

УДК 535.371

## ИЗМЕРЕНИЕ ЗАТУХАНИЯ АНИЗОТРОПИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ЛИПИДНОГО ЗОНДА В ИСКУССТВЕННЫХ МЕМБРАНАХ

Г. В. Демьянов, С. И. Исакова<sup>1</sup>, Н. К. Курек<sup>1</sup>, Т. И. Сырейщикова, М. Н. Якименко

*В пучке синхротронного излучения синхротрона ФИАН С-60 проведено измерение затухания анизотропии флуоресценции липидного зонда К-68, встроенного в искусственные мембраны (липосомы). Полученные данные могут быть использованы для уточнения величины критического радиуса безызлучательного переноса энергии между зондом К-68 (донором) и зондом ДСП-12 (акцептором).*

Безызлучательный перенос энергии (БПЭ) [1 – 3] между флуоресцентными зондами, встраиваемыми в биологические объекты, успешно используется для исследования геометрических размеров, формы и особенностей структуры зондируемых объектов [4]. При этом точность оценки геометрических параметров исследуемых объектов определяется, в частности, точностью оценки величины критического радиуса БПЭ (радиуса Ферстера). Радиус Ферстера зависит от многих факторов [1 – 3], и, в том числе, от величины взаимной ориентации дипольных моментов зондов доноров и зондов акцепторов. Информацию об этой величине получают из измерения кривой затухания анизотропии флуоресценции зондов.

В данной работе проведено измерение затухания анизотропии флуоресценции липидного зонда К-68<sup>2</sup> с целью уточнения величины взаимной ориентации дипольных моментов этого зонда и липидного зонда ДСП-12<sup>3</sup>, встроенных в искусственные мембраны

<sup>1</sup>НИИ ФХМ Мин. здрав. России.

<sup>2</sup>Зонд К-68: (4-(5-фенилоксазолил-2)-1-пентадицил) пиридиний перхлорат.

<sup>3</sup>Зонд ДСП-12: (4-п-диметиламиностирол)-N-додецилпиридиний.

(липосомы). Измерение затухания анизотропии флуоресценции зонда К-68 проводилось в пучке синхротронного излучения синхротрона С-60 ФИАН на установке для исследования кинетики затухания анизотропии флуоресценции биологических объектов [5]. Время затухания интенсивности флуоресценции этого зонда в липосомах, предварительно измеренное на этой же установке, составляет  $3,4 \pm 0,1$  нс и достаточно для измерения затухания анизотропии его флуоресценции. Измерение затухания анизотропии флуоресценции зонда ДСП-12 затруднено из-за очень малого времени жизни возбужденного состояния (примерно 0,3 нс). Однако, как показано в [6], отсутствие информации о затухании анизотропии флуоресценции одного из участников переноса энергии (либо донора, либо акцептора) приводит к неопределенности величины эффективности БПЭ не более чем 2%.

Анизотропия флуоресценции исследуемого объекта определялась по формуле

$$R(t) = (i_h(t) - i_v(t))/(i_h(t) + 2i_v(t)) = D(t)/S(t),$$

$$D(t) = i_h(t) - i_v(t), \quad S(t) = i_h(t) + 2i_v(t), \quad (1)$$

где  $i_h$  – интенсивность флуоресценции, поляризованной параллельно поляризации возбуждающего излучения;  $i_v$  – интенсивность флуоресценции, поляризованной перпендикулярно этому направлению.

Таким образом, измерение кинетики затухания анизотропии флуоресценции сводилось к измерению затухания во времени величин  $i_h$  и  $i_v$ .

В установке предусмотрена как возможность одновременного измерения величин  $i_h$  и  $i_v$  двумя различными ФЭУ, так и последовательного измерения этих величин каждым из двух ФЭУ с изменением положения оптической оси призмы Глана. Каждый из способов обладает своими преимуществами и недостатками. Первый способ мог бы значительно сократить время измерений, но предполагает идентичность временных характеристик двух систем детектирования. Однако реальные характеристики ФЭУ и регистрирующей электроники подвержены флуктуациям во времени. Второй способ использует одну и ту же систему детектирования, но увеличивает примерно вдвое время измерения анизотропии, а, следовательно, предъявляет повышенные требования к стабильности работы во времени как синхротрона, так и системы регистрации.

