

Анализ спектрально-кинетических свойств индотрикарбоцианиновых красителей

Д. С. Тарасов^{1, 2)}, М. П. Самцов¹⁾, А. Е. Радько¹⁾, Н. Н. Красноперов¹⁾,
К. А. Шевченко¹⁾, Е. С. Воропай²⁾

¹⁾ Институт прикладных физических проблем им. А. Н. Севченко Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь, e-mail: dmitrij-tarasov@list.ru

²⁾ Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Разработан программный модуль «ФлуоТау» для анализа кинетики затухания флуоресценции, полученной по методу время-коррелированного счета фотонов. Программный модуль позволяет аппроксимировать кинетику затухания флуоресценции моделью до 5 экспонент, имеет большую гибкость в настройке начальных и граничных условий аппроксимации. Приведены результаты исследования взаимодействия с белками сыворотки крови человека индотрикарбоцианиновых красителей.

Ключевые слова: метод время-коррелированного счета фотонов; анализ кинетики затухания флуоресценции; индотрикарбоцианиновые красители; белки сыворотки крови; комплексообразование.

Analysis of the spectral and kinetic properties of indotricarbocyanine dyes

D. S. Tarasau^{1, 2)}, M. P. Samtsov¹⁾, A. E. Radzko¹⁾, N. N. Krasnoperov¹⁾,
K. A. Shevchenko¹⁾, E. S. Voropay²⁾

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

²⁾ Belarusian State University, Minsk, Belarus

A “FluoTau” software module has been developed to analyze the kinetics of fluorescence decay obtained using the time-correlated photon counting method. The software module allows to approximate the fluorescence decay by 5 exponentials, and has great flexibility in setting the initial and boundary conditions of the approximation. The results of a study of the interaction of indotricarbocyanine dyes with human blood serum proteins are presented.

Keywords: time-correlated photon counting method; analysis of fluorescence decay kinetics; indotricarbocyanine dyes; serum proteins; complexation.

Введение

В последние два десятилетия с развитием аппаратуры для измерения временных характеристик свечения люминесценции применение люминесцентного анализа значительно расширилось. Эталонным методом для получения кинетики затухания сегодня стал метод время-коррелированного счета фотонов. Прежде всего это обусловлено появлением мегагерцовых импульсных лазерных источников с субнаносекундной и пикосекундной длительностью, а также развитием микроэлектронной базы. В лаборатории спектроскопии НИИПФП им. А. Н. Севченко выполняется разработка лазерного спектрофлуориметра для спектрально-кинетического люминесцентного анализа в экспериментальной физике и биологии. Измерения

кинетических характеристик флуоресценции предполагается реализовать по методу время-коррелированного счета фотонов. На данном этапе проекта разработаны прототипы/макеты отдельных узлов спектро-флуориметра: импульсных светодиодных и лазерных источников, время-амплитудного преобразователя (ВАП), схемы временной привязки (СВП), блока управления, однокантового и КМОП-многоканального фотоприемных устройств (ОФУ и МФУ). Параллельно ведется разработка программного обеспечения (ПО) для объединения отдельных узлов в единый программно-аппаратный комплекс, включая программный модуль «Флуо-Тау» для анализа кинетики затухания флуоресценции. На базе спектрофлуориметра Fluorolog (SPEX, США) создан макет для апробации отдельных узлов и тестирования ПО.

1. Программный модуль для анализа кинетики затухания флуоресценции

Известно, что для однокомпонентных молекулярных систем характерным является одноэкспоненциальный закон затухания флуоресценции. В случае нескольких невзаимодействующих флуоресцирующих центров закон затухания будет представлен суммой экспонент:

$$I(t) = \sum_{i=1}^N \alpha_i \cdot e^{\frac{-t}{\tau_i}}, \quad (1)$$

где N – число различных флуоресцирующих центров.

Поскольку длительности возбуждающего импульса и отклика регистрирующей фотосистемы нередко сопоставимы с временем затухания флуоресценции исследуемых объектов, то регистрируемый сигнал флуоресценции в момент времени t представляет собой свертку вида:

$$F(t) = \int_0^t G(t') I(t-t') dt', \quad (2)$$

где $G(t)$ – аппаратная функция, которая определяется как отклик системы регистрации на возбуждающий световой импульс.

