

09.1;14

Определение времен затухания и анизотропии поляризованной флуоресценции флавинадениндинуклеотида с субнаносекундным разрешением

© М.К. Краснопевцева, В.П. Белик, А.А. Богданов, И.В. Семенова, А.Г. Смолин, О.С. Васютинский

Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: marina.krasnopedvtceva@gmail.com

Поступило в Редакцию 7 февраля 2020 г.

В окончательной редакции 7 февраля 2020 г.

Принято к публикации 27 марта 2020 г.

Исследованы оптические свойства биологического кофермента FAD (флавинадениндинуклеотид) в водном растворе. В экспериментах по наблюдению затухания поляризованной флуоресценции, возбуждаемой импульсами пикосекундного лазера, определены два времени жизни флуоресценции, время вращательной диффузии и параметр анизотропии. Проведено обсуждение полученных результатов и сравнение с результатами других авторов.

Ключевые слова: флавинадениндинуклеотид, FAD, поляризованная флуоресценция, время затухания, время вращательной диффузии, анизотропия.

DOI: 10.21883/PJTF.2020.12.49528.18234

Кофермент флавинадениндинуклеотид (FAD) является непосредственным участником окислительно-восстановительных реакций в живых клетках. Флавинадениндинуклеотид существует в двух формах — окисленной FAD и восстановленной FADH₂, причем FADH₂ не флуоресцирует, а FAD обладает автофлуоресценцией и широко используется в качестве флуоресцентного зонда при исследовании биохимических процессов в живых клетках [1]. Известно, что параметры флуоресценции FAD меняются в зависимости от биохимических процессов, в которых он участвует [1,2], поэтому определение этих параметров позволяет получить информацию об окислительно-восстановительных реакциях в живых клетках. FAD участвует главным образом в митохондриальных процессах, таких как бета-окисление жирных кислот и цикл Кребса, однако он присутствует также в ядре и цитозоле клеток [3]. Помимо этого FAD является кофактором фотолиазы — фермента репарации ДНК у прокариот, архей и некоторых эукариот [4], что дает возможность его использования в качестве флуоресцентного зонда в живых организмах. В настоящее время мониторинг параметров флуоресценции FAD используется в диагностике и терапии раковых заболеваний [2,5]. Большой интерес для исследования метаболизма в клетках представляет также сравнение излучения флуоресценции биологических коэнзимов FAD и NADH [6,7]. Известно, что в растворах FAD существует в двух конформациях: „открытой“, в которой его изоаллоказиновая и адениновая хромоформные группы пространственно разделены, и „сложенной“, в которой между ними возникает химическая связь $\pi-\pi$ [8]. Несмотря на проведенные исследования, имеющиеся в литературе данные о параметрах флуоресценции FAD в различных растворах неполны и зачастую противоречат

друг другу [8,9]. Прежде всего это касается параметров затухания поляризованной флуоресценции при импульсном возбуждении, таких как времена жизни, отношение соответствующих весовых коэффициентов, времена вращательной диффузии, анизотропия поглощения.

В настоящей работе проведены исследования времен затухания поляризованной флуоресценции, отношения весовых коэффициентов, анизотропии поглощения и времени вращательной диффузии в водном растворе FAD для различных длин волн в пределах полосы флуоресценции.

В экспериментах использовался раствор FAD в дистиллированной воде (pH = 5.7) с концентрацией 60 μ M. На рис. 1, *a* представлен спектр поглощения водного раствора FAD, зарегистрированный с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-1800. Как видно из этого рисунка, в спектре поглощения FAD присутствуют два пика с максимумами на 375 и 450 nm. Эти пики поглощения обычно интерпретируются как соответствующие оптическим переходам $S_0 \rightarrow S_2$ и $S_0 \rightarrow S_1$ во второе и первое электронные возбужденные состояния изоаллоказиновой хромоформной группы FAD [8]. На рис. 1, *b* приведен спектр флуоресценции, полученный при возбуждении молекул FAD полупроводниковым лазером на длине волны 452.5 nm. Измерения осуществлялись с помощью монохроматора МДР-12 с дифракционной решеткой 1200 mm^{-1} и ширинами входной и выходной щелей 0.15 mm, что соответствовало спектральному разрешению 0.35 nm. Измерения проводились в диапазоне длин волн от 450 до 750 nm, а регистрация излучения флуоресценции производилась фотоэлектронным умножителем (ФЭУ) Hamamatsu H10682-01. Небольшой пик на длине волны 452.5 nm на рис. 1, *b* обусловлен рассеянным излучением возбуждающего лазера.

