

Фотофизические свойства комплекса индотрикарбоцианинового красителя и липид-переносящего белка NsLTP1

Д. С. Тарасов¹⁾, М. П. Самцов¹⁾, А. П. Луговский¹⁾, Ю. И. Ощепкова²⁾

¹⁾ Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
e-mail: dmitrij-tarasov@list.ru

²⁾ Институт биоорганической химии АН РУз, Ташкент, Узбекистан,
e-mail: joshchepkova05@rambler.ru

Отработана методика получения стабильного комплекса трикарбоцианинового красителя с липид-переносящим белком Ns-LTP1. На основании анализа спектров поглощения и флуоресценции, поляризации флуоресценции, спектров возбуждения и кинетики затухания флуоресценции красителя в процессе комплексообразования установлена ковалентная связь белка NsLTP1 с мономерами и агрегатами молекул трикарбоцианинового красителя.

Ключевые слова: индотрикарбоцианиновые красители; липид-переносящий белок NsLTP1; фотофизические свойства; комплексообразование.

Photophysical properties of the complex of indotricarbocyanine dye and lipid transfer protein NsLTP1

D. S. Tarasov¹⁾, M. P. Samtsov¹⁾, A. P. Lugovski¹⁾, Yu. I. Oshchepkova²⁾

¹⁾ A. N. Sevchenko Institute for Applied Physical Problems of Belarusian State University, Minsk, Belarus, e-mail: dmitrij-tarasov@list.ru

²⁾ Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan, e-mail: joshchepkova05@rambler.ru

A method for obtaining a stable complex of tricarbocyanine dye with the lipid transfer protein Ns-LTP1 has been developed. Based on the analysis of absorption and fluorescence spectra, fluorescence polarization, excitation spectra and fluorescence decay kinetics of the dye during complex formation, a covalent bond of the Ns-LTP1 protein with monomers and aggregates of tricarbocyanine dye molecules was established.

Keywords: indotricarbocyanine dyes; lipid transfer protein NsLTP1; photophysical properties; complexation.

Введение

По современным требованиям, препараты и методы для местного лечения эрозивно-язвенных поражений должны оказывать комплексное воздействие на все составляющие раневого процесса. С этой точки зрения, наиболее перспективны многокомпонентные лекарственные средства и методы, обладающие одновременно антимикробным, некролитическим, обезболивающим, дегидратирующим действием, противовоспалительными и репаративными эффектами. В этом отношении представляется перспективным метод фотодинамической терапии (ФДТ), для которого в последние годы выявлена высокая эффективность для лечения гнойных ран [1]. Фотодинамическая терапия способна воздействовать на все фазы раневого

процесса: обладает антимикробным и противовоспалительным действием, корректирует метаболические и иммунологические изменения в тканях, ускоряет эпителизацию. Большим потенциалом в качестве фотосенсибилизаторов для антимикробной ФДТ при лечении эрозивно-язвенных поражений обладают индотрикарбоцианиновые красители, которые активируются световым излучением в окне прозрачности биологических тканей. Для ряда симметричных трикарбоцианиновых красителей, содержащих в качестве гетероциклических концевых групп 2-хинолино-, 4-хинолино- и индолениновые циклы показана высокая антистафилококковая и противогрибковая активность.

В процессе заживления и регенерации тканей наиболее активно участвуют биологически активные вещества пептидной природы, относящиеся к классу липидпереносящих белков, за счет взаимодействия с бислойными липидными мембранами при наличии в своем составе таких фосфолипидов как диацилглицерол, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол. Сотрудниками лаборатории химия белков и пептидов ИБОХ АН РУз был выделен и охарактеризован новый липидпереносящий белок Ns-LTP1 в семенах и проростках чернушки посевной, или черного тмина (*Nigella sativa*): катионный полипептид с молекулярной массой 9602 Да, содержит 8 цистеиновых остатков, образующих 4 дисульфидные связи [2]. В работе [3] было показано, что данный пептид содержит в своем составе фосфатидилхолин и, следовательно, может участвовать в процессе заживления и регенерации тканей. В исследованиях на моделях неспецифического язвенного колита у крыс, установлено, что новый белок обладает противовоспалительным и противоязвенным эффектом.

