

СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БЕНЗТИАЗОЛОВОГО КРАСИТЕЛЯ, МОДИФИЦИРОВАННОГО ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ

А. А. Маскевич

УДК 535.371:(547.681+547.458.68)

<https://doi.org/10.47612/0514-7506-2021-88-6-852-857>

Гродненский государственный университет имени Янки Купалы,
Гродно, Беларусь; e-mail: amaskevich@grsu.by

(Поступила 29 октября 2021)

Исследованы спектральные свойства нового бензтиазолового красителя, модифицированного полиэтиленгликолем. Показана сильная зависимость квантового выхода флуоресценции от вязкости и полярности среды: конъюгирование красителя с полиэтиленгликолем не приводит к потере свойств молекулярного ротора, при этом значительно уменьшает его агрегацию. При встраивании в амилоидные фибриллы квантовый выход красителя увеличивается более чем в 40 раз; новый краситель можно рассматривать как эффективный флуоресцентный зонд для обнаружения и исследования амилоидных фибрилл. В качестве чувствительного параметра может быть использована не только интенсивность, но и положение спектра поглощения. Присутствие в растворе белков плазмы крови (альбуминов) практически не влияет на положение спектра поглощения и мало влияет на интенсивность флуоресценции зонда.

Ключевые слова: производные тиюфлавина Т, модифицированные полиэтиленгликолем; флуоресцентные молекулярные роторы; амилоидные фибриллы.

The spectral properties of a new benzothiazole dye modified with polyethylene glycol have been investigated. A strong dependence of the fluorescence quantum yield on the viscosity and polarity of the medium has been shown, i.e. the conjugation of the dye with polyethylene glycol does not lead to the loss of the properties of the molecular rotor, while significantly reduces its aggregation. When incorporated into amyloid fibrils, the quantum yield of the dye increases by more than 40 times; the new dye can be regarded as an efficient fluorescent probe for amyloid fibrils detection and research. In this case, not only the intensity, but also the position of the absorption spectrum can be used as a sensitive parameter. The presence of blood plasma proteins (albumins) in the solution has practically no effect on the position of the absorption spectrum and has little effect on the fluorescence intensity of the probe.

Keywords: derivatives of thioflavin T modified with polyethylene glycol; fluorescent molecular rotors, amyloid fibrils.

Введение. Флуоресцирующие молекулярные красители (флуоресцентные зонды) широко используются для биомедицинской диагностики и исследования свойств различных сред [1, 2]. Важное практическое значение имеют флуоресцирующие молекулярные роторы, у которых после поглощения кванта света происходит поворот одного фрагмента молекулы относительно другого [3—5], в результате которого молекула переходит в скрученное, как правило, не флуоресцирующее состояние. Одним из таких красителей, обладающих лабильностью структуры, является тиюфлавин Т (ThT). В воде и других маловязких растворителях, где поворот фрагментов молекулы происходит за время, намного меньшее времени жизни молекулы в возбужденном состоянии, квантовый выход флуоресценции очень низкий (<0.001) [6, 7]. В вязких красителях, а также при встраивании в полимерные структуры интенсивность свечения красителя возрастает на несколько порядков [8, 9]. Благодаря уникальным флуоресцентным свойствам ThT является прекрасным средством для обнаружения и ис-

SPECTRAL PROPERTIES OF A BENZOTHAZOLE DYE MODIFIED WITH POLYETHYLENE GLYCOL

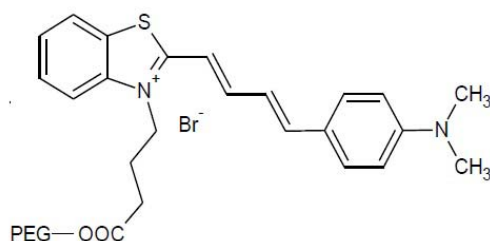
A. A. Maskevich (Yanka Kupala Grodno State University, Grodno, Belarus; e-mail: amaskevich@grsu.by)

