

Взаимодействие бифлуорофора 6-карбоксифлуоресцеина с циклодекстринами

А. С. Пилипович¹⁾, Ф. Фань²⁾, И. И. Лысенко²⁾, В. А. Поведайло¹⁾,
С. А. Тихомиров¹⁾, В. В. Шманай²⁾

¹⁾ Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: poved@ifanbel.bas-net.by

²⁾ Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Методами спектрофотометрии и флуориметрии исследовано образование комплексов включения бифлуорофора (6-FAM)₂ с α-, β- и γ-циклодекстринами в фосфатном буферном растворе (рН 9.0). Определены константы ассоциации и изменения энергии Гиббса для стехиометрии 1:1. Наибольшая константа ассоциации наблюдается для комплекса (6-FAM)₂ с β-циклодекстрином, что объясняется оптимальным пространственным соответствием размеров гостевой молекулы и полости хозяина. Показано влияние комплекса включения (6-FAM)₂/β-ЦД на флуоресцентный отклик системы в присутствии белка.

Ключевые слова: супрамолекулярная химия; циклодекстрины; бифлуорофор; комплексы включения; константа ассоциации; флуоресценция, белок.

Interaction of 6-Carboxyfluorescein Bifluorophore with Cyclodextrins

H. S. Pilipovich¹⁾, F. Fan²⁾, I. I. Lisenko²⁾, V. A. Povedailo¹⁾, S. A. Tikhomirov¹⁾,
V. V. Shmanai²⁾

B. I. Stepanov Institute of Physics of the NAS of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: poved@ifanbel.bas-net.by

Institute of Physical Organic Chemistry of the NAS of Belarus, Minsk, Belarus

The formation of inclusion complexes of the (6-FAM)₂ bifluorophore with α-, β-, and γ-cyclodextrins in a phosphate buffer solution (pH 9.0) was studied by spectrophotometry and fluorimetry. The association constants and Gibbs energy changes for 1:1 stoichiometry was determined. The highest association constant was observed for the complex with β-cyclodextrin, which is explained by the optimal spatial match between the guest molecule and the host's cavity. The effect of the (6-FAM)₂/β-CD inclusion complex on the fluorescent response of the system in the presence of protein is shown.

Keywords: supramolecular chemistry; cyclodextrins; bifluorophore; inclusion complexes; association constant; fluorescence, protein.

Введение

Супрамолекулярная химия рассматривает все виды нековалентных межмолекулярных взаимодействий в приложении к химическим, физическим и биологическим аспектам изучения сложных систем, лежащие в основе образования комплексов «хозяин-гость». Среди макроциклических соединений, выполняющих функцию хозяев, циклодекстрины (ЦД) являются одними из наиболее широко используемых в исследованиях. Гостевые молекулы представляют собой небольшие молекулы или ионы, чаще всего органические соединения, которые при взаимодействии с молекулами хозяевами изменяют свои спектральные характеристики,

биодоступность и стабильность. Способность ЦД инкапсулировать флуоресцентные красители делает их перспективными для применения в сенсорике, доставке лекарств и нанотехнологиях. В настоящей работе проведены исследования по взаимодействию комплексов включения бифлуорофора 6-карбоксифлуоресцеина (6-FAM)₂ в буферном растворе pH 9.0 с α -, β - и γ -циклодекстринами. Определены константы ассоциации (K_{acc}) циклодекстринов с (6-FAM)₂, изучено свойство комплекса в качестве флуоресцентного сенсора при взаимодействии с бычьим сывороточным альбумином (БСА). Для понимания природы взаимодействия ЦД с гостевыми молекулами использовались спектрометрические методы электронного поглощения из основного состояния, стационарной флуоресценции флуоресценции с временным разрешением.

1. Объекты и методы исследований

Структура описанного ранее азидного производного бифлуорофора (6-FAM)₂ [1] представлена на рис. 1.

