализа кривых затухания флуоресценции. Среднюю длительность затухания флуоресценции определяли на осно-

вании соотношения $\langle \tau \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i^2}{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i}$, где α_i – предэкспоненциальный множитель (амплитуда); τ_i – длитель-

ность i -й компоненты затухания флуоресценции.

Квантово-химические расчеты соединения Th-C11 выполнялись с применением трехпараметрического гибридного функционала Бекке – Ли – Янга – Парра (B3LYP), основанного на теории функционала плотности, и базисного набора функций 6-31G(d, p). Вычисления проводились для молекулы Th-C11 в газовой фазе. Оптимизация геометрии производилась для соединения в основном (S_0) и возбужденном (S_1) состояниях.

Препараты. Бензтиазоловый краситель Th-C11 синтезирован доцентом кафедры лазерной физики и спектроскопии БГУ А. А. Луговским. Чистота и гомогенность препарата проверялись методом масс-хроматографии. Для приготовления растворов использовались растворители (*Sigma-Aldrich*, США) без дополнительной очистки.

Амилоидные фибриллы готовили из инсулина быка (*Sigma*, США). Инсулин инкубировали в 20 % уксусной кислоте с добавлением 100 ммоль/л NaCl (pH 2,0) при температуре 37 °С и постоянном перемешивании в течение 24 ч. Концентрация белка в растворе составляла 2 мг/мл.

Результаты и их обсуждение

Квантово-химические расчеты показали, что конформация молекулы в основном определяется торсионным углом ϕ (рис. 1, а). Зависимость энергии основного состояния от значения угла ϕ (рис. 2) имеет два максимума: $\phi_1 = 100^\circ$ и $\phi_2 = 270^\circ$. Минимуму энергии молекулы соответствуют торсионные углы $\phi_1 = 0^\circ$ и $\phi_2 = 175^\circ$. Это означает, что в основном состоянии молекула имеет практически плоскую конформацию.

Минимуму энергии молекулы в возбужденном состоянии отвечает конформация, при которой ароматические фрагменты расположены в перпендикулярных плоскостях (см. рис. 1, б). Переход в такое состояние сопровождается внутримолекулярным переносом заряда. В связи с этим в возбужденном состоянии фрагменты молекулы красителя будут испытывать торсионный поворот (торсионную релаксацию), переходя в скрученное состояние (ПСТ-состояние). Как известно, для тиофлавина Т и его производных подобное состояние является нефлуоресцирующим [17–19]. Флуоресценция возможна только из нерелаксированного (*locally excitation*, LE) состояния. Для таких соединений переход в нефлуоресцирующее ПСТ-состояние является основным тушащим процессом. В вязких растворах и при встраивании в структуру полимера торсионное вращение фрагментов молекулы в значительной степени блокируется, что приводит к возрастанию квантовой флуоресценции.

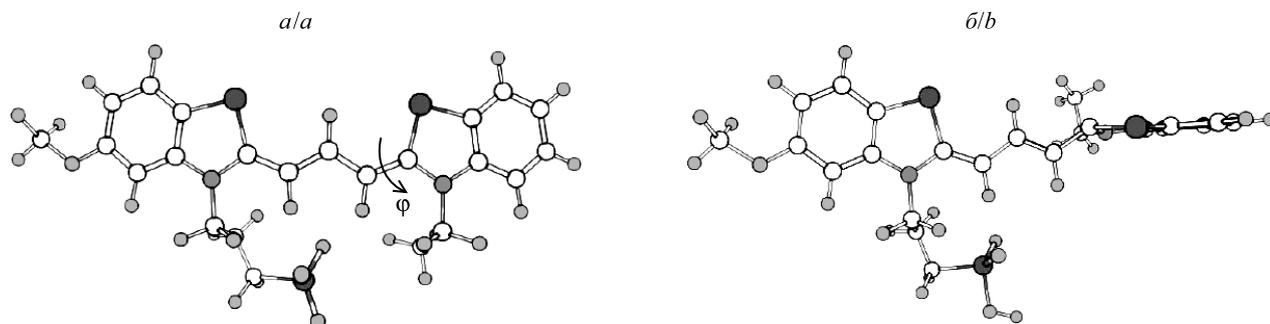


Рис. 1. Конформация Th-C11 в основном (а) и возбужденном франк-кондоновском (б) состояниях

Fig. 1. Th-C11 conformation in the ground (a) and excited Franck-Condon (b) states

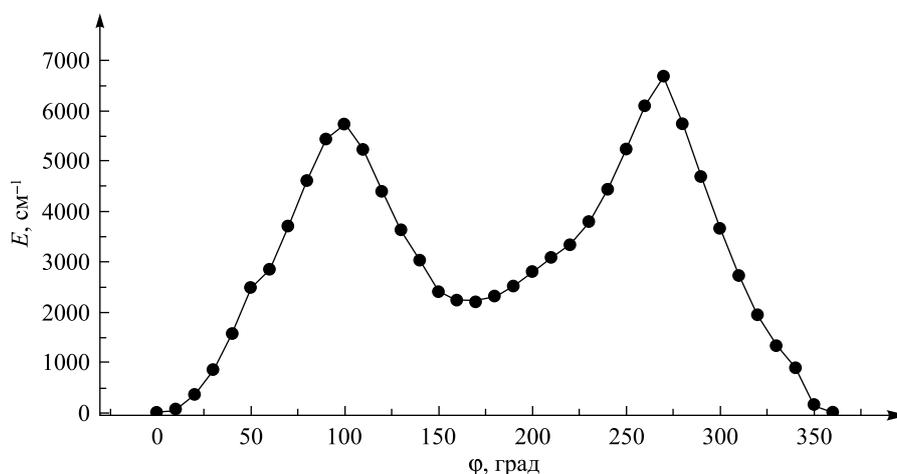


Рис. 2. Зависимость энергии основного состояния соединения Th-C11 от угла φ

Fig. 2. Dependence of Th-C11 energies in the ground state upon φ angle

Как известно, квантовый выход флуоресценции зависит от соотношения константы скорости излучательного (радиационного) перехода k_r и суммы констант скоростей всех остальных процессов, приводящих к безызлучательной дезактивации возбужденного состояния $\sum k_{\text{inr}}$:

$$q = \frac{k_r}{k_r + \sum k_{\text{inr}}} \quad (1)$$

Интеркомбинационная конверсия в триплетное состояние часто является основным путем безызлучательной дезактивации молекул красителей. Однако проведенные нами исследования не выявили фосфоресценции спиртовых растворов Th-C11 в замороженных растворах при температуре 77 К. В таком случае мы можем принять, что, как и для других бензтиазоловых производных, $\sum k_{\text{inr}} \approx k_\varphi$, где k_φ – константа скорости внутренней конверсии, обусловленной поворотом ароматических фрагментов молекулы друг относительно друга в возбужденном состоянии.

Ранее нами было показано [17; 20], что для ThГ и его бензтиазоловых производных высота барьера внутреннего вращения является незначительной и константа скорости торсионной релаксации определяется вязкостью растворителя и гидродинамическими свойствами фрагментов молекулы. Время торсионной релаксации в соответствии с соотношением Дебая – Стокса – Эйнштейна представлено формулой

$$\tau_\varphi = \frac{4\pi a^3 \eta}{3k_B T}, \quad (2)$$

где a – гидродинамический радиус фрагмента молекулы; k_B – постоянная Больцмана; η – вязкость; T – температура раствора. Поскольку константа скорости излучательного перехода не зависит от вязкости и температуры, то $k_\varphi = \frac{1}{\tau_\varphi} \sim \frac{T}{\eta}$ и из (1) и (2) следует соотношение



$$\frac{1}{q} - 1 \sim \frac{T}{\eta} \quad (3)$$

Для экспериментальной проверки предположения о том, что торсионная релаксация является главным тушащим процессом, изучена зависимость спектров и квантового выхода флуоресценции 97 % глицеинового раствора красителя от температуры (рис. 3).

Как видно из рис. 4, зависимость $\frac{1}{q} - 1$ от $\frac{T}{\eta}$ линейная. Это означает, что изменение квантового выхода в изученном интервале температур однозначно определяется соотношением $\frac{T}{\eta}$ в соответствии с рассматриваемым механизмом тушения флуоресценции красителя.

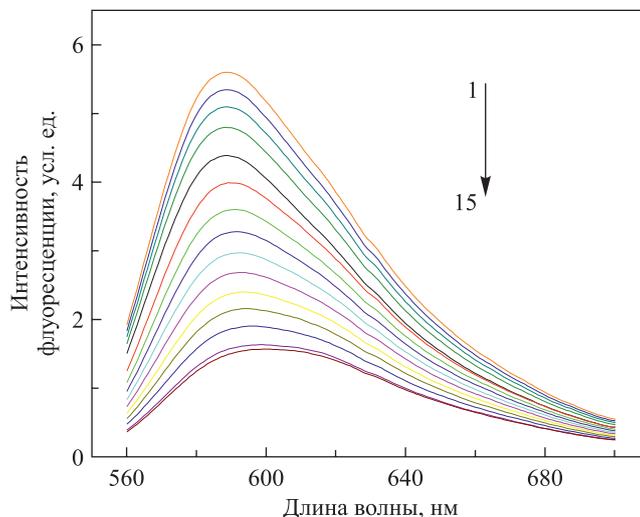


Рис. 3. Спектры флуоресценции Th-C11 в 97 % глицерине при температуре раствора 15–50 °С (сверху вниз, через 2,5 °С)
Fig. 3. Fluorescence spectra of Th-C11 in 97 % glycerol at a solution temperature of 15–50 °С (from top to bottom, after 2.5 °С)

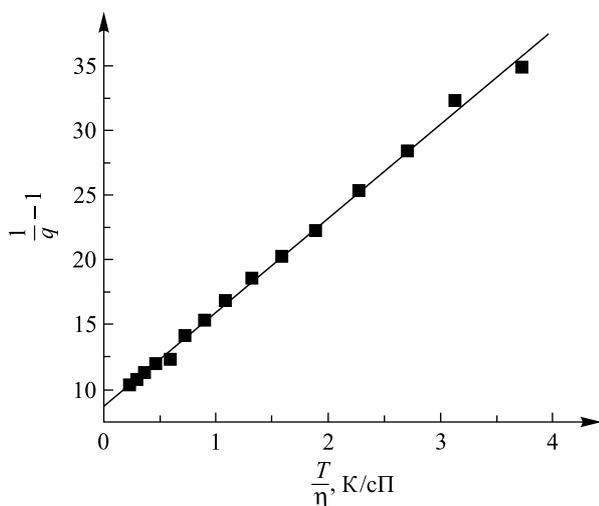


Рис. 4. Зависимость величины $\frac{1}{q} - 1$ от $\frac{T}{\eta}$ для Th-C11 в 97 % глицерине
Fig. 4. Dependence of the $\frac{1}{q} - 1$ vs $\frac{T}{\eta}$ for Th-C11 in 97 % glycerol