следования амилоидных фибрилл и процессов агрегации белков в условиях *in vitro* [10–12]. Тем не менее использование красителя в условиях *in vivo* невозможно, поскольку при физиологических pH ThT существует в виде катиона и его проникновение в клетку затруднено из-за так называемого гематологического барьера. Производные ThT, нейтральные при физиологических pH (например, ВТА-1, ВТА-2), не проявляют свойств молекулярных роторов [13]. В связи с этим актуальны синтез и исследование спектральных свойств новых производных ThT, способных проникать через клеточную мембрану. Этого можно достичь, используя в качестве бокового заместителя полиэтиленгликоль (ПЭГ). ПЭГ характеризуется высокой проникающей способностью по отношению к клеткам тканей.

В настоящей работе показано, что модификация бензтиазолового красителя ПЭГ с молярной массой 200–400 г/моль не лишает молекул красителя свойств молекулярного ротора, однако приводит к значительному уменьшению их агрегации. Модифицированный таким образом краситель имеет высокую константу связывания с амилоидными фибриллами и может быть использован для детекции и исследования механизма их образования.

Методика эксперимента. Спектры поглощения растворов зарегистрированы с использованием спектрофотометра Specord 200 PC (Carl Zeiss, Германия), спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции — спектрофлуориметра CM2203 (“Солар”, Беларусь). Математическая обработка спектров проводилась с помощью пакетов PeakFit 4.12 и Origin 6.0. Бензтиазоловый краситель Th-C8 синтезирован доцентом кафедры лазерной физики и спектроскопии БГУ А. А. Луговским. Чистота и гомогенность препарата проверена методом масс-хроматографии. Для приготовления растворов использованы растворители фирмы Sigma-Aldrich (США) без дополнительной очистки. Амилоидные фибриллы готовили из инсулина быка (Sigma, США) по стандартной методике [14].

Результаты и их обсуждение. Структурная формула красителя Th-C8:



Спектральные характеристики Th-C8 приведены в табл. 1. Видно, что новый краситель в водном растворе имеет длинноволновый спектр поглощения (~520 нм) и флуоресценции (~600 нм). В полярном растворителе (вода) спектр поглощения красителя имеет наиболее коротковолновое положение. В малополярном диоксане имеет место значительный bathochromic сдвиг спектра поглощения 15 нм (рис. 1, а), т. е. положение спектра поглощения чувствительно к полярности микроокружения. Положение спектра флуоресценции практически не зависит от диэлектрических свойств растворителя (рис. 1, б). В этом случае чувствительным параметром является квантовый выход флуоресценции. Новый краситель характеризуется чрезвычайно низким (~0.0011) квантовым выходом флуоресценции в маловязких полярных растворителях (воде, метаноле). В малополярном (диоксане), а также вязком растворителе (глицерине) интенсивность свечения значительно увеличивается; квантовый выход равен 0.0071 и 0.033 (табл. 1, рис. 1, б).

Т а б л и ц а 1. Спектральные характеристики Th-C8 в различных растворителях

Растворитель	Q	$\lambda_{\text{полг}}$, нм	$\lambda_{\text{фл}}$, нм	η , мПа
Вода	0.0011	523.8	600.7	0.89
Метанол	0.0013	521.1	596.1	0.54
Глицерин	0.033	538.9	601.5	934
Диоксан	0.0071	534.4	598.4	1.18
Вода + 0.1 мг/мл АФ	0.044	535.3	600.9	
Вода + 1 мг/мл БСА	0.0025	525.6	600.9	