Закон затухания флуоресценции исследуемых молекул можно установить путем решения задачи деконволюции, т. е. нахождения из интегрального уравнения (2), функцию $I(t)$. Для расчёта параметров α_i и τ_i полученных на основании анализа экспериментальных кривых предложено достаточно много различных методов [1]. В этом отношении наиболее надежно себя показал метод наименьших квадратов. В его основе минимизация функционала χ^2 , который представляет собой взвешенное среднеквадратичное отклонение рассчитанного закона затухания флуоресценции $F_{\text{расч}}(t_i)$ от зарегистрированного $F_{\text{эксп}}(t_i)$:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N w_i [F_{\text{эксп}}(t_i) - F_{\text{расч}}(t_i)], \quad (3)$$

$$w(i) = \frac{1/F_{\text{эксп}}(t_i)}{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^N \left(1/F_{\text{эксп}}(t_i) \right)}, \quad (4)$$

Данный подход используется в разработанном программном модуле «ФлуоТау». Поиск параметров экспонент функции реализован в виде итерационного алгоритма. Принимая во внимание нелинейную зависимость функционала χ^2 от t_i , для ускорения вычислений использован метод Левенберга-Марквардта для нелинейного метода наименьших квадратов. В качестве варьируемых параметров в модель оптимизации также включен временной сдвиг между аппаратной функцией и кинетикой затухания флуоресценции образца. Программный модуль выполнен в виде оконного приложения для системы Windows. В программном модуле «ФлуоТау» реализован также расширенный режим аппроксимации. В данном режиме имеется возможность регулировать область поиска времени затухания флуоресценции для одного или нескольких центров (в том числе его фиксации).

2. Применение программного модуля для анализа кинетики затухания флуоресценции в научно-исследовательской деятельности

В процессе разработки программного модуля «ФлуоТау» корректность работы проверена на сгенерированных модельных данных в виде свертки известной аппаратной функции и теоретического закона затухания, представленного суммой экспонент с известными временами затухания и весами (амплитудами). В полученные кинетики дополнительно добавлялась шумовая компонента с разным уровнем шума. В результате анализа с помощью программного модуля «ФлуоТау» с использованием моделей аппроксимации от 1 до 5 экспонент наилучший результат аппроксимации достигался при совпадении количества экспонент в моделях генерации исходных данных и их аппроксимации. При этом расхожимость времен затухания в моделях не превышала 3 %, что подтверждает корректность алгоритма.

С использованием макета на базе спектрофлуориметра Fluorolog проведена апробация отдельных узлов лазерного спектрофлуориметра. Зарегистрированы кинетики затухания различных образцов с известными в литературе временами затухания флуоресценции (растворы красителей родамин 6Ж и НТС в этаноле). В результате аппроксимации полученных кинетик с помощью стандартного режима программного модуля «ФлуоТау» получены времена затухания флуоресценции, которые в пределах погрешности совпадают с литературными данными: родамин 6Ж в этаноле – 4,0 нс, НТС в этаноле – 1,4 нс.

Собранная установка использовалась при исследовании фотофизических характеристик фотосенсибилизаторов на основе индотрикарбонацианиновых красителей при их взаимодействии с компонентами сыворотки крови. Исследования проводились для красителей представленных на рис. 1. Краситель ПК1 по многим параметрам перспективен для использования в качестве фотосенсибилизатора для ФДТ [2], а также два близких по структуре красителя – ПК2 и ПК3. У ПК2 по сравнению с ПК1 отсутствуют полиэтиленгликоли на концевых группах, а у ПК3 в полиметиновой цепи нет хлорзамещенного ортофениленового мостика. Исследования взаимодействия красителей с белками сыворотки крови (ЧСК) проводились в 5 % растворе ЧСК в натрий-калиевом фосфатном буфере Дюльбекко (0,14 моль/л) с рН = 7,4 (ФСБ), что соответствует концентрации альбумина ~ 30 мкМ. Концентрация

красителей в исследованных образцах составляла 10 мкМ (отношение краситель к белку 1:3). Образцы окрашенных красителями растворов ЧСК готовились с использованием стоковых растворов в ФСБ и инкубировались при 37 °С в течение 120 минут. Краситель ПК2 обладает низкой растворимостью в воде, в связи с чем стоковый раствор для него готовился с 5 % содержанием этанола.