Контроль за временными характеристиками двух каналов регистрирующей системы осуществлялся путем одновременного измерения временной формы импульса возбуждающего СИ. Затем измеренная каждым каналом временная форма импульса СИ

аппроксимировалась теоретической кривой, представляющей собой свертку гауссоиды с функцией временного отклика канала регистрации [7]:

$$E(t) = \int_0^t \exp(-(u - A)^2/2\delta^2) \exp(-(t - u)/\tau) du, \quad (2)$$

где  $\delta$  – дисперсия,  $A$  – центр гауссоиды, функция  $\exp(-t/\tau)$  описывает временной отклик фотоумножителя и системы регистрации на  $\delta$ -образный импульс возбуждения.

Проведенные исследования показали, что на практике более удобным и точным является измерение анизотропии (интенсивностей двух компонент поляризации флуоресценции) одним и тем же ФЭУ в последовательные моменты времени.

Каждый канал регистрации обладает определенной чувствительностью по отношению к падающему излучению, определяемой в основном чувствительностью фотокатодов ФЭУ, а также особенностями конструкции установки. Так, при вращении призмы Глана происходит незначительное смещение изображения на поверхности фотокатода ФЭУ, что вследствие неидеальной однородности фотокатода отражается на чувствительности канала. Поэтому измеряемые интенсивности не являются искомыми компонентами поляризации флуоресценции и возникает необходимость знать отношение чувствительностей каналов детектирующей системы для двух компонент поляризации флуоресценции ( $g$ -фактор):

$$g = g_h/g_v. \quad (3)$$

Как следует из литературы, при измерении анизотропии флуоресценции общепринято использование геометрии, при которой флуоресценцию, испускаемую образцом, регистрируют под углом  $90^\circ$  к направлению возбуждения, что позволяет определять  $g$ -фактор только с помощью горизонтально поляризованного излучения [8]. Такая геометрия при всем ее удобстве требует большого объема кюветы (порядка 1 мл). В используемой же экспериментальной установке объем кюветы порядка 0,2 мл, что очень важно для экономии исследуемых образцов, однако геометрия установки не позволяет воспользоваться общепринятой методикой определения  $g$ -фактора. Поэтому калибровка чувствительностей каналов регистрации проводилась с помощью полностью деполяризованной флуоресценции образца. Для получения такой флуоресценции использовались специальные флуоресцентные зонды, растворенные в этаноле. Их быстрое вращение в этаноле приводит к потере первоначальной ориентации флуорофора за время жизни возбужденного состояния ( $\tau_0$ ) и к полной потере поляризации излучения. Интенсивности

компонент флуоресценции с взаимно ортогональной поляризацией таких зондов равны, что и позволяет определить  $g$ -фактор.

Такая калибровка проводилась с помощью двух флуоресцентных зондов, растворенных в этаноле: МБА<sup>4</sup> ( $\tau_0 = 13$  нс,  $\lambda_{\text{воз}} = 340$  нм,  $\lambda_{\text{фл}} = 420$  нм) и пирена ( $\tau_0 = 26$  нс,  $\lambda_{\text{воз}} = 400$  нм,  $\lambda_{\text{фл}} = 500$  нм). Анализ экспериментальных данных и определение параметров затухания анизотропии флуоресценции проводились в соответствии с [5].