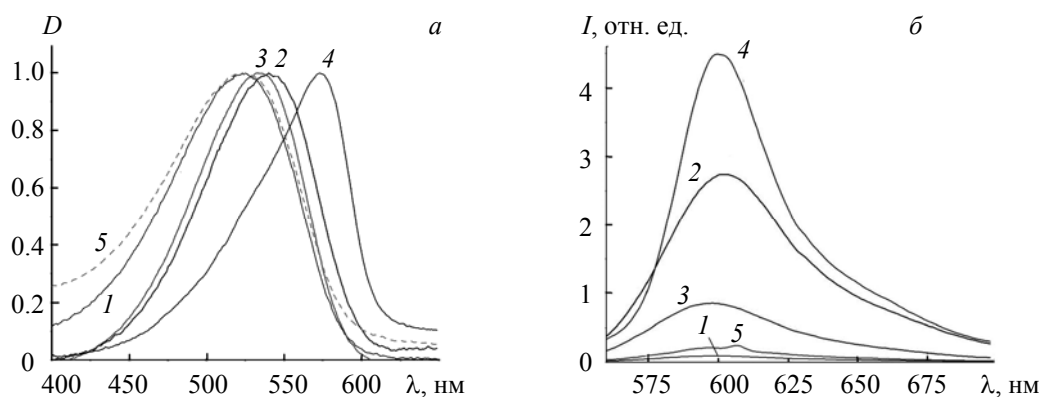


Рис. 1. Нормированные спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) 5.0 мкмоль/л Th-C8 в воде (1), глицерине (2), диоксане (3), в воде в присутствии 0.1 мг/мл амилоидных фибрилл (4) и 1.0 мг/мл БСА (5); $\lambda_{\text{возб}} = 530$ нм

Полученные ранее результаты для бензтиазоловых производных, структурных аналогов Th-C8, показывают, что в маловязких растворителях основным каналом дезактивации возбужденного состояния является торсионная релаксация, в результате которой происходит поворот одного фрагмента относительно другого и молекула переходит в скрученное нефлуоресцирующее состояние [6, 15]. Скорость этого процесса зависит от вязкости микроокружения. В вязких растворителях торсионное вращение в значительной степени заторможено, что приводит к увеличению квантового выхода флуоресценции и длительности затухания флуоресценции. Данные табл. 1 полностью соответствуют таким представлениям.

Несмотря на то что вязкости воды и диоксана различаются незначительно, квантовый выход флуоресценции красителя в диоксане примерно в семь раз выше. Таким образом, зависимость квантового выхода не только от вязкости растворителя, но и от его полярности — важная особенность исследуемого красителя. При объяснении этого феномена необходимо учитывать, что в растворах с низкой вязкостью основным каналом дезактивации возбужденного состояния тиюфлавина Т и его производных является торсионная релаксация фрагментов молекулы, сопровождаемая внутримолекулярным переносом заряда (ICT, intramolecular charge transfer). В работах [15, 16] показано, что ICT и торсионная релаксация зависят от полярности растворителя: увеличение полярности растворителя способствует увеличению скорости процесса. В конечном итоге это приводит к уменьшению квантового выхода флуоресценции.

При практическом использовании новых красителей важно определить условия, при которых они проявляют свои полезные свойства. Для водорастворимых красителей необходимо знать область pH, при которых сохраняется их полезная ионная форма. Спектры поглощения и флуоресценции красителя при изменении pH от 1.95 до 12.6 представлены на рис. 2. В области pH 2.6—10.8 спектр поглощения практически не изменяется по форме. Измерение спектров флуоресценции показывает, что наибольшая интенсивность свечения имеет место при средних значениях pH (2.6—10.8). При $1.95 < \text{pH} > 10$ интенсивность свечения уменьшается, что также коррелирует с изменением оптической плотности раствора. Резкое уменьшение интенсивности свечения при $\text{pH} > 12.6$ (рис. 2, б) связываем с переходом красителя в другую ионную форму с более коротковолновым спектром поглощения. На это косвенно указывает увеличение оптической плотности в коротковолновой области (400—420 нм). Таким образом, в области pH 2.6—10.8 краситель существует в одной ионной (катионной) форме.