Данная работа посвящена созданию и исследованию свойств комплекса полипептида Ns-LTP1 и индотрикарбоцианиновых красителей.

1. Объекты и методы исследования

Липид-переносящий белок NsLTP1 выделен из чернушки посевной *Nigella sativa* в лаборатории химии белков и пептидов Института биоорганической химии АН Республики Узбекистан [2, 3].

В качестве фотосенсибилизатора при создании комплексов с белком NsLTP1 использованы оригинальные индотрикарбоцианиновые красители (рис. 1), которые проявляют выраженный фотодинамический эффект при активации светом в окне прозрачности биотканей [4]. Синтез красителей осуществлен в лаборатории спектроскопии Института прикладных физических проблем им. А. Н. Севченко. В качестве стратегии создания комплексов красителя с белком NsLTP1 выбран распространенный при мечении флуоресцентными красителями белков подход – использование красителей в форме активированных эфиров [5, 6]. Активированные красители являются реакционноспособными производными, которые способны взаимодействовать с аминок группами биомолекул. В связи с этим синтезированы краситель ПК1 и его N-гидроксисукцинимидный эфир – краситель ПК2.

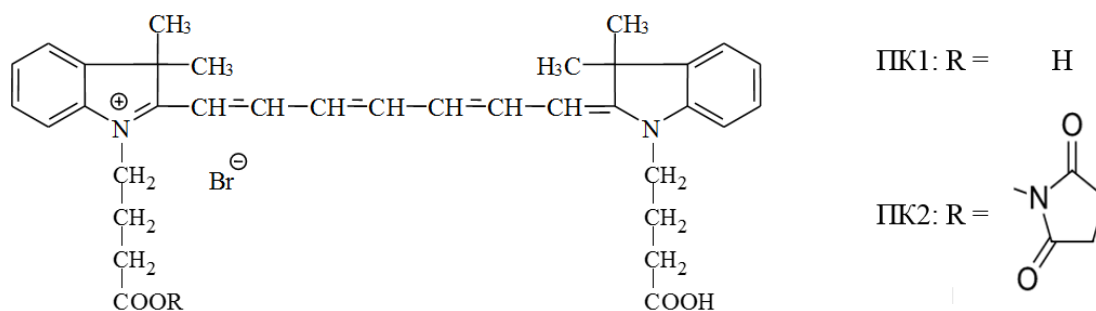


Рис. 1. Структура исходного красителя (ПК1) и его активированного эфира (ПК2)

Электронные спектры поглощения регистрировались с помощью спектрофотометра PV 1251B фирмы Solar. Флуоресцентные характеристики красителей исследовались с помощью спектрофлуориметра Fluorolog. Образцы во время флуоресцентных измерений термостатировались. Измерения проводились при различных концентрациях красителей в диапазоне от 10^{-8} М до 10^{-4} М, поэтому использовались кюветы с толщиной образцов от 50 мм до 0,13 мм.

Исследование фотофизических свойств красителей при взаимодействии с белком NsLTP1 проводили в натрий-калиевом фосфатном буфере Дюльбекко (0,14 моль/л) с pH = 7,4 (ФСБ). В отдельных экспериментах использовался органический растворитель 1,2-дихлорэтан (ДХЭ). Дихлорэтан практически не растворим в воде и эффективно экстрагирует свободные красители из воды.

2. Результаты и их обсуждение

Определены спектрально-люминесцентные и фотофизические характеристики исходного красителя ПК1 и его активированного эфира ПК2 в ФСБ, а также красителя в комплексе с белком NsLTP1 в ФСБ (таблица, рис. 2).