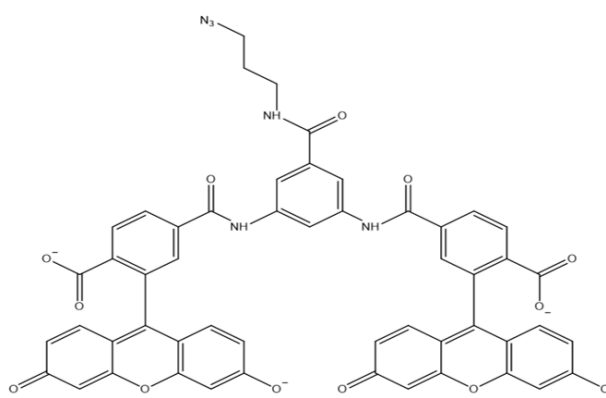


Рис. 1. Структурная формула мета-(6-FAM)₂

При выполнении исследований в фосфатный буферный раствор (pH 9.0) с бифлуорофором добавляли α -, β - или γ -ЦД. Концентрация бифлуорофора определялась по спектрам поглощения в растворе при комнатной температуре с учетом коэффициента экстинкции в максимуме первой полосы $\epsilon_{max} = 140000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [1]. В качестве растворителя использовали воду milli Q. Спектры флуоресценции, а также времена жизни возбужденных состояний комплексов

бифлуорофор/ЦД зарегистрированы при возбуждении излучением в максимумы полос поглощения $\lambda \sim 495 \text{ nm}$ и регистрации с $\lambda \sim 520 \text{ nm}$ на спектрометрическом комплексе Horiba Scientific Fluorolog-3, спектры поглощения – на спектрофотометре Shimadzu UV-3600 Plus. При исследовании использовали кварцевую кювету $1 \times 0.5 \text{ cm}$.

2. Результаты и обсуждение

При добавлении β -ЦД к раствору (6-FAM)₂ происходит батохромный сдвиг и рост интенсивности полос флуоресценции и поглощения. На рис. 2 представлены спектры люминесценции растворов (6-FAM)₂ при добавлении β -ЦД. Концентрация бифлуорофора при измерениях флуоресценции была постоянной и составляла $7.1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, концентрация β -ЦД варьировалась в пределах $0 \div 0.016 \text{ M}$. Максимум интенсивности флуоресценции (6-FAM)₂/ β -ЦД в буферном растворе со значением pH 9.0 незначительно смещается в длинноволновую область от 516 нм до 520 нм при увеличении концентрации β -ЦД. В то же время интенсивность флуоресценции увеличивается практически вдвое (рис. 3 на вставке), при этом форма спектров практически не изменяется.

Зависимость спектров поглощения (6-FAM)₂ от концентрации β -ЦД представлена на рис. 3. В данном эксперименте концентрация бифлуорофора составляла $6.4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. Как видно на рисунке, максимум спектра при отсутствии β -ЦД соответствует длине волны 496 нм. При добавлении в раствор β -ЦД с максимальной

концентрацией 0.016 М, интенсивность поглощения возрастает слабее по сравнению с возрастанием флуоресценции, наблюдается увеличение оптической плотности в 1.17 раз, что отражено на вставке рис. 3. С увеличением концентрации β -циклодекстрина наблюдается незначительное батохромное смещение максимумов спектров поглощения, аналогично спектрам флуоресценции.