Для бензтиазоловых красителей, производных тиюфлавина Т, имеющих удлиненную цепочку π -сопряжения, характерна большая склонность к агрегации в водных растворах [17, 18]. Для исследуемого красителя при увеличении концентрации от микромолярной до 0.24 ммоль/л заметных изменений в спектре поглощения не наблюдается (рис. 3). Это означает, что в указанном диапазоне концентраций краситель существует в мономерной форме. Лишь при концентрации, превышающей миллимолярную, появляется коротковолновая полоса с максимумом при 504 нм, появление которой связываем с образованием димеров и, возможно, более сложных агрегатов, как это имеет место для большинства производных ThT [17, 18]. Для этих производных процесс агрегации заметен при значительно более низких концентрациях. Например, для 3-сульфопропил-5-метокси-2-[3-(3,5-диэтил-2-бензо-

тиазолидене)-1-пропиенил]-бензотиазолия (Th-C11) в водном растворе при концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л примерно половина молекул красителя агрегирована с образованием димеров [18]. Наиболее вероятной причиной существенного уменьшения агрегации молекул исследуемого красителя является его модификация ПЭГ.

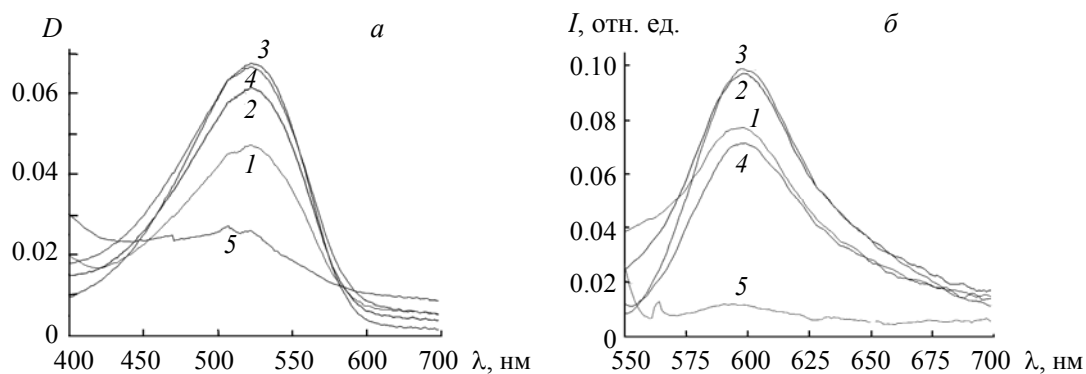


Рис. 2. Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) водных растворов Th-C8 при pH 1.95 (1), 2.60 (2), 5.35 (3), 10.8 (4) и 12.6 (5); $\lambda_{\text{возб}} = 530$ нм

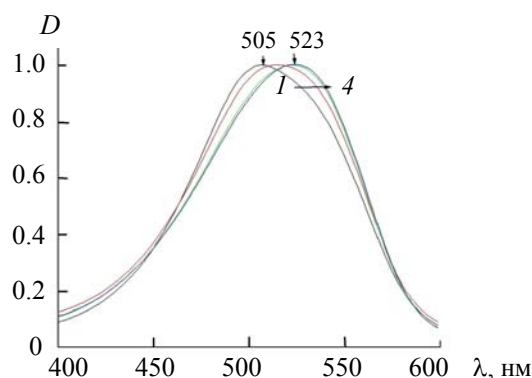


Рис. 3. Нормированные спектры поглощения водного раствора Th-C8 при концентрациях 2.4 (1), 0.80 (2), 0.24 ммоль/л (3) и 5.0 мкмоль/л (4)

