

Сверхбыстрая дезактивация возбужденного состояния Тиофлавина Т в маловязких растворителях

С.А. Тихомиров¹, В.Л. Дубовский¹, В.А. Кузьмицкий¹, В.И. Степуро², А.А. Маскевич²

¹Институт физики имени Б.И.Степанова, Минск, Беларусь

²Гродненский государственный университет им. Янки Купалы, Гродно, Беларусь. E-mail: stepuro@grsu.by

Резюме

С использованием методов фемтосекундной кинетической абсорбционной спектроскопии измерена кинетика дезактивации возбужденного состояния молекулы тиофлавина Т (ThT) в маловязких растворителях. Показано, что флуоресценция происходит из неравновесного LE-состояния. В возбужденном состоянии ThT происходит внутримолекулярный перенос заряда между ароматическими фрагментами молекулы, разделенными одинарной связью, сопровождаемый торсионной релаксацией фрагментов молекулы. В результате данных процессов формируется промежуточное короткоживущее TICT-состояние, которое не обладает флуоресценцией.

Введение

Упорядоченная агрегация белков с образованием амилоидных фибрилл и накопление подобного рода структур в различных тканях и органах сопутствует протеканию ряда тяжких заболеваний, таких как нейродегенеративные заболевания Альцгеймера и Паркинсона, катаркта, злокачественная миелома, прионные болезни и др.

Для детектирования образования амилоидных фибрилл широко используется тиофлавин Т (ThT), образующий интенсивно флуоресцирующий комплекс с амилоидными фибриллами [1]. Однако, несмотря на широкое применение этого зонда, механизм увеличения квантового выхода флуоресценции при встраивании ThT в фибриллы до сих пор не выяснен. Проведенные ранее исследования показали, что квантовый выход флуоресценции ThT зависит главным образом от вязкости, нежели полярности и протонодонорных свойств растворителей [2,3].

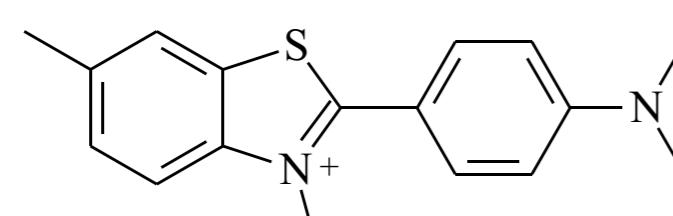


Рис.1. Структура
Тиофлавина Т

В настоящей работе с использованием методов фемтосекундной кинетической спектроскопии исследована динамика нестационарных спектров поглощения молекул ThT в маловязких растворителях (вода, спирты).

Методика измерений

Для измерения нестационарных спектров поглощения использовался фемтосекундный абсорбционный спектрометр [4], в основе которого лежит оригинальный генератор фемтосекундных импульсов на Ti: Sp, синхронно накачиваемый импульсным лазером на Nd: YAG с пассивной синхронизацией мод и отрицательной обратной связью. Импульсы основной частоты ($\lambda_{\text{max}} = 780$ нм, длительность на полуысоте порядка 150 фс) получаемые на выходе из усилителя делились на две части в отношении 1:4. Более интенсивный пучок использовался для генерации с использованием кристалла ВВО толщиной 1.0 мм второй гармоники основной частоты титан-сапфирового лазера, которая служила в качестве возбуждающего излучения ($\lambda_{\text{возб}} = 390$ нм). Более слабый пучок после прохождения регулируемой линии задержки используется для генерации фемтосекундного суперконтинуума, служащего зондирующим излучением.

Результаты и обсуждение

Дифференциальные спектры наведенного поглощения ThT в водном растворе приведены на Рис.2. Кроме полосы просветления (область 410-425 нм, отрицательный сигнал), связанной с обеднением населения основного состояния молекулы ThT (в коротковолновой области спектр обрезается за счет границы чувствительности фотоприемника), в спектре наблюдается появление новых полос поглощения в областях при $\lambda_{\text{ макс}} = 465$ и 720 нм, а также интенсивной полосы усиления (отрицательный сигнал с максимумом при 485-500 нм), соответствующей спектру флуоресценции исследуемого соединения.