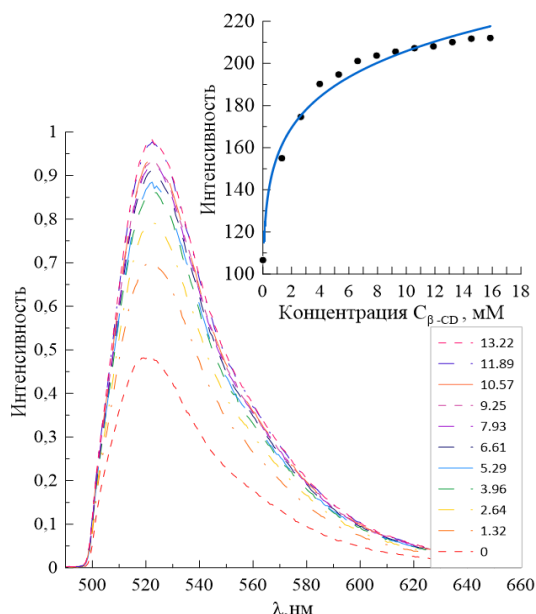


Рис. 2. Спектры флуоресценции смеси $(6\text{-FAM})_2$ и его комплексов с β -ЦД в буферном растворе pH 9.0 при различных концентрациях β -ЦД. На вставке: Зависимость максимумов спектров флуоресценции смеси от концентрации β -ЦД

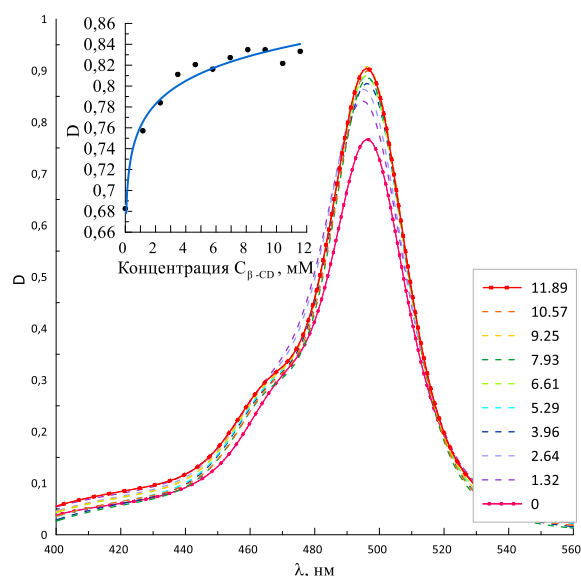


Рис. 3. Спектры поглощения системы $6\text{-FAM}_2/\beta\text{-ЦД}$. На вставке: Зависимость оптической плотности от концентрации β -ЦД

Чтобы получить больше информации о системе взаимодействий комплексов бифлуорофор/циклодекстрин, проведены аналогичные флуоресцентные измерения в буферном растворе (pH 9.0) бифлуорофора $(6\text{-FAM})_2$ в присутствии различных концентраций γ -ЦД. Смещение максимума полосы флуоресценции в низкочастотную область раствора в насыщенном состоянии с γ -ЦД относительно максимума в отсутствии ЦД составляет 2 нм, форма полосы также практически не изменяется. Максимум интенсивности флуоресценции раствора в насыщении с γ -ЦД возрастает почти в два раза.

Исследования спектров флуоресценции $(6\text{-FAM})_2$ в буферном растворе при добавлении α -ЦД (pH 9.0) обнаруживают 30 % рост максимума интенсивности флуоресценции без существенных смещений по частоте и изменений формы полос.

Аналогичные исследования по регистрации спектров поглощения растворов $(6\text{-FAM})_2/\alpha$ - и $(6\text{-FAM})_2/\gamma$ -ЦД приводят к изменению максимумов полос на уровне 8 %, что создает большую погрешность в последующих расчетах.

В работе получены зависимости времени жизни (τ) возбужденного состояния бифлуорофора $(6\text{-FAM})_2$ от концентрации α -, β - и γ -ЦД (рис. 4). Кинетика затухания флуоресценции изучалась в диапазоне концентраций циклодекстринов (α -, β - или γ -ЦД) от 0 до ~ 0.016 М, что соответствует условиям насыщения. Полученные кривые были аппроксимированы в рамках одно- и двухэкспоненциальных моделей. В