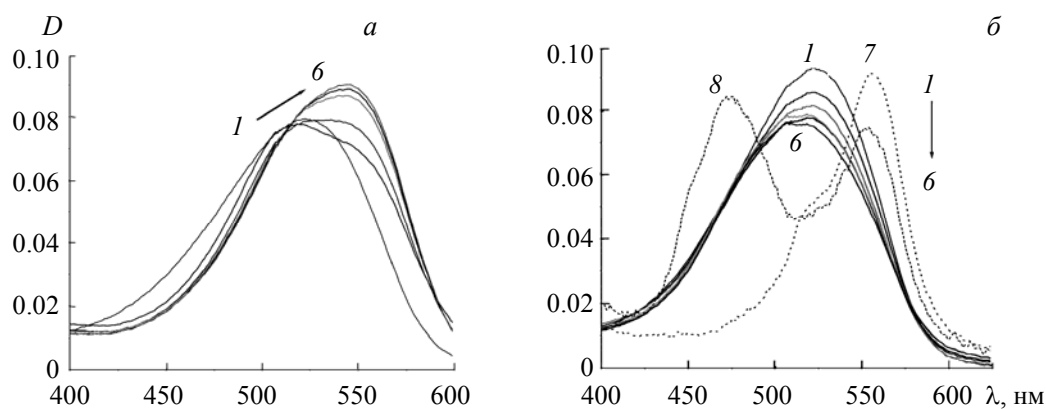


Рис. 4. Спектры поглощения Th-C8 ($2.4 \cdot 10^{-5}$ моль/л) при добавлении ПСС: а — 0 (1), 0.2 (2), 0.49 (3), 0.63 (4), 0.84 (5) и 1.54 мкмоль/л (6); б — 0 (1), 2.1 (2), 4.2 (3), 8.4 (4), 14.0 (5) и 21.0 нмоль/л (6), 7 и 8 — спектры поглощения Th-C11 ($1.2 \cdot 10^{-6}$ моль/л) в отсутствие (7) и при добавлении 20 нмоль/л полиэлектролита (8)

Ранее [17, 18] было показано, что присутствие в водном растворе полиэлектролитов может существенным образом влиять на процесс агрегации ионных красителей. Например, добавление в раствор катионного полиэлектролита полиаллиламина (ПАА) в микромолярной концентрации приводит к уменьшению агрегации Th-C11 [18]. Однако при низкой, наномолярной концентрации полиэлектролита, когда на одну полярную группу полиэлектролита приходится несколько молекул красителя, имеет место усиление агрегации. На рис. 4, а представлены спектры поглощения Th-C8 при добавлении микромолярных концентраций полистиролсульфоната (ПСС). Видно, что увеличение концентрации полиэлектролита приводит к длинноволновому смещению спектра поглощения на ~20 нм. Причиной bathochromного сдвига спектра поглощения красителя является встраивание в структуру полиэлектролита, в результате чего уменьшается вращательная подвижность ароматических фрагментов молекулы, что приводит к уменьшению стабилизации основного электронного состояния молекулы. ПСС — анионный полиэлектролит, поэтому встраивание в его структуру указывает на то, что Th-C8 является катионным красителем. При наномолярных концентрациях полиэлектролиты усиливают агрегацию красителя. На рис. 4, б приведен спектр поглощения водного раствора Th-C11 в отсутствие (точки, кривая 7) и при добавлении 20 нмоль/л полиэлектролита (пунктир, кривая 8). Видно, что добавление в водный раствор красителя небольших концентраций полиэлектролита приводит к появлению интенсивного коротковолнового максимума вследствие агрегации красителя. Проведенные эксперименты показывают, что для исследуемого красителя спектр поглощения при добавлении наномолярных концентраций ПСС испытывает небольшой (≤ 5 нм) коротковолновый сдвиг. Это указывает на незначительность процесса агрегации красителя, индуцированного полиэлектролитом.