Длительность затухания флуоресценции из локально-возбужденного LE-состояния для ThT в воде, оцененная из кинетики оптической плотности в полосе усиления, составляет ~1-2 пс (Рис. 3), что хорошо коррелирует с характерным временем ослабления полосы при 720 нм и нарастания поглощения в районе 465 нм. Следовательно, можно принять, что после фотовозбуждения молекулы ThT в результате франк-кондоновского перехода в LE-состояние, которое характеризуется поглощением при 720 нм, происходит быстрый переход из флуоресцентного LE-состояния в некоторое промежуточное нефлуоресцирующее состояние, поглащающее при 465 нм. Учитывая высокую скорость данного процесса, мы полагаем, что в молекуле ThT происходит внутримолекулярный перенос заряда с образованием нефлуоресцирующего TICT-состояния. Данное предположение согласуется с результатами квантово-химических расчетов основного и возбужденного состояний молекулы ThT [5].

Обнаружено, что время жизни флуоресцентного LE-состояния ThT чрезвычайно сильно зависит от вязкости растворителя. Так, для воды оно составляет ~1-2 пс (Рис. 3,4), для бутанола - 20 пс (Рис. 5), а в случае 99% глицерина - 500 пс. Это свидетельствует о том, что процесс переноса заряда сопряжен со значительным изменением структуры молекулы в возбужденном состоянии (например, взаимным поворотом фрагментов молекулы, разделенных одинарной связью), и вязкость (либо жесткость) микроокружения зонда определяет скорость перехода между LE и TICT состояниями.

Скорости процессов переноса заряда и релаксации растворителя для ThT являются сопоставимыми по величине, что приводит к нестационарному характеру флуоресценции зонда. Так, характерное время смещения максимума спектра флуо-