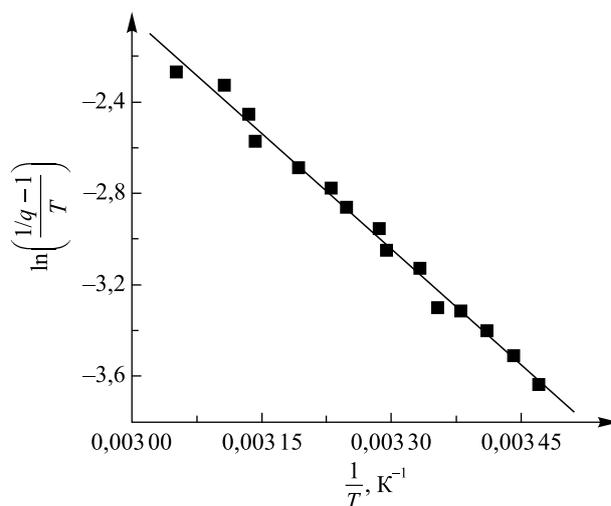


Рис. 5. Зависимость величины $\ln\left(\frac{1/q - 1}{T}\right)$ от $\frac{1}{T}$ для Th-C11 в 97 % глицерине ($E_a = 2,6 \cdot 10^3 \pm 1,2 \cdot 10^2$ (см⁻¹))
Fig. 5. Dependence of the $\ln\left(\frac{1/q - 1}{T}\right)$ vs $\frac{1}{T}$ for Th-C11 in 97 % glycerol ($E_a = 2.6 \cdot 10^3 \pm 1.2 \cdot 10^2$ (см⁻¹))



Зависимость вязкости растворителя от температуры может быть представлена следующим выражением [21]:

$$\frac{1}{\eta} = \frac{1}{\eta_0} \exp\left(\frac{E_a}{k_B T}\right), \quad (4)$$

где E_a – энергия активации вязкого течения растворителя. На основании (3) и (4) можно записать $\frac{1}{q} - 1 \sim T \exp\left(\frac{E_a}{k_B T}\right)$, или $\ln\left(\frac{1/q - 1}{T}\right) \sim \left(\frac{E_a}{k_B T}\right)$. Как видно из рис. 5, зависимость $\ln\left(\frac{1/q - 1}{T}\right)$ от $\frac{1}{T}$ является линейной. Энергия активации, определенная по углу наклона зависимости, составляет $(2,6 \cdot 10^3 \pm 1,2 \cdot 10^2) \text{ см}^{-1}$, что значительно меньше энергии активации вязкого течения 100 % глицерина $(4,7 \cdot 10^3 \text{ см}^{-1})$ [22]. Различие полученных и известных значений E_a может быть вызвано тем, что в настоящей работе использовался 97 % глицерин, а в [22] приводятся данные для 99 % глицерина. Полученный результат служит подтверждением того, что торсионная релаксация фрагментов молекулы Th-C11, а значит, и изменение квантового выхода флуоресценции определяются не энергией активации поворота фрагментов, а вязкостью растворителя. Квантово-химические расчеты зависимости энергии LE-состояния от торсионного угла ϕ , выполненные для ряда бензтиазоловых производных тиофлавина Т, указывают на отсутствие энергетического барьера внутреннего вращения.

Спектральные свойства Th-C11 в различных растворителях
Spectral properties of Th-C11 in various solvents

№ п/п	Растворитель	Квантовый выход, q	λ_{max}^* , нм	$\lambda_{\text{max}}^{**}$, нм	$\langle \tau \rangle$, пс
1	H ₂ O	0,008	555	611	<60
2	Этанол	0,010	560	613	<60
3	1,4-Диоксан	0,025	577	594	200
4	Глицерин (98 %)	0,077	562	590	700
5	H ₂ O + АФ (0,1 мг/мл)	0,150	585	597	1500

Примечание. * – поглощение; ** – флуоресценция.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать вывод о том, что квантовый выход флуоресценции Th-C11, как и других производных тиофлавина Т, зависит от соотношения констант k_r и k_ϕ . В маловязких растворителях $k_\phi \gg k_r$. Квантовый выход флуоресценции красителя низкий (см. таблицу). В вязких растворителях и при встраивании красителя в структуру АФ происходит значительное или полное ограничение торсионного вращения фрагментов молекулы. Это приводит к увеличению квантового выхода его флуоресценции.

Влияние полярности растворителя на спектральные свойства Th-C11

На рис. 6 приведены спектры поглощения Th-C11 в растворителях различной полярности и показаны спектры поглощения красителя в водных растворах при добавлении АФ. Переход от малополярного диоксана к полярному растворителю – воде – приводит к гипсохромному смещению длинноволновой полосы, составляющему приблизительно 22 нм.

Как известно, на спектрально-флуоресцентные свойства полярных молекул наиболее существенное влияние оказывают диполь-дипольные (ориентационные) взаимодействия. Диполь-дипольная релаксация связана с поворотом молекул хромофора и растворителя и требует некоторого времени, значительно большего, чем время перехода из основного состояния в возбужденное. Поэтому стабилизация основного состояния S_0 в полярном растворителе является более значительной, чем возбужденного S_1 (рис. 7, а), и энергия электронного перехода из состояния S_0 в S_1 увеличивается, а длина волны перехода уменьшается. Это приводит к коротковолновому сдвигу спектров поглощения в полярных растворителях. Энергия стабилизации основного состояния зависит от полярности, но не зависит от вязкости растворителя, поэтому спектры поглощения красителя в полярных растворителях (вода, спирты, глицерин) имеют коротковолновое положение (см. рис. 6 и таблицу).