Фотофизические свойства красителей и комплекса красителя с белком NsLTP1 в ФСБ и ДХЭ ($C_{кр} \sim 10^{-6}$ М)

Образец		λ_{abs}^{max} , нм	$\Delta\lambda_{abs}$, нм	λ_f^{max} , нм	$\Delta\lambda_f$, нм	τ (18 °C), нс	P (18 °C), %
ФСБ	ПК1	745	56	772	49	$0,3 \pm 0,1$	27 ± 2
	ПК2	745	56	772	49	$0,3 \pm 0,1$	27 ± 2
	ПК2-NsLTP1	747	142	772	49	$0,5 \pm 0,1$	31 ± 2
ДХЭ	ПК1	763	66	789	55	$0,8 \pm 0,1$	8 ± 1
	ПК2	763	66	789	55	$0,8 \pm 0,1$	8 ± 1

В разбавленных растворах в ФСБ ($\sim 10^{-6}$ М) красители ПК1 и ПК2 характеризуются практически идентичными спектрально-люминесцентными и фотофизическими характеристиками (рис. 2, таблица). Наблюдается совпадение формы спектров поглощения и флуоресценции, длительности затухания и поляризации флуоресценции. При концентрациях $\sim 10^{-6}$ М длинноволновая полоса поглощения имеет типичную форму для трикарбоцианиновых красителей [4]: узкая полоса ($\Delta\lambda = 56$ нм) с максимумом на 745 нм с выраженным колебательным плечом на коротковолновом краю. Спектр флуоресценции красителей не зависит от длины волны

регистрации. Максимум спектра флуоресценции располагается на длине волны 772 нм. Кинетика затухания флуоресценции наилучшим образом аппроксимируется одной экспонентой с длительностью затухания $0,3 \pm 0,1$ нс. Степень поляризации флуоресценции 27 ± 2 %. Такое достаточно большое значение коррелирует с коротким временем затухания флуоресценции. Спектр возбуждения флуоресценции красителей при концентрациях $\sim 10^{-6}$ М не зависит от длины волны регистрации и совпадает по форме со спектром поглощения. Это позволяет утверждать, что при таких концентрациях в ФСБ молекулы красителей ПК1 и ПК2 находятся преимущественно в форме мономеров. С ростом концентрации красителя наблюдается уширение длинноволновой полосы поглощения, рост поглощения на ее коротковолновом краю. Такое поведение характерно для трикарбоцианиновых красителей в водных средах и обусловлено агрегацией [7].

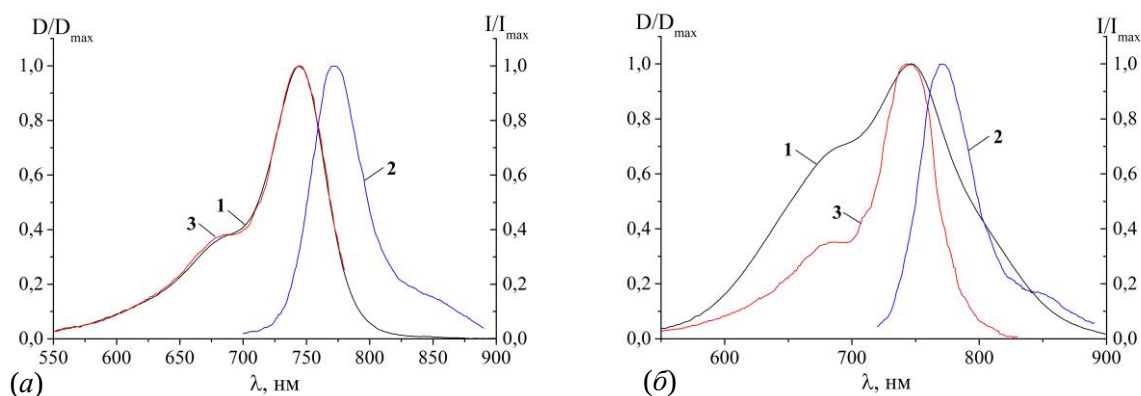


Рис. 2. а) Нормированные спектры поглощения (1), флуоресценции (2) и возбуждения флуоресценции при регистрации на длине волны 790 нм (3) ПК2 в ФСБ (концентрация красителя $\sim 10^{-6}$ М); б) Нормированные спектры поглощения (1), флуоресценции (2) и возбуждения флуоресценции при регистрации на длине волны 850 нм (3) комплекса ПК2 с белком NsLTP1 в ФСБ (концентрация красителя $\sim 10^{-6}$ М)