первом случае наблюдается непрерывный рост значений времени жизни возбужденного состояния бифлуорофора с увеличением концентрации α -, β - и γ -циклодекстринов. Более адекватное описание экспериментальных данных обеспечила двухэкспоненциальная модель. Анализ полученных кинетических параметров выявил долгоживущую (1–3) и короткоживущую (1'–3') компоненты, что свидетельствует о наличии как минимум двух различных процессов деактивации возбужденного состояния или типов комплексов включения

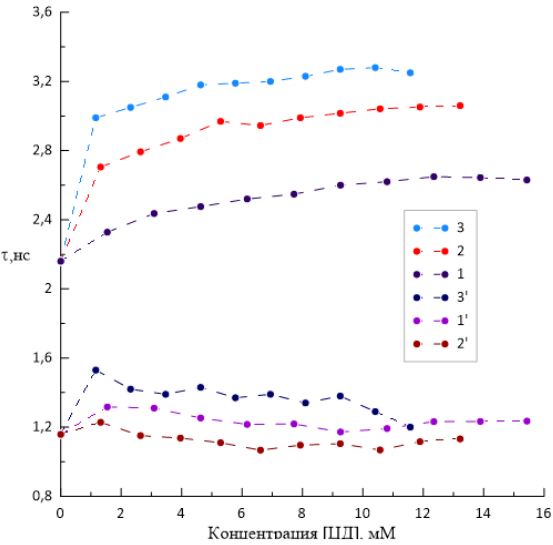


Рис. 4. Зависимость длительной (1–3) и короткоживущей (1'–3') компонент времени жизни флуоресценции 6-FAM₂ от концентрации α -, β - и γ -ЦД, соответственно.

Таим образом, изменение интенсивностей в спектрах флуоресценции и поглощения, положения их максимумов, зависимости времени жизни возбужденных состояний указывают, что бифлуорофоры связываются с α -, β - и γ -циклодекстринами в условиях эксперимента.

Для получения численных значений констант ассоциации (K_{acc}) бифлуорофора (6-FAM)₂ с α -, β - и γ -ЦД, мы использовали уравнение Бенези-Хилдебранда (Б-Х). В этой связи регистрировалась серия спектров флуоресценции/поглощения растворов при постоянных концентрациях бифлуорофора и различных концентрациях [ЦД] в фосфатном буферном растворе со значением pH 9.0 и постоянной температуре 25 °С. Уравнение Б-Х имеет вид идентичный для спектров флуоресценции и поглощения:

$$\frac{1}{(I-I_0)} = \frac{1}{(I_{max}-I_0)} + \frac{1}{[(I_{max}-I_0) \cdot K_{acc} [ЦД]]} \tag{1}$$

где I_0 – интенсивность флуоресценции/поглощения раствора при отсутствии циклодекстрина, I_1 – интенсивность флуоресценции/поглощения смеси свободных молекул и комплексов гость-хозяин, I_{max} – интенсивность флуоресценции / поглощения раствора при полном насыщении, K_{acc} – константа ассоциации 1:1 комплекса.

Константы ассоциации (K_{acc}) и энергии Гиббса (ΔG) комплексов (6-FAM)₂/ЦД

Комплекс	K_{acc} , флуоресценция, М ⁻¹	K_{acc} , поглощение, М ⁻¹	ΔG , кДж·моль ⁻¹
6-FAM ₂ / α -ЦД	269	-	-13,9
6-FAM ₂ / β -ЦД	588	446	-15,8
6-FAM ₂ / γ -ЦД	517	-	-15,5

Примечания. ΔG рассчитано по данным флуоресценции.