Из измеренных компонент поляризации флуоресценции  $i_h(t)$  и  $i_v(t)$  рассчитывали функции  $S_{\text{exp}}(t) = i_h(t) + 2gi_v(t)$  и  $d_{\text{exp}}(t) = i_h(t) - gi_v(t)$ , где  $g$  —  $g$ -фактор (3). Рассчитывались также функции  $S_{\text{fit}}(t) = E(t) * S(t)$ ,  $d_{\text{fit}}(t) = E(t) * D(t)$  (через  $*$  обозначена свертка функций). Здесь функция  $E(t)$  описывает временную форму импульса возбуждения СИ, измеренную с помощью регистрирующей аппаратуры (2), а функции  $S(t)$  и  $D(t)$  соответствуют  $\delta$ -импульсу возбуждения. Функция  $S(t)$  описывает затухание интенсивности флуоресценции исследуемого образца. Обычно  $S(t) = \sum_i A_i \exp(-t/\tau_i) + A_0$ , где  $A_0$  — коэффициент, учитывающий свет, рассеянный образцом.

Из определения анизотропии  $R(t)$  (1) следует  $D(t) = S(t)R(t)$ . Представляя  $R(t)$  в виде  $R(t) = \sum_j B_j \exp(-t/\varphi_j) + B_0$ , где  $\varphi_j$  — время вращательной корреляции, получаем выражение для  $D(t)$ :

$$D(t) = \sum_i \sum_j A_i B_j \exp(-t(\nu_i + \mu_j)) + A_0 \sum_j B_j \exp(-t/\mu_j) + B_0 \sum_i A_i \exp(-t/\tau_i) + A_0 B_0, \quad (4)$$

где  $\nu_i = 1/\tau_i$ ,  $\mu_j = 1/\varphi_j$ .

Обработка экспериментальных данных осуществлялась в два этапа. На первом этапе обработки методом "деконволюции" определялись параметры  $A_i$  и  $\tau_i$  из измеренной кривой затухания интенсивности флуоресценции  $S_{\text{exp}}(t)$ . С помощью программы "FUMILI" Черновского вычислительного центра нелинейным методом наименьших квадратов проводилась минимизация взвешенной суммы квадратов разностей между  $S_{\text{exp}}(t)$  и  $S_{\text{fit}}(t)$ . Параметры  $B_j$  и  $\varphi_j$  определялись из (4) при известных  $A_i$  и  $\tau_i$  с помощью той же программы.

Обработка измеренной кривой затухания анизотропии флуоресценции зонда К-68 в липосомах позволила определить следующий закон затухания:

$$R(t) = B_1 \exp(-t/\varphi) + B_0,$$

<sup>4</sup>Зонд МБА: 3-метоксибензантрон.

$$B_1 = 0,192 \pm 0,02, \varphi = 1,06 \pm 0,06, B_0 = 0,004 \pm 0,002. \quad (5)$$

Этот закон показывает, что затухание анизотропии определяется в основном вращательной подвижностью хромофоров, и лишь в незначительной степени – существованием преимущественных ориентаций.

Полученные данные о затухании анизотропии флуоресценции зонда К-68 дадут возможность определить фактор деполяризации флуоресценции этого зонда, и в свою очередь, уточнить величину фактора взаимной ориентации донора и акцептора, а следовательно, и радиуса Ферстера [9].

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Forster Th. Ann. Physic, **2**, 55 (1948).
- [2] Forster Th. Discuss. Farad. Soc., **27**, 7 (1959).
- [3] Галанин М. Д. Труды ФИАН, **12**, 3 (1960).
- [4] Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран, М., Наука, 1980.
- [5] Akimov A. V., Demuchanov G. V., Kurek N. K., Molchanov S. S. et al. Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A, **359**, 345 (1995).
- [6] Курек Н. К. Диссертация на соискание ученой степени кандидата физ.-мат. наук, Мин. здрав. РСФСР, НИИФХМ (1991).
- [7] Demuchanov G. V., Zabaazarnyh M. Yu., Isakova S. I., Kurek N. K. et al. Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A, **359**, 342 (1995).
- [8] Лакочич Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии, М., Мир, 1986.
- [9] Davenport L., Dale R. E., Bisby R. H., Cundall R. B. Biochemistry, **24**, N 17, 4097 (1985).

Поступила в редакцию 1 сентября 1995 г.