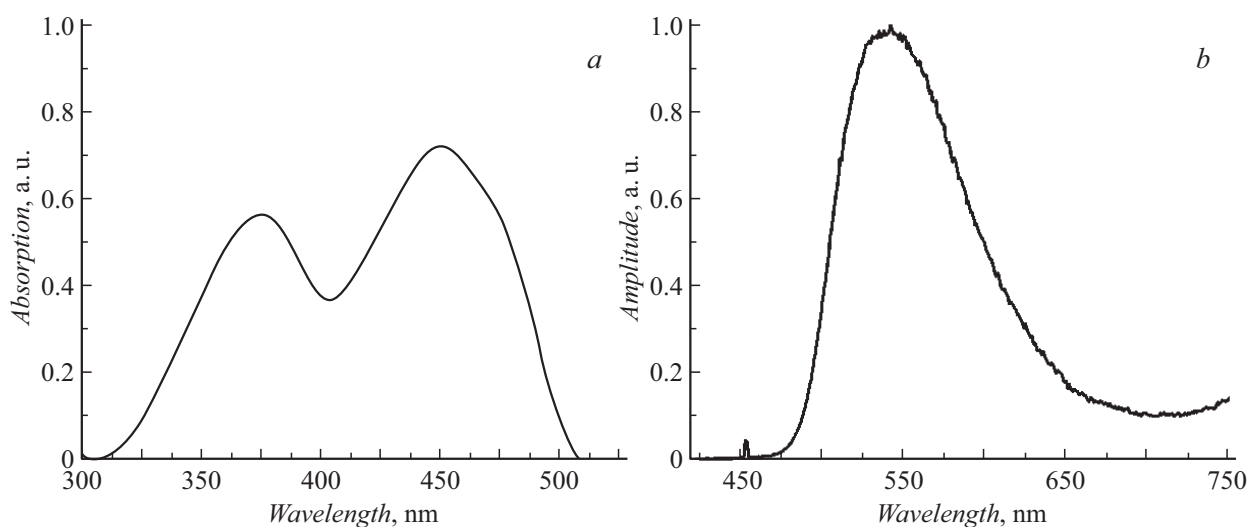


Рис. 1. Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) FAD в воде.

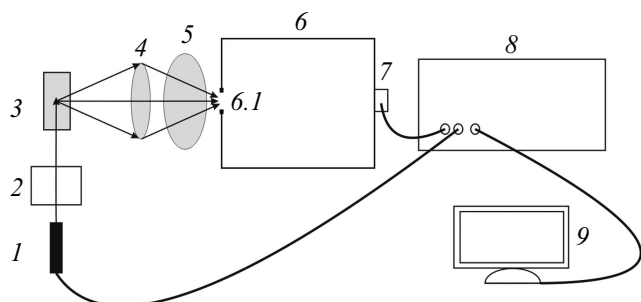


Рис. 2. Схема экспериментальной установки. 1 — лазер, 2 — призма Глана, 3 — кювета с раствором, 4 — собирающая линза, 5 — поляризатор, 6 — монохроматор, 6.1 — входная щель монохроматора, 7 — фотоумножитель, 8 — TCSPC-модуль, 9 — компьютер.

Исследования затухания поляризованной флуоресценции FAD проводились в основном по методике, описанной в наших предыдущих работах [10–12], однако имелись и некоторые отличия. Схема установки представлена на рис. 2. Кварцевая кювета с водным раствором FAD (10×10 mm, 3.5 ml) облучалась импульсным полупроводниковым лазером на длине волны 452.5 nm с импульсами длительностью 30 ps и частотой повторения 2 MHz. Лазерное излучение было поляризовано вертикально, параллельно входной щели монохроматора (ось Y). Излучение флуоресценции раствора фокусировалось на входную щель монохроматора МДР-12 под прямым углом к направлению лазерного пучка. Измерения проводились на длинах волн $\lambda = 510, 520, 530, 550$ и 570 nm в пределах полосы флуоресценции FAD. Непосредственно перед входной щелью монохроматора был помещен тонкопленочный дихроичный поляризатор, ось пропускания которого поочередно устанавливалась в вертикальное и горизонтальное положение. Регистрация

временной динамики затухания поляризованной флуоресценции раствора на выходе из монохроматора осуществлялась с помощью ФЭУ Hamamatsu H10682-01 при двух взаимно перпендикулярных положениях оси поляризатора. Детектирование сигналов флуоресценции осуществлялось в режиме счета фотонов, а их последующая обработка производилась по методу времякорреляционной спектроскопии (TCSPC) с помощью модуля PicoHarp 300 (PicoQuant).