Совпадение спектрально-люминесцентных и фотофизических характеристик красителей ПК1 и ПК2 установлено также и в ДХЭ (таблица). При концентрации красителя $\sim 10^{-6}$ М максимум спектра поглощения располагается на длине волны 763 нм, спектра флуоресценции – 789 нм. Спектр флуоресценции не зависит от длины волны возбуждения. Кинетика затухания флуоресценции хорошо аппроксимируется одной экспонентой, длительность затухания составила 0,8 нс. Степень поляризации постоянна в пределах полосы испускания и составляет 8 %. Существенное отличие спектрально-люминесцентных характеристик красителей в ФСБ и ДХЭ позволяет контролировать локализацию его молекул в процессе синтеза. ДХЭ является малополярным растворителем, таким образом при переходе в малополярное окружение молекулы исследованных красителей происходит батохромный сдвиг поглощения и флуоресценции.

Фотофизические характеристики красителя в комплексе с липид-переносщим белком NsLTP1 достаточно близки к таковым для несвязанного красителя в ФСБ, вместе с тем имеются ряд существенных отличий (таблица, рис. 2). Максимум поглощения располагается на длине волны 747 нм (745 нм для свободного

красителя). При этом основная полоса поглощения красителя существенно уширена по сравнению со свободным красителем. Полуширина составляет 142 нм (56 нм для свободного красителя). При этом ее форма практически постоянна при разбавлении в диапазоне концентраций $\sim 10^{-7}$ – 10^{-5} М. Спектр флуоресценции не зависит от длины волны возбуждения, максимум флуоресценции располагается на длине волны 772 нм. Кинетика затухания флуоресценции хорошо аппроксимируется одной экспонентой, длительность затухания составила 0,5 нс (0,3 нс для свободного красителя). Несмотря на рост длительности затухания, наблюдается увеличение степени поляризации до 31 % (27 % для свободного красителя), что может быть связано со снижением влияния вращательной деполяризации вследствие увеличения объема молекулы в результате комплексобразования с белком NsLTP1 (9602 Да). Данное обстоятельство подтверждает синтез комплексов по представленной выше схеме.

Спектр возбуждения флуоресценции не зависит от длины волны регистрации. Его форма не повторяет спектр поглощения красителя в комплексе с белком, но в значительной степени совпадает по форме со спектром поглощения несвязанного красителя в ФСБ. Максимум спектра возбуждения флуоресценции располагается вблизи 745 нм, полуширина составляет 53 нм. По всей видимости уширение спектра поглощения красителя обусловлено агрегацией его молекул. Учитывая независимость формы спектра поглощения при разбавлении, можно утверждать, что в растворе имеется статичное распределение молекул красителя между мономерами и агрегатами. Это возможно при связывании красителя с белком NsLTP1 не только в мономерном, но и агрегированном состоянии.

Важно отметить, что близость максимумов полос поглощения и флуоресценции несвязанного красителя в ФСБ и в комплексе с белком NsLTP1 указывает на то, что его молекулы при связывании остаются в значительной степени локализованными в водном окружении.

Библиографические ссылки

1. Лазерная фотодинамическая терапия гнойных ран с фотосенсибилизатором хлоринового ряда / П. И. Толстых [и др.] // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2010. № 12. С. 17–22.
2. Выделение липидпереносящего белка Ns-LTP1 из семян чернушки посевной (*Nigella sativa*) / Ю. И. Ощепкова [и др.] // Биоорганическая химия. 2009. Т. 35, № 3. С. 344–349.
3. Влияние биологически активных веществ пептидной природы на течение экспериментального язвенного колита / Д. А. Аманликова [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. 2021. Т. 55. № 7. С. 25–29.
4. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics / A. A. Lugovski [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. 2016. Vol. 316. P. 31–36.
5. Cyanine dye labeling reagents—carboxymethylindocyanine succinimidyl esters / P. L. Southwick [et al.] // Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology. 1990. – Vol. 11, № 3. P. 418–430.
6. Cyanine-labeling reagents: sulfobenzindocyanine succinimidyl esters / S. R. Mujumdar [et al.] // Bioconjugate chemistry. 1996. Vol. 7, № 3. P. 356–362.
7. Управление Н*- и J-агрегацией индотрикарбоцианинового красителя в водных растворах неорганических солей / Н. В. Белько. [и др.] // Журн. Бел. гос. ун-та. Физика. 2020. № 2. С. 19–27.