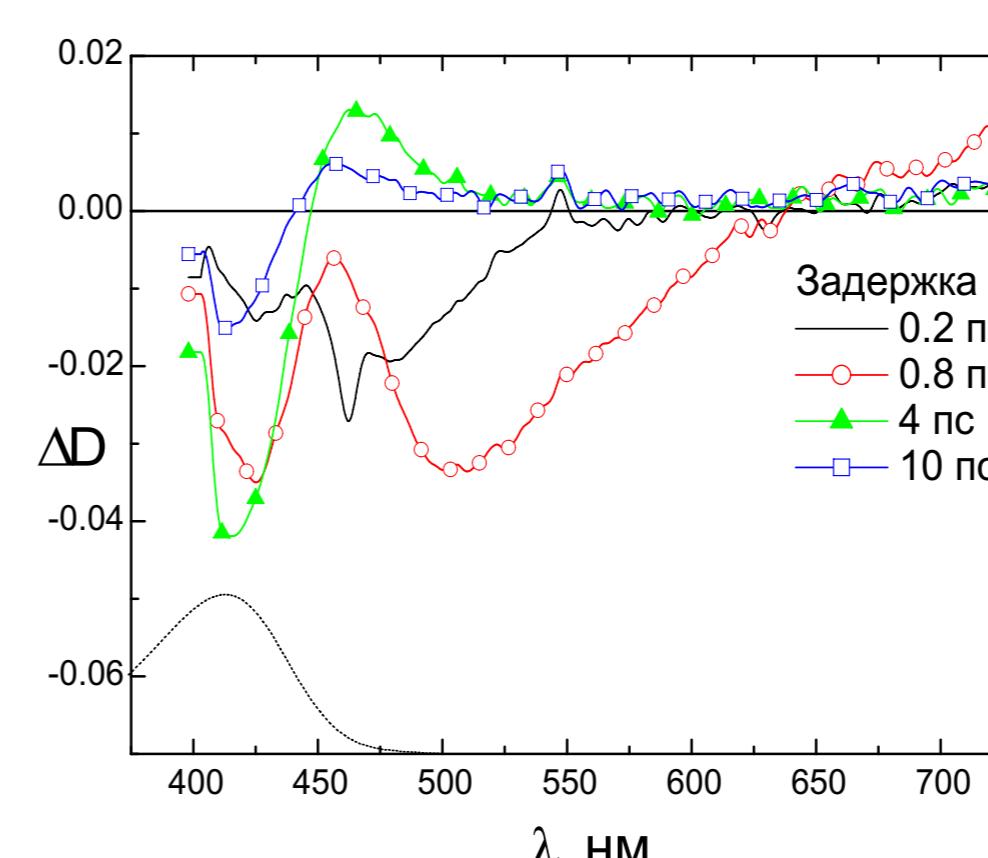


Рис.2. Спектры наведенного поглощения раствора ThT в воде, зарегистрированные с различной временной задержкой после возбуждения ($\lambda_{\text{возб}} = 390$ нм. $T = 293$ К). Штриховой линией указан контур стационарного спектра поглощения.

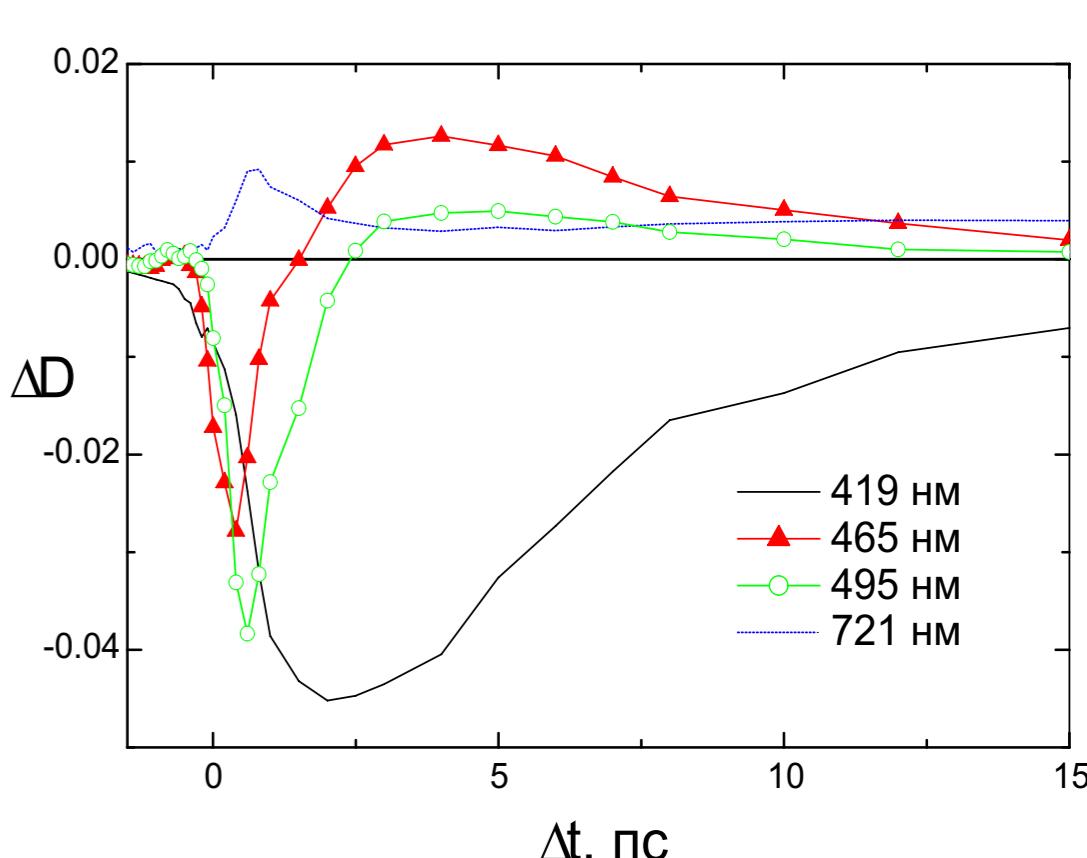


Рис.3. Кинетика изменения наведенного поглощения водного раствора ThT при различных длинах волн регистрации. $\lambda_{\text{возб}} = 390$ нм. $T = 293$ К.

ресценции в длинноволновую область, обусловленного релаксацией растворителя, составляет 5-10 пс для раствора ThT в бутаноле, тогда как время жизни LE-состояния равно ~20 пс (Рис. 5, 6).