В отличие от спектров поглощения положение максимума спектра испускания оказалось значительно менее чувствительным к полярности растворителя. Действительно, переход от водного раствора к малополярному диоксану сопровождается коротковолновым сдвигом спектра, составляющим всего



16 нм, в то время как смещение спектра поглощения равняется 22 нм. Для объяснения этого рассмотрим фотофизические процессы в возбужденном состоянии молекулы Th-C11. После поглощения кванта света молекулы Th-C11 переходят в неравновесное франк-кондоновское состояние, откуда после колебательной релаксации совершается переход в неравновесное LE-состояние (см. рис. 7, *a–в*, обозначено как S_1). Вероятность последующих переходов зависит от вязкости и полярности микроокружения, в котором находятся молекулы. Рассмотрим наиболее важные случаи.

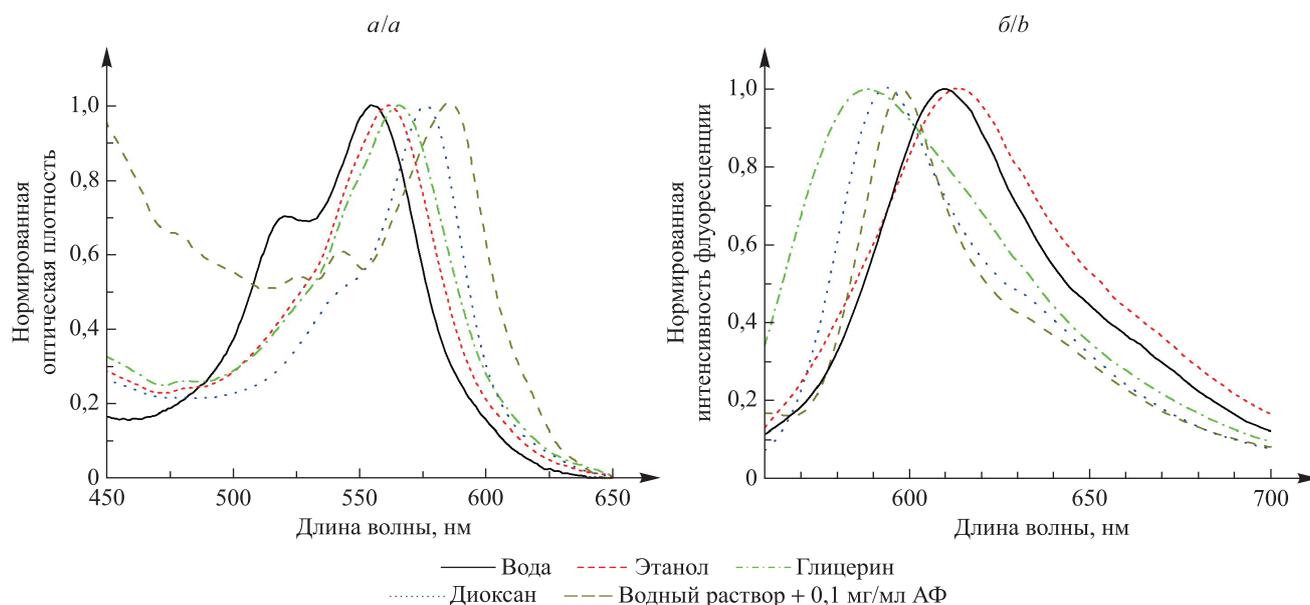


Рис. 6. Нормированные спектры поглощения (*a*) и флуоресценции (*б*) Th-C11 с концентрацией $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л в различных растворителях

Fig. 6. Normalised absorption (*a*) and fluorescence (*b*) spectra of Th-C11 of concentration $5 \cdot 10^{-6}$ mol/L in various solvents

Изолированные молекулы, находящиеся в возбужденном состоянии S_1 , испытывают быструю торсионную релаксацию (см. рис. 7, *a*). Радиационное время затухания флуоресценции τ_r можно оценить, используя связь квантового выхода и средней длительности $\langle \tau \rangle$ затухания флуоресценции $q = \frac{\tau_r}{\langle \tau \rangle}$.

Значения q и $\langle \tau \rangle$ приведены в таблице. Расчет показывает, что для Th-C11 величина τ_r составляет 10 нс. Время торсионной релаксации фрагментов молекулы не превышает 1 пс. В результате торсионного вращения молекула из плоской конформации переходит в скрученное состояние S_1 (ТИСТ), которое является нефлуоресцирующим. Вследствие этого основной вклад в излучение будут создавать лишь молекулы красителя, для них торсионный угол φ' немного отличается от нуля. Энергетический уровень $S_1(\varphi')$, показанный на рис. 7, соответствует некоторому усредненному по времени торсионному углу φ' излучающих молекул Th-C11. Поскольку $k_\varphi \gg k_r$, то доля флуоресцирующих молекул является очень незначительной и длительность затухания флуоресценции фактически равняется времени торсионной релаксации ($\tau \approx \frac{1}{k_\varphi} = \tau'_\varphi$).

Основная часть молекул вследствие торсионной релаксации переходят в состояние S_1 (ТИСТ). Положение спектра флуоресценции в этом случае будет наиболее коротковолновым, а квантовый выход флуоресценции – чрезвычайно низким.

В неполярных растворителях, обладающих невысокой вязкостью (на рис. 7 схема не представлена), из-за сил трения скорость торсионного вращения значительно меньше скорости торсионного вращения молекул в вакууме. Но и в таком случае $k_\varphi \gg k_r$, поэтому уровень $S_1(\varphi')$ расположен выше, чем аналогичный уровень для изолированных молекул (см. рис. 7, *a*). По этой причине спектр флуоресценции красителя в растворителе малой вязкости более коротковолновый, чем спектр флуоресценции изолированных молекул. Длительность затухания флуоресценции будет также экстремально короткой ($\tau \approx \tau_\varphi$), а квантовый выход – низким.