На рис. 3 представлены типичные кривые затухания поляризованной флуоресценции FAD на длине волны 510 nm. Символами обозначены полученные экспериментальные данные, а сплошными кривыми — результаты подгонки. I_x и I_y на рис. 3 обозначают интенсивности горизонтально и вертикально поляризованных компонент флуоресценции, а IRF — график аппаратной функции использованного измерительного тракта, полуширина которого составляла 320 ps.

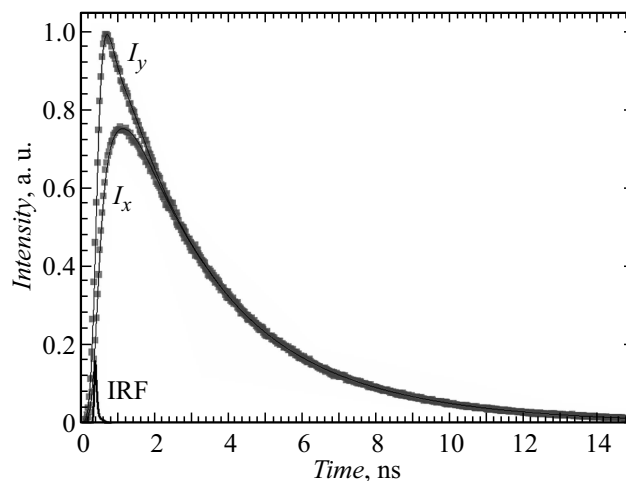


Рис. 3. Сигналы затухания поляризованной флуоресценции. Время $t = 0$ соответствует моменту возбуждения.

Параметры флуоресценции

λ , nm	τ_1 , ns	τ_2 , ns	I_1/I_2	r_0	τ_{rot} , ns
510	4.3 ± 0.2	2.2 ± 0.2	0.58 ± 0.06	0.34 ± 0.03	0.27 ± 0.03
520	4.2 ± 0.2	2.1 ± 0.2	0.61 ± 0.06	0.35 ± 0.03	0.24 ± 0.03
530	4.2 ± 0.2	2.1 ± 0.2	0.62 ± 0.06	0.35 ± 0.03	0.24 ± 0.03
550	4.2 ± 0.2	2.2 ± 0.2	0.63 ± 0.06	0.35 ± 0.03	0.26 ± 0.03
570	4.2 ± 0.2	2.1 ± 0.2	0.60 ± 0.06	0.33 ± 0.03	0.27 ± 0.03

Как известно, если поляризация возбуждающего излучения направлена вдоль оси Y , сигналы затухания поляризованной флуоресценции, распространяющейся вдоль оси Z , могут быть описаны следующими выражениями [13]:

$$I_x = I_0(t)[1 - r(t)], \quad (1)$$

$$I_y = GI_0(t)[1 + 2r(t)], \quad (2)$$

где индексы x и y задают соответствующие компоненты поляризации флуоресценции, $I_0(t)$ — изотропная компонента излучения флуоресценции, G — отношение чувствительности в x - и y -каналах регистрации, а $r(t)$ — параметр анизотропии.

Полученные экспериментальные данные обрабатывались на основе выражений (1), (2) с помощью процедуры глобальной подгонки, реализованной в среде MATLAB, в рамках которой осуществлялась свертка выражений (1) и (2) с аппаратным контуром $IRF(t)$, приведенным на рис. 3. В результате было установлено, что временная зависимость изотропной компоненты излучения флуоресценции $I_0(t)$ в условиях наших экспериментов удовлетворительно описывалась двухэкспоненциальной функцией

$$I_0(t) = [I_1 \exp(-t/\tau_1) + I_2 \exp(-t/\tau_2)], \quad (3)$$

где I_1 и I_2 — предэкспоненциальные коэффициенты, а τ_1 , τ_2 — времена затухания флуоресценции.

Параметр анизотропии $r(t)$ описывался одноэкспоненциальной функцией

$$r(t) = r_0 \exp(-t/\tau_{rot}), \quad (4)$$

где r_0 — анизотропия в момент возбуждения, а τ_{rot} — время вращательной диффузии.