Дезактивация TICT-состояния, т.е. уменьшение интенсивности полосы поглощения при 465 нм (Рис. 3) в маловязких растворителях также является довольно быстрым процессом, скорость которого зависит от вязкости растворителя. В случае водного раствора время жизни TICT-состояния составляет ~5 пс (Рис.4), а в более вязком бутаноле увеличивается до 150-200 пс (Рис. 5).

На основании полученных экспериментальных результатов и проведенных ранее квантово-химических расчетов [5] предложена модель фотофизических процессов в молекуле ThT (Рис. 6). Предполагается, что в возбужденном состоянии ThT происходит внутримолекулярный перенос заряда между ароматическими фрагментами молекулы, разделенными одинарной связью. Перенос сопровождается торсионной релаксацией фрагментов молекулы. В результате данных процессов формируется промежуточное короткоживущее TICT-состояние, которое не обладает флуоресценцией. Флуоресценция происходит из неравновесного локально-возбужденного LE-состояния. Переход из LE- в TICT-состояние, контролируемый вязкостью микроокружения молекулы ThT, является по нашему мнению причиной низкого квантового выхода флуоресценции в маловязких растворителях.

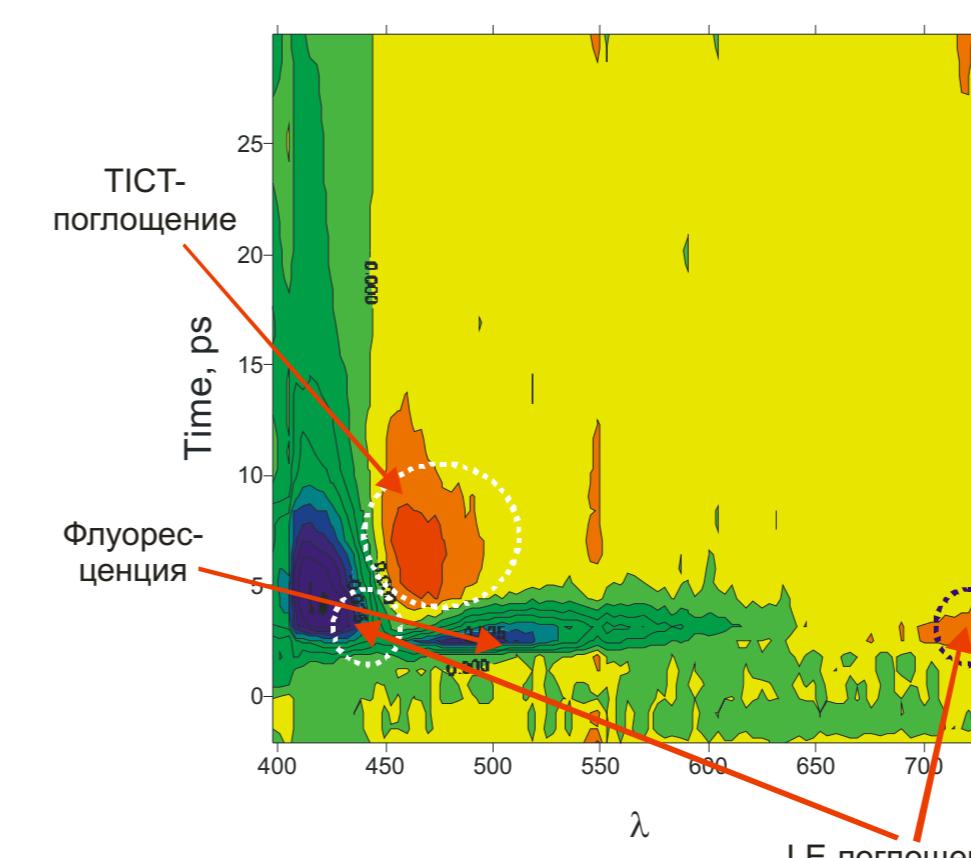


Рис.4. Диаграмма изменения наведенного спектра поглощения во времени для раствора ThT в воде