Если маловязкий растворитель является **полярным** (см. рис. 7, *б*), то, кроме торсионной релаксации, определенный вклад в смещение спектра испускания вносит сольватная релаксация, имеющая большую

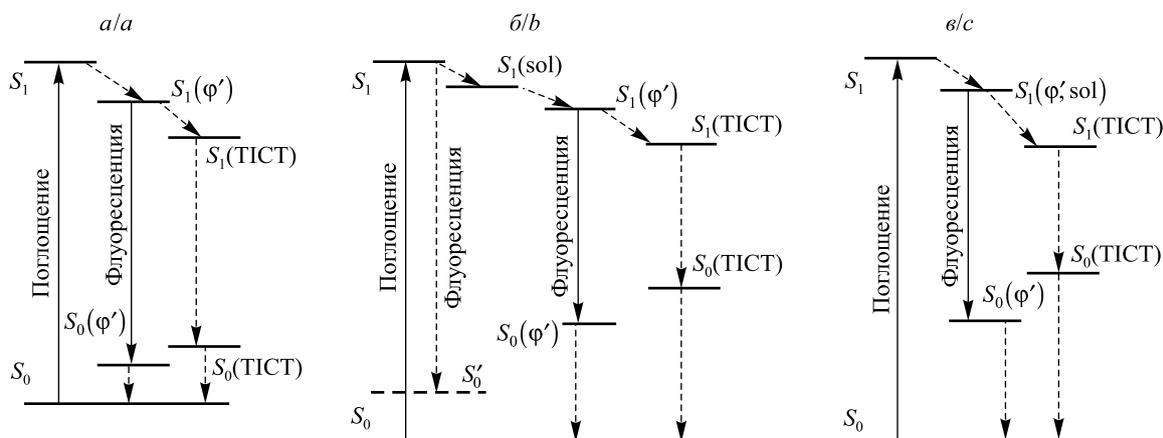


Рис. 7. Схемы, поясняющие зависимость положения спектра флуоресценции от полярности и вязкости растворителя:

- a* – изолированные молекулы (неполярный маловязкий растворитель);
- б* – полярный маловязкий растворитель; *в* – полярный вязкий растворитель.
- S_0 обозначает основное равновесное состояние молекулы, при котором молекула имеет плоскую структуру;
- $S_0(\varphi')$ – основное неравновесное состояние, характеризующееся торсионным углом φ' ;
- $S_0(\text{TICT})$ – основное неравновесное состояние, которому соответствует скрученная конформация молекулы, характеризующаяся торсионным углом $\varphi = 90^\circ$; $S_1(\varphi')$ – возбужденное неравновесное, частично релаксированное состояние, которому соответствует торсионный угол φ' ;
- $S_1(\text{TICT})$ – возбужденное неравновесное состояние, соответствующее скрученной конформации молекулы ($\varphi = 90^\circ$); $S_1(\text{sol})$ – возбужденное неравновесное, частично релаксированное (по растворителю) состояние;
- $S_1(\varphi', \text{sol})$ – частично релаксированное (по растворителю) состояние, характеризующееся торсионным углом φ'

Fig. 7. Diagrams explaining the dependence of the position of the fluorescence spectrum on the polarity and viscosity of the solvent:

- a* – isolated molecules (non-polar low-viscosity solvent);
- б* – polar low-viscosity solvent; *в* – polar viscous solvent.
- S_0 is the ground equilibrium state of the molecule, in which it has a flat structure;
- $S_0(\varphi')$ – ground non-equilibrium state characterised by torsion angle φ' ;
- $S_0(\text{TICT})$ – the ground non-equilibrium state, which corresponds to the twisted conformation of the molecule, characterised by a torsion angle ($\varphi = 90^\circ$); $S_1(\varphi')$ – excited non-equilibrium, partially relaxed state, which corresponds to the torsion angle φ' ; $S_1(\text{TICT})$ – an excited non-equilibrium state corresponding to the twisted conformation of the molecule ($\varphi = 90^\circ$); $S_1(\text{sol})$ – excited non-equilibrium partially relaxed (by solvent) state; $S_1(\varphi', \text{sol})$ is a partially relaxed (by solvent) state characterised by a torsion angle φ'

скорость, чем торсионная. Это приводит к уменьшению энергии возбужденного состояния молекулы, однако вероятность излучательного перехода при этом не изменяется. Поскольку при переходе в возбужденное состояние дипольный момент молекулы Th-C11 увеличивается незначительно, то энергия молекулы вследствие этого процесса изменится несущественно. Торсионная релаксация сопровождается сольватной релаксацией и будет еще более медленной, чем в случае, показанном на рис. 7, б.

Однако поскольку $k_r \gg k_f = \frac{1}{\tau}$, то энергия состояния $S_1(\varphi')$ на рис. 7, б, больше энергии состояния $S_1(\varphi')$ на рис. 7, а. Соответственно, энергия излучательного перехода $S_1(\varphi') \rightarrow S_0(\varphi')$ станет меньше, чем в случае, показанном на рис. 7, а. Это приводит к тому, что спектр поглощения ThT в полярном растворителе является более коротковолновым, а спектр флуоресценции – более длинноволновым, чем в неполярном. Длительность затухания флуоресценции, как и в случае неполярного маловязкого растворителя, будет равна времени торсионной релаксации ($\tau \approx \tau_\phi$). Правильность подобных рассуждений подтверждают приведенные на рис. 6 спектры поглощения и флуоресценции, а также данные таблицы.