Результаты подгонки представлены в виде сплошных кривых на рис. 3, а полученные параметры для нескольких длин волн флуоресценции приведены в таблице. Видно, что эти параметры не зависят от длины волны флуоресценции в пределах погрешностей. Результаты статистического анализа экспериментальных данных, приведенные в таблице, свидетельствуют о наличии двух времен жизни в возбужденном состоянии FAD, что подтверждает результаты работы [9], но не согласуется с выводами работы [8], где сообщалось о наличии четырех времен жизни при тех же экспериментальных условиях. Средние значения приведенных в таблице времен жизни

$\tau_1 = 4.2 \pm 0.2$ ns и $\tau_2 = 2.1 \pm 0.2$ ns в пределах погрешностей совпадают с полученными в работе [9] в водном растворе FAD, однако обоснованность проведенного в [9] усреднения этих двух времен не подтверждается нашим анализом. Вероятно, время τ_1 соответствует времени жизни FAD в открытой конформации, поскольку его значение близко к времени жизни свободного флавина [14], а время τ_2 отражает наличие в растворе молекул FAD в сложной конформации. Определенный в настоящей работе параметр анизотропии $r_0 = 0.34 \pm 0.03$ близок к его максимальному значению для симметричного волчка ($r_{max} = 0.4$), что свидетельствует о том, что дипольные моменты возбуждения и флуоресценции FAD в воде приблизительно параллельны друг другу.

Благодарности

Авторы благодарят ФТИ им. А.Ф. Иоффе за предоставление оборудования для проведения экспериментов.

Финансирование работы

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-53-34001).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Galbán J., Sanz-Vicente I., Navarro J., de Marcos S. // *Methods Appl. Fluoresc.* 2016. V. 4. P. 042005.
- [2] Pradhan A., Pandey P.K., Singh P. Overview of fluorescence spectroscopy in early cancer detection // *Neurophotonics and biomedical spectroscopy* / Eds R.R. Alfano, L. Shi. Amsterdam—Oxford—Cambridge: Elsevier, 2019. P. 253–328.
- [3] Giancaspero T.A., Busco G., Panebianco C., Carmone C., Miccolis A., Liuzzi G.M., Colella M., Barile M. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 29069–29080.
- [4] Müller P., Brettel K., Grama L., Nyitrai M., Lukacs A. // *ChemPhysChem.* 2016. V. 17. P. 1329–1340.
- [5] Shirmanova M.V., Druzhkova I.N., Lukina M.M., Dudenkova V.V., Ignatov N.I., Snopova L.B., Shcheslavskiy V.I., Belousov V.V., Zagaynova E.V. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 8911.

- [6] *Wall M.A., Heaster T.M., Tilbury K., Choi W.J., Roblyer D., Wang R., Skala M., Liu J.T.C.* Metabolic imaging approaches: optical imaging // *Imaging and metabolism* / Eds J.S. Lewis, K.R. Keshari. N.Y.: Springer, 2018. P. 113.
- [7] *Васютинский О.С., Смолин А.Г., Oswald C., Gericke K.-H.* // *Оптика и спектроскопия*. 2017. Т. 122. В. 4. С. 622–626.
- [8] *Nakabayashi T., Islam M.S., Ohta N.* // *J. Phys. Chem. B*. 2010. V. 114. P 15254–15260.
- [9] *Sengupta A., Khade R.V., Hazra P.* // *J. Photochem. Photobiol.* 2011. V. 221. P 105–112.
- [10] *Sasin M.E., Smolin A.G., Gericke K.-H., Tokunaga E., Vasyutinskii O.S.* // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2018. V. 20. P. 19922–19931.
- [11] *Denicke S., Gericke K.-H., Smolin A.G., Shternin P.S., Vasyutinskii O.S.* // *J. Phys. Chem. A*. 2010. V. 114. P. 9681–9692.
- [12] *Herbrich S., Al-Hadhuri T., Gericke K.-H., Shternin P.S., Smolin A.G., Vasyutinskii O.S.* // *J. Chem. Phys.* 2015. V. 142. P. 024310.
- [13] *Shternin P.S., Gericke K.-H., Vasyutinskii O.S.* // *Mol. Phys.* 2010. V. 108. P 813–825.
- [14] *Drossler P., Holzer H., Penzkofer A., Hegemann P.* // *Chem. Phys.* 2002. V. 282. P. 429–439.