Спектральные свойства Th-C8 при встраивании в амилоидные фибриллы (АФ) и бычий сывороточный альбумин (БСА). Наиболее важное применение бензтиазоловых красителей и их производных — использование для обнаружения и исследования АФ на различных стадиях их образования. На рис. 1, а представлен спектр поглощения красителя при добавлении 0.10 мг/мл АФ. Видно, что внесение АФ приводит к существенной деформации спектра поглощения красителя и значительному (50 нм) длинноволновому сдвигу. Это означает, что для встроеного в структуру АФ красителя характерен длинноволновый спектр поглощения с максимумом при 575 нм. Длинноволновый сдвиг спектра является результатом встраивания молекул красителя в неполярное жесткое микроокружение и уменьшения энергии взаимодействия молекул с полярным микроокружением. Изменения имеют место и для спектров флуоресценции (рис. 1, б). Интенсивность флуоресценции увеличивается более чем в 40 раз. Встраивание в структуру АФ приводит к полному ограничению торсионного вращения фрагментов молекулы, являющегося основным тушащим флуоресценцию процессом. Характерно, что при этом положение спектра испускания изменяется незначительно: имеет место длинноволновый сдвиг, не превышающий 10 нм. Это объясняется тем, что молекулы ThT, инкорпорированные в АФ, находятся жестком окружении, а излучение происходит из франк-кондоновского состояния, которое по энергии близко к равновесному. Таким образом, новый краситель Th-C8 является чувствительным по отношению к АФ флуоресцентным зондам, при этом в качестве аналитического сигнала может использоваться не только интенсивность (квантовый выход) флуоресценции, но и положение спектра поглощения.

Отличительной особенностью исследуемой производной является почти полная инертность по отношению к БСА и другим белкам в нативной форме. Как видно из рис. 1, присутствие в растворе белка не приводит к изменению формы спектра поглощения (рис. 1, а, кривая 5). Некоторое увеличение оптической плотности в данном случае отражает монотонное увеличение рэлеевского рассеяния, вызванного присутствующим в растворе белком. Интенсивность флуоресценции при концентрации белка 1.0 мг/мл увеличивается всего в два раза (рис. 1, б, кривая 5), т. е. данный краситель практически не встраивается в БСА. В связи с этим взаимодействие его с АФ можно рассматривать как достаточно специфическое.

Закключение. Новое производное бензтиазола Th-C8, модифицированное полиэтиленгликолем, характеризуется длинноволновым спектром поглощения и флуоресценции, что позволяет его использовать при изучении биологических образцов в опытах *in vitro* и *in vivo*. Исследуемый краситель имеет сильную зависимость квантового выхода флуоресценции от вязкости растворителя. Квантовый выход значительно возрастает также при встраивании в структуру упорядоченных белковых агрегатов (амилоидных фибрилл). Полученные результаты показывают, что конъюгация бензтиазолового красителя с полиэтиленгликолем не приводит к потере красителем свойств молекулярного ротора. В отличие от большинства молекулярных роторов для Th-C8 характерна также зависимость интен-

сивности флуоресценции от полярности растворителя. Это позволяет отнести его к классу сольватохромных молекулярных роторов. При pH 2—10 в водном растворе молекула Th-C8 присутствует в виде катиона, однако в отличие от других ионных производных бензтиазола, характеризующихся увеличенной π -сопряженной электронной системой, агрегация имеет место только при миллимолярной концентрации, т. е. модификация молекул полиэтиленгликолем приводит к значительному уменьшению их способности к агрегации.

Полученные результаты показывают, что новый краситель Th-C8 является чувствительным по отношению к амилоидным фибриллам флуоресцентным зондом. При этом в качестве аналитического сигнала может использоваться не только интенсивность (квантовый выход) флуоресценции, но и положение спектра поглощения. Присутствие в растворе альбуминов практически не влияет на положение спектра поглощения и мало влияет на интенсивность флуоресценции зонда.

Автор выражает благодарность доценту БГУ А. А. Луговскому за синтез нового красителя Th-C8.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования РБ, ГПНИ “Фотоника и электроника для инноваций” (задание 1.5).