В вязком полярном растворителе (см. рис. 7, в) скорость сольватной и торсионной релаксаций сопоставима со скоростью излучательного перехода. Торсионное вращение фрагментов молекулы сопровождается сольватной релаксацией, но, как и в случае, показанном на рис. 7, б, основной вклад в излучение вносят частично релаксированные молекулы, для которых торсионный угол φ' мало отличается от нуля. Максимуму спектра флуоресценции соответствует переход $S_1(\varphi', \text{sol}) \rightarrow S_0(\varphi')$. При увеличении полярности растворителя спектр флуоресценции Th-C11 испытывает длинноволновый сдвиг. При этом изменение вязкости растворителя мало влияет на положение спектра флуоресценции красителя.



Таким образом, квантовый выход и длительность затухания флуоресценции красителя определяются главным образом соотношением констант скорости излучательного перехода и торсионной релаксации, которая зависит от вязкости или жесткости микроокружения, если краситель встраивается в макромолекулы. На положение спектра флуоресценции, кроме указанных факторов, оказывает влияние полярность растворителя в большей степени, чем вязкость. Поскольку флуоресценция происходит из неравновесного возбужденного состояния, когда релаксация осуществляется лишь частично, положение спектра поглощения в большей степени зависит от полярности растворителя, чем положение спектра флуоресценции.

Данная модель фотофизических процессов в молекуле Th-C11 позволяет объяснить не только зависимость спектральных свойств красителя от полярности и вязкости растворителя, а также закономерности их изменения при встраивании в АФ и белки. Действительно, в этом случае микроокружение молекул красителя достаточно жесткое и релаксация состояний S_0 и S_1 является очень ограниченной, так что уменьшение энергии этих состояний будет незначительным. Поглощению молекул красителя, встроенного в структуру фибрилл, соответствует переход $S_0 \rightarrow S_1$, представленный на рис. 7, а. Флуоресценции отвечает переход $S_1 \rightarrow S'_0$, показанный на рис. 7, б, пунктиром. Это приводит к тому, что спектр поглощения водного раствора в присутствии АФ имеет батохромный сдвиг по сравнению с аналогичным спектром в маловязких растворителях, а спектр флуоресценции – гипсохромный. Именно такие спектральные закономерности наблюдаются на опыте: спектр поглощения Th-C11, встроенного в АФ из инсулина, имеет максимум на 585 нм, спектр флуоресценции – на 597 нм.

Соотношение (1) было получено при предположении, что торсионная релаксация является единственным тушащим процессом. Соответственно, при отсутствии этого процесса, что имеет место при $T \rightarrow 0$ и $\eta \rightarrow \infty$, квантовый выход должен быть равен единице. Однако экстраполяция зависимости $\frac{T}{\eta} \rightarrow 0$ имеет квантовый выход $q \approx 0,10$. Это указывает на существование некоторого не зависящего от температуры и вязкости тушащего процесса. Как уже отмечалось, переход в триплетное состояние не может рассматриваться как вероятный фактор тушения. Одним из таких факторов является внутримолекулярный перенос заряда, не связанный с поворотом фрагментов молекулы и приводящий к дезактивации возбужденного состояния молекулы. Исследованию роли таких процессов в молекуле Th-C11 будут посвящены следующие наши работы.

Заключение

Изучены спектры поглощения и флуоресценции нового бензтиазолового красителя Th-C11. Данный краситель характеризуется длинноволновым положением спектра поглощения (555 нм) и флуоресценции (610 нм).

В результате квантово-химических расчетов установлено, что в основном состоянии молекула имеет планарную структуру. Минимуму энергии молекулы в возбужденном состоянии соответствует скрученная конформация с ортогональным расположением ароматических колец (TICT-состояние). TICT-состояние является нефлуоресцирующим. Переход в TICT-состояние (торсионная релаксация) приводит к безызлучательной дезактивации и является тушащим флуоресценцию процессом. Значительное увеличение квантового выхода и длительности затухания флуоресценции красителя в вязких растворах и при внесении в раствор АФ обусловлено ограничением торсионного вращения фрагментов молекулы.

Возрастание полярности растворителя приводит к коротковолновому сдвигу спектров поглощения и длинноволновому сдвигу спектров флуоресценции. Наблюдаемые изменения спектров объясняются проявлением процессов торсионной и сольватной релаксаций, протекающих в системе хромофор – сольватная оболочка.

Полученные результаты показывают, что новый краситель является перспективным флуоресцентным маркером, чувствительным к полярности и вязкости микроокружения и обладающим длинноволновой полосой поглощения и флуоресценции.

Библиографические ссылки

1. Viriot ML, Carré MC, Geoffroy-Chapotot C, Brembilla A, Muller S, Stoltz JF. Molecular rotors as fluorescent probes for biological studies. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 1998;19:151–160.
2. Howell S, Dakanali M, Theodorakis EA, Haidekker MA. Intrinsic and extrinsic temperature-dependency of viscosity-sensitive fluorescent molecular. *Journal of Fluorescence*. 2012;22(1):457–465. DOI: 10.1007/s10895-011-0979-z.
3. Kuimova MK, Yahioglu G, Levitt JA, Suhling K. Molecular rotor measures viscosity of live cells via fluorescence lifetime imaging. *Journal of the American Chemical Society*. 2008;130(21):6672–6673. DOI: 10.1021/ja800570d.
4. Haidekker MA, Brady TP, Lichlyter D, Theodorakis EA. A ratiometric fluorescent viscosity sensor. *Journal of the American Chemical Society*. 2006;128(2):398–399. DOI: 10.1021/ja056370a.