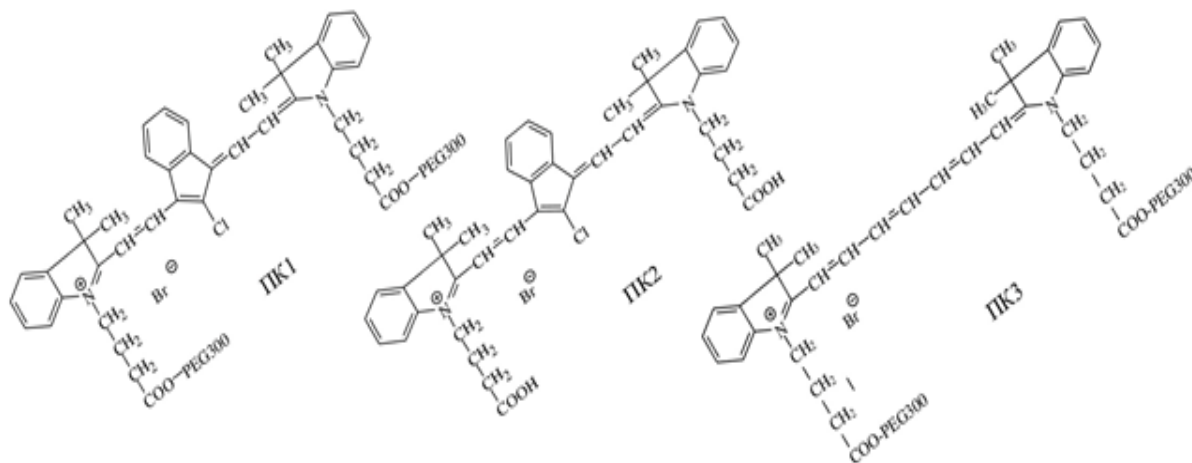


Рис. 1. Структура исследованных индотрикарбощианиновых красителей

Определены фотофизические характеристики красителей в ФСБ и растворе ЧСК (таблица, рис. 2). На спектральные характеристики красителей в ФСБ оказывает заметное влияние агрегация молекул в водном растворе. Краситель ПК2 без ПЭГ является гидрофобным и в воде агрегирует с образованием Н- и J-ассоциатов. Краситель ПК1 гидрофильный, его растворы в ФСБ представляют собой равновесную смесь мономеров и димеров Н-типа. При одинаковой концентрации красителей агрегация красителей увеличивается в следующем ряду ПК3→ПК1→ПК2, что проявляется в росте полуширины длинноволновой полосы поглощения. Вместе с тем флуоресценция исследованных красителей в ФСБ является однокомпонентной: форма не зависит от длины волны возбуждения при сканировании в пределах длинноволновой полосы поглощения, кинетика затухания аппроксимируется одной экспонентой. Спектр флуоресценции красителей при возбуждении в пределах основной полосы поглощения приблизительно зеркально-симметричен спектру поглощения их мономеров.

Спектральные параметры растворов ПК1 и ПК2 в растворах ЧСК сильно отличаются от таковых в ФСБ: наблюдается смещение максимумов поглощения и флуоресценции в длинноволновую область, уменьшается поглощение в полосе агрегатов, возрастают время жизни (с 0,3–0,4 нс до 1,4 нс) и степень поляризации (с 0,28–0,31 до 0,39–0,42) флуоресценции (таблица). Изменение спектральных характеристик молекул красителя в присутствии белков указывает на образование комплекса с ними. Батохромное смещение положения максимума спектров поглощения и флуоресценции для данных красителей обычно наблюдается при переходе от полярных растворителей к малополярным, что достигается при локализации вблизи белковых молекул.