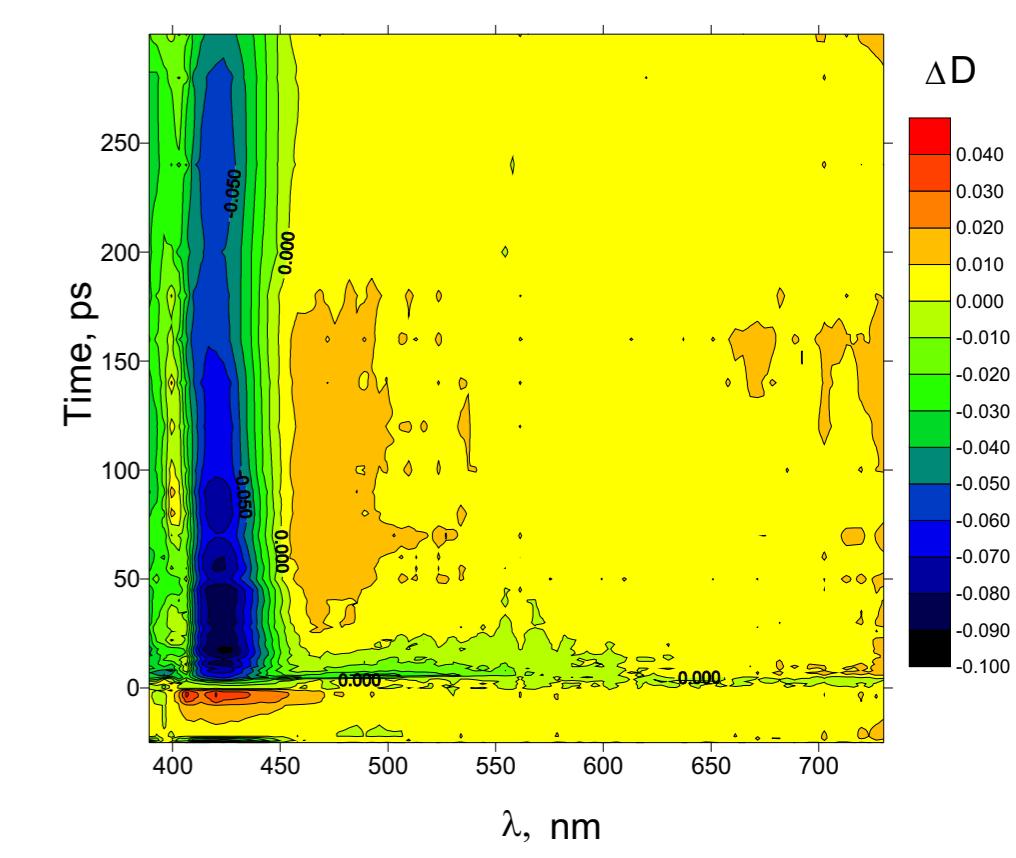
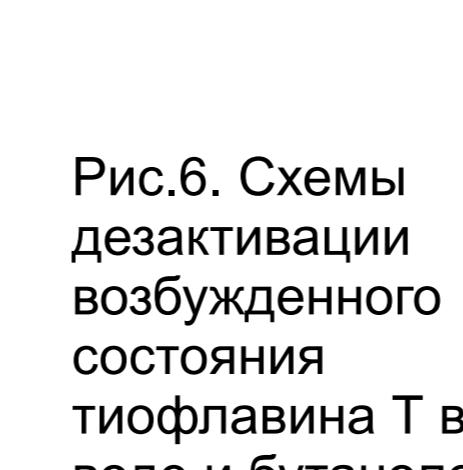


Рис.5. Диаграмма изменения наведенного спектра поглощения во времени для раствора ThT в бутаноле



Литература

- [1] LeVine H. III // Protein Science.- 1993.- V. 2.- P. 404; [2] Воропай Е.С. и др. // ЖПС.- 2003.- Т.70.- С. 767; [3] Maskevich A.A. et al. // J. Proteome Res.- 2007.- V.6.- P. 1392; [4] Блохин А.П. и др. // ЖПС.- 2003.- Т.70.- С. 66-70; [5] Stsiapura V.I. et al. // J. Phys. Chem. A.- 2007.- V. 111.- P.4829.

Благодарности

Работа была выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (гранты Ф06-351, X08P-217).