5. Uversky VN, Talapatra A, Gillespie JR, Fink AL. Protein deposits as the molecular basis of amyloidosis. Part II. Localised amyloidosis and neurodegenerative disorders. *Medical Science Monitor*. 1999;5(6):1238–1254.
6. Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. Fluorometric determination of amyloid fibrils *in vitro* using the fluorescent dye, thioflavin T. *Analytical Biochemistry*. 1989;177(2):244–249. DOI: 10.1016/0003-2697(89)90046-8.
7. LeVine H. Thioflavine T interaction with amyloid β -sheet structures. *Journal of Protein Folding Disorders*. 1995;2(1):1–6. DOI: 10.3109/13506129509031881.
8. Voropai ES, Samtsov MP, Kaplevskii KN, Maskevich AA, Stepuro VI, Povarova OI, et al. Spectral properties of thioflavin T and its complexes with amyloid fibrils. *Journal of Applied Spectroscopy*. 2003;70(6):868–874. DOI: 10.1023/B:JAPS.0000016303.37573.7e.
9. Sulatskaya AI, Maskevich AA, Kuznetsova IM, Uversky VN, Turoverov KK. Fluorescence quantum yield of thioflavin T in rigid isotropic solution and incorporated into the amyloid fibrils. *PLoS ONE*. 2010;5(10):e15385. DOI: 10.1371/journal.pone.0015385.
10. Rovnyagina NR, Sluchanko NN, Tikhonova TN, Fadeev VV, Litskevich AYu, Maskevich AA, et al. Binding of thioflavin T by albumins: an underestimated role of protein oligomeric heterogeneity. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018; 108:284–290. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.002.
11. Маскевич АА, Кургузенков СА, Лавыш АВ. Флуоресцентные свойства тиофлавина Т при его встраивании в нативные и денатурированные белки. *Вестник Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Серыя 2. Матэматыка. Фізіка. Інфарматыка, вылічальная тэхніка і кіраванне*. 2013;2:75–85.
12. Маскевич АА. Спектральные проявления процессов агрегации и встраивания в амилоидные фибриллы анионного производного тиофлавина Т. *Вестник Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Серыя 2. Матэматыка. Фізіка. Інфарматыка, вылічальная тэхніка і кіраванне*. 2020;10(1):83–92.
13. Маскевич АА, Степура ВИ, Кургузенков СА, Лавыш АВ. Комплекс аппаратных и программных средств для исследования кинетики затухания флуоресценции. *Вестник Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Серыя 2. Матэматыка. Фізіка. Інфарматыка, вылічальная тэхніка і кіраванне*. 2013;3:107–119.
14. O'Connor DV, Phillips D. *Time-correlated single photon counting*. New York: Academic Press; 1984. 298 p. DOI: 10.1016/B978-0-12-524140-3.X5001-1.
15. Степура ВИ. Изучение кривых затухания многокомпонентных систем с использованием глобального анализа. *Вестник Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Серыя 2. Матэматыка. Фізіка. Інфарматыка, вылічальная тэхніка і кіраванне*. 2001;1:52–61.
16. Маскевич АА, Степура ВИ, Балинский ПТ. Анализ кинетики затухания флуоресценции тиофлавина Т методом максимума энтропии. *Журнал прикладной спектроскопии*. 2010;77(2):209–217.
17. Stsiapura VI, Maskevich AA, Kuzmitsky VA, Uversky VN, Kuznetsova IM, Turoverov KK. Thioflavin T as a molecular rotor: fluorescent properties of thioflavin T in solvents with different viscosity. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2008;112(49):15893–15902. DOI: 10.1021/jp805822c.
18. Singh PK, Kumbhakar M, Pal H, Nath S. Viscosity effect on the ultrafast bond twisting dynamics in an amyloid fibril sensor: thioflavin-T. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2010;114(17):5920–5927. DOI: 10.1021/jp100371s.
19. Amdursky N, Erez Y, Huppert D. Molecular rotors: what lies behind the high sensitivity of the thioflavin-T fluorescent marker. *Accounts of Chemical Research*. 2012;45(9):1548–1557. DOI: 10.1021/ar300053p.
20. Sulatskaya AI, Sulatsky MI, Povarova OI, Rodina NP, Kuznetsova IM, Lugovskii AA, et al. Trans-2-[4-(dimethylamino)styryl]-3-ethyl-1,3-benzothiazolium perchlorate – new fluorescent dye for testing of amyloid fibrils and study of their structure. *Dyes and Pigments*. 2018;157(9):385–395. DOI: 10.1016/j.dyepig.2018.05.006.
21. Loutfy RO, Arnold BA. Effect of viscosity and temperature on torsional relaxation of molecular rotors. *The Journal of Physical Chemistry*. 1982;86(21):4205–4211. DOI: 10.1021/j100218a023.
22. Segur JB. Physical properties of *glycerol* and its solutions. In: Miner CS, Dalton NN, editors. *Glycerol*. New York: Reinhold Publishing Corporation; 1953. p. 238–334.