Фотофизические параметры красителей (10 мкМ) в ФСБ и 5 % растворе сыворотки крови человека

		λ_{abs}^{max} , нм	$\Delta\lambda_{abs}^{max}$, нм	λ_f^{max} , нм	$\Delta\lambda_f^{max}$, нм	$\varepsilon \cdot 10^5, M^{-1}cm^{-1}$	τ (20 °C), нс	P (20 °C)
ФСБ	ПК1	707	134	738	64	-	0,4±0,1	0,28±0,02
	ПК2	706	170	737	77	-	0,3±0,1	0,31±0,02
	ПК3	746	78	772	49	-	0,3±0,1	0,30±0,02
ЧСК	ПК1	729	64	757,0	43	1,88	1,4±0,1	0,42±0,02
	ПК2	731	65	756,5	46	1,96	1,4±0,1	0,39±0,02
	ПК3	748	68	776,0	55	1,89	0,4±0,1	0,40±0,02

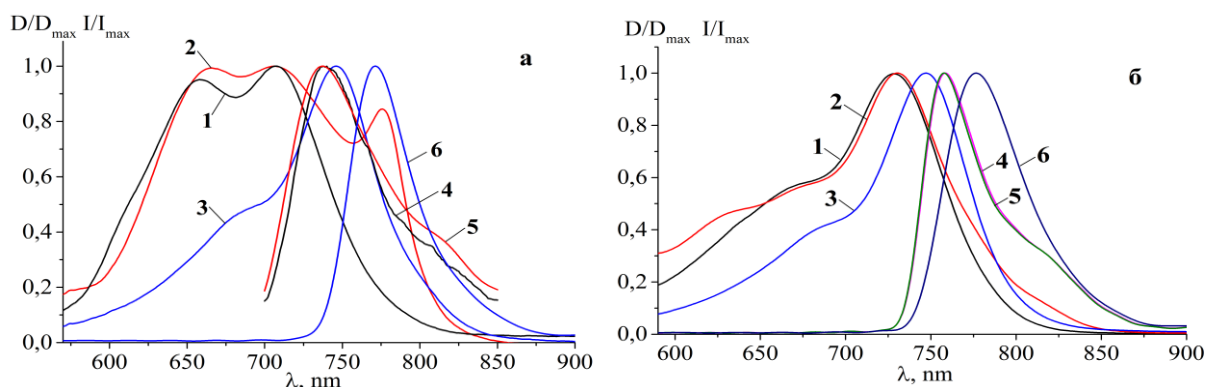


Рис. 3. Спектры поглощения (1–3) и флуоресценции при возбуждении на 684 нм (4–6) индотрикарбоцианиновых красителей в ФСБ (а), 5 % растворе ЧСК (б) при концентрации 10 мкМ

Не обнаружено значительного влияния компонент сыворотки крови на спектрально-люминесцентные свойства ПК3, у которого отсутствует хлорзамещенный ортофениленовый мостик в полиметиновой цепи сопряжения. Существенное отличие зафиксировано только по параметру степени поляризации флуоресценции, значение которой в растворах ЧСК возрастает также как для красителей ПК1 и ПК2. Такое возможно при условии, что происходит связывание с белками молекулы красителя ПК3, однако хромофор красителя остается локализован в водном окружении. Разумно предполагать, что связывание ПК3 с белками происходит с участием цепочек ПЭГ.

Таким образом, разработан программный модуль «ФлуоТау» для анализа кинетики затухания флуоресценции, который позволяет аппроксимировать кинетику затухания флуоресценции моделью до 5 экспонент, имеет большую гибкость в настройке начальных и граничных условий аппроксимации. Программный модуль использовался при исследовании фотофизических характеристик индотрикарбоцианиновых красителей при взаимодействии с компонентами сыворотки крови.

Библиографические ссылки

1. Deconvolution of fluorescence decay curves. A critical comparison of techniques / D.V.O. O'Connor [et al.] // J. Phys. Chem. 1979. Vol. 83. P. 1333
2. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics / A. A. Lugovskii [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. 2016. Vol. 316. P. 31–36.