В таблице приведены значения констант ассоциации (K_{acc}) и рассчитанные величины энергии Гиббса комплекса (6-FAM)₂/ α -, β - и γ -ЦД при $T = 298$ К. Величины K_{acc} были получены из наклона прямых графических зависимостей $1/(I-I_0)$ от $1/[ЦД]$. Наибольшее значение K_{acc} наблюдается для комплексов (6-FAM)₂/ β -ЦД при

регистрации по спектрам флуоресценции 588 М^{-1} , а по спектрам поглощения 446 М^{-1} . Для комплексов $(6\text{-FAM})_2/\alpha\text{-ЦД}$ и $(6\text{-FAM})_2/\gamma\text{-ЦД}$ получены более низкие значения $K_{\text{асс}}$ по спектрам флуоресценции 269 и 517 М^{-1} , соответственно. Различия во взаимодействии $(6\text{-FAM})_2$ с α -, β - и γ -ЦД можно интерпретировать путем сравнения относительных размеров молекул ЦД и размеров фрагментов красителя. Размер большего диаметра внутренней полости тороидальной формы α -, β - и γ -ЦД составляет ~ 5.2 , 6.4 и $8.3 \text{ \AA}$ соответственно [2], тогда как ширина ксантенового фрагмента, согласно нашим квантово-химическим расчетам, составляет около $5.7 \text{ \AA}$. Таким образом, инкапсуляция исследуемых бифлуорофоров в α -ЦД затруднена и свидетельствует об частичном взаимодействии ксантенового фрагмента с циклодекстрином. Расположение хромофора внутри γ -ЦД относительно свободно, что снижает величину межмолекулярных нековалентных взаимодействий. Оптимальным вариантом инкапсуляции является комплекс $(6\text{-FAM})_2/\beta\text{-ЦД}$. Таким образом, результаты измерений показывают, что совместимость размеров полостей хозяин-гость в значительной степени определяют силу взаимодействия в системе.

3. Конъюгат комплекса $(6\text{-FAM})_2/\beta\text{-ЦД}$ с белком BSA

В работе дополнительно проведены измерения влияния β -ЦД на интенсивность флуоресценции $(6\text{-FAM})_2$ ковалентно связанного с белком BSA (бычьим сывороточным альбумином) в буферном растворе pH 9.0. Выполнены два эксперимента по установлению очередности добавления реагентов. В первом случае предварительно смешали $(6\text{-FAM})_2$ с β -ЦД с последующим присоединением белка методом клик-реакции. Концентрация конъюгата составляла $7.1 \cdot 10^{-7} \text{ М}$. В этом случае интенсивность флуоресценции возрастала в 1.52 раза по сравнению с отсутствием циклодекстрина. Данный эффект можно объяснить изоляцией циклодекстрином переноса энергии от электронно возбужденного бифлуорофора комплекса $(6\text{-FAM})_2/\beta\text{-ЦД}$ на, вероятнее всего триптофан.

Во втором случае сначала ковалентно присоединяли бифлуорофор к белку методом клик-реакции с последующим добавлением β -ЦД. При регистрации флуоресценции с различной концентрацией циклодекстрина в растворе (0, 0.074, 0.148, 0.222, 0.296 мМ) наблюдается снижение интенсивности флуоресценции до 30 %. Тушение излучения может быть связано с конкурирующим связыванием β -ЦД с гидрофобными участками белка, что приводит к снижению концентрации комплексов $(6\text{-FAM})_2/\beta\text{-ЦД}$, а также тушением флуоресценции бифлуорофора аминокислотами (прежде всего триптофаном) [3].

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Ф24-006) и Вьетнамской Академией наук и технологий (QTVY01.03/24-25).

Библиографические ссылки

1. Fluorescent Properties of Carboxyfluorescein Bifluorophores / V. A. Povedailo [et al.] // J. of Fluoresc. 2020. Vol. 30, iss. 3. P. 629–635.
2. Cyclodextrins: Structural, Chemical, and Physical Properties, and Applications / B. G. Poulson [et al.] // Polysaccharides. 2022. Vol. 3, iss. 1. P. 1–31.
3. Фотофизические особенности протолитических равновесий бифлуорофоров флуоресцеина / Фань Фань [и др.] // Журн. прикл. спектр. 2024. Т. 91, № 5. С. 723–732.