- [1] Z. Darwich, A. S. Klymchenko, D. Dujardin, Y. Mély. *RSC Adv.*, **4** (2014) 8481—8488
- [2] I. A. Karpenko, R. Kreder, C. Valencia, P. Villa, C. Mendre, B. Mouillac, Y. Mely, M. Hibert, D. Bonnet, A. S. Klymchenko. *ChemBioChem.*, **15** (2014) 359—363
- [3] M. L. Viriot, M. C. Carre, C. Geoffroy-Chapotot, A. Brembilla, S. Muller, J. F. Stoltz. *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, **19** (1998) 151—160
- [4] S. Howell, M. Dakanali, E. A. Theodorakis, M. A. Haidekker. *J. Fluores.*, **22** (2012) 457—465
- [5] M. A. Haidekker. *J. Am. Chem. Soc.*, **128** (2006) 398—399
- [6] V. I. Stsiapura, A. A. Maskevich, V. A. Kuzmitsky, V. N. Uversky, I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov. *J. Phys. Chem. B*, **112** (2008) 15893—15902
- [7] P. K. Singh, M. Kumbhakar, H. Pal, S. Nath. *J. Phys. Chem. B*, **114**, N 17 (2010) 5920—5927
- [8] Е. С. Воропай, П. М. Самцов, К. Н. Каплевский, А. А. Маскевич, В. И. Степура, О. И. Поварова И. М. Кузнецова, К. К. Тuroverov, А. Л. Финк, В. Н. Уверский. *Журн. прикл. спектр.*, **70**, № 6 (2003) 767—773 [E. S. Voropai, M. P. Samtsov, K. N. Kaplevskii, A. A. Maskevich, V. I. Stepuro, O. I. Povarova, I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov, A. L. Fink, V. N. Uverskii. *J. Appl. Spectr.*, **70** (2003) 868—874]
- [9] A. I. Sulatskaya, A. A. Maskevich, I. M. Kuznetsova, V. N. Uversky, K. K. Turoverov. *PLoS ONE*, **5**, N 10 (2010) 15385-e15385
- [10] H. Naiki, K. Higuchi, M. Hosokawa, T. Takeda. *Anal Biochem.*, **177** (1989) 244—249
- [11] T. Ban, D. Hamada, K. Hasegawa, H. Naiki, Y. Goto. *J. Biol. Chem.*, **278** (2003) 16462—16465
- [12] C. E. Kung, J. K. Reed. *Biochemistry*, **25** (1986) 6114—6121
- [13] V. I. Stsiapura, S. A. Kurhuzenkau, V. A. Kuzmitsky, O. V. Bouganov, S. A. Tikhomirov. *J. Phys. Chem. A*, **120** (2016) 5481—5496
- [14] A. A. Maskevich, V. I. Stsiapura, V. A. Kuzmitsky, I. M. Kuznetsova, O. I. Povarova, V. N. Uversky, K. K. Turoverov. *J. Proteom. Res.*, **6** (2007) 1392—1401
- [15] V. I. Stsiapura, A. A. Maskevich, S. A. Tikhomirov, O. V. Buganov. *J. Phys. Chem. A*, **114**, N 32 (2010) 8345—8350
- [16] E. M. Kosower, D. Huppert. *Chem. Phys. Lett.*, **96** (1983) 433—435
- [17] А. В. Лавыш, А. А. Маскевич, А. А. Луговский, Е. С. Воропай, А. И. Сулацкая, И. М. Кузнецова, К. К. Тuroverov. *Журн. прикл. спектр.*, **83**, № 6 (2017) 861—868 [A. V. Lavysh, A. A. Maskevich, A. A. Lugovskii, E. S. Voropai, A. I. Sulatskaya, I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov. *J. Appl. Spectr.*, **83** (2017) 917—923]
- [18] А. А. Маскевич. *Веснік ГрДзУ імя Янкі Купалы. Сер. 2, Матэматыка. Фізіка. Інфарматыка, вылічальная тэхніка і кіраванне*, **10**, № 1 (2020) 83—92