References

1. Viriot ML, Carré MC, Geoffroy-Chapotot C, Brembilla A, Muller S, Stoltz JF. Molecular rotors as fluorescent probes for biological studies. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 1998;19:151–160.
2. Howell S, Dakanali M, Theodorakis EA, Haidekker MA. Intrinsic and extrinsic temperature-dependency of viscosity-sensitive fluorescent molecular. *Journal of Fluorescence*. 2012;22(1):457–465. DOI: 10.1007/s10895-011-0979-z.
3. Kuimova MK, Yahioglu G, Levitt JA, Suhling K. Molecular rotor measures viscosity of live cells via fluorescence lifetime imaging. *Journal of the American Chemical Society*. 2008;130(21):6672–6673. DOI: 10.1021/ja800570d.
4. Haidekker MA, Brady TP, Lichlyter D, Theodorakis EA. A ratiometric fluorescent viscosity sensor. *Journal of the American Chemical Society*. 2006;128(2):398–399. DOI: 10.1021/ja056370a.
5. Uversky VN, Talapatra A, Gillespie JR, Fink AL. Protein deposits as the molecular basis of amyloidosis. Part II. Localised amyloidosis and neurodegenerative disorders. *Medical Science Monitor*. 1999;5(6):1238–1254.
6. Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. Fluorometric determination of amyloid fibrils *in vitro* using the fluorescent dye, thioflavin T. *Analytical Biochemistry*. 1989;177(2):244–249. DOI: 10.1016/0003-2697(89)90046-8.
7. LeVine H. Thioflavine T interaction with amyloid β -sheet structures. *Journal of Protein Folding Disorders*. 1995;2(1):1–6. DOI: 10.3109/13506129509031881.
8. Voropai ES, Samtsov MP, Kaplevskii KN, Maskevich AA, Stepuro VI, Povarova OI, et al. Spectral properties of thioflavin T and its complexes with amyloid fibrils. *Journal of Applied Spectroscopy*. 2003;70(6):868–874. DOI: 10.1023/B:JAPS.0000016303.37573.7e.
9. Sulatskaya AI, Maskevich AA, Kuznetsova IM, Uversky VN, Turoverov KK. Fluorescence quantum yield of thioflavin T in rigid isotropic solution and incorporated into the amyloid fibrils. *PLoS ONE*. 2010;5(10):e15385. DOI: 10.1371/journal.pone.0015385.
10. Rovnyagina NR, Sluchanko NN, Tikhonova TN, Fadeev VV, Litskevich AYu, Maskevich AA, et al. Binding of thioflavin T by albumins: an underestimated role of protein oligomeric heterogeneity. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018; 108:284–290. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.002.



11. Maskevich AA, Kurguzenkov SA, Lavysh AV. [Fluorescent properties of thioflavin T incorporated in native and denatured proteins]. *Vesnik Grodzenskaga dzjarzhavnaga wniwersitjeta imja Janki Kupaly. Seryja 2. Matjematyka. Fizika. Infarmatyka, vylichal'naja tjechnika i kiravanne*. 2013;2:75–85. Russian.
12. Maskevich AA. Spectral manifestations of the processes of aggregation and incorporation into the amyloid fibrils of the anionic derivative of thioflavin T. *Vesnik Grodzenskaga dzjarzhavnaga wniwersitjeta imja Janki Kupaly. Seryja 2. Matjematyka. Fizika. Infarmatyka, vylichal'naja tjechnika i kiravanne*. 2020;10(1):83–92. Russian.
13. Maskevich AA, Stsiapura VI, Kurguzenkov SA, Lavysh AV. [Hardware and software complex for fluorescence decay studies]. *Vesnik Grodzenskaga dzjarzhavnaga wniwersitjeta imja Janki Kupaly. Seryja 2. Matjematyka. Fizika. Infarmatyka, vylichal'naja tjechnika i kiravanne*. 2013;3:107–119. Russian.
14. O'Connor DV, Phillips D. *Time-correlated single photon counting*. New York: Academic Press; 1984. 298 p. DOI: 10.1016/B978-0-12-524140-3.X5001-1.
15. Stsiapura VI. [Fluorescence kinetics study of multicomponent systems using global analysis method]. *Vesnik Grodzenskaga dzjarzhavnaga wniwersitjeta imja Janki Kupaly. Seryja 2. Matjematyka. Fizika. Infarmatyka, vylichal'naja tjechnika i kiravanne*. 2001; 1:52–61. Russian.
16. Maskevich AA, Stsiapura VI, Balinski PT. Analysis of fluorescence decay kinetics of thioflavin T by maximum entropy method. *Zhurnal prikladnoi spektroskopii*. 2010;77(2):209–217. Russian.
17. Stsiapura VI, Maskevich AA, Kuzmitsky VA, Uversky VN, Kuznetsova IM, Turoverov KK. Thioflavin T as a molecular rotor: fluorescent properties of thioflavin T in solvents with different viscosity. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2008;112(49):15893–15902. DOI: 10.1021/jp805822c.
18. Singh PK, Kumbhakar M, Pal H, Nath S. Viscosity effect on the ultrafast bond twisting dynamics in an amyloid fibril sensor: thioflavin-T. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2010;114(17):5920–5927. DOI: 10.1021/jp100371s.
19. Amdursky N, Erez Y, Huppert D. Molecular rotors: what lies behind the high sensitivity of the thioflavin-T fluorescent marker. *Accounts of Chemical Research*. 2012;45(9):1548–1557. DOI: 10.1021/ar300053p.
20. Sulatskaya AI, Sulatsky MI, Povarova OI, Rodina NP, Kuznetsova IM, Lugovskii AA, et al. Trans-2-[4-(dimethylamino)styryl]-3-ethyl-1,3-benzothiazolium perchlorate – new fluorescent dye for testing of amyloid fibrils and study of their structure. *Dyes and Pigments*. 2018;157(9):385–395. DOI: 10.1016/j.dyepig.2018.05.006.
21. Loutfy RO, Arnold BA. Effect of viscosity and temperature on torsional relaxation of molecular rotors. *The Journal of Physical Chemistry*. 1982;86(21):4205–4211. DOI: 10.1021/j100218a023.
22. Segur JB. Physical properties of *glycerol* and its solutions. In: Miner CS, Dalton NN, editors. *Glycerol*. New York: Reinhold Publishing Corporation; 1953. p. 238–334.

Получена 01.02.2021 / исправлена 15.03.2021 / принята 16.03.2021.
Received 01.02.2021 / revised 15.03.2021 / accepted 16.03.2021.