

УДК 535.34:535.37

ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И СТРУКТУРА J-АГРЕГАТОВ КРАСИТЕЛЯ JC-1 В РАСТВОРАХ

А.В. Сорокин

Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины,

пр. Ленина, 60, Харьков 61001, Украина

E-mail: sorokin@isc.kharkov.com

Поступила в редакцию 7 октября 2008

Принята 7 ноября 2008 г.

При помощи стационарной оптической спектроскопии были исследованы оптические свойства J-агрегатов цианинового красителя JC-1. Была предложена модель структуры данных J-агрегатов. Предположено, что при высоких концентрациях красителя основным строительным блоком линейных цепочек J-агрегатов являются димеры красителя. Показаны спектры поглощения и люминесценции таких димеров. Данная модель структуры J-агрегатов JC-1 предложена впервые.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: JC-1, J-агрегаты, димеры, спектры поглощения, структура агрегатов.

Люминесцентные ассоциаты цианиновых красителей, т.н. J-агрегаты, с момента их открытия в 30-е годы прошлого столетия вызывают повышенный интерес со стороны ученых [1-3]. Благодаря высокой степени упорядоченности мономеров в молекулярных цепочках (линейных или замкнутых) J-агрегата, при поглощении фотона электронное возбуждение оказывается делокализованным на десятки мономеров, в результате чего в J-агрегатах образуются молекулярные экситоны (экситоны Френкеля) [1-3]. Образование этих квазичастиц приводит к появлению новой узкой и интенсивной полосы (J-полосы) в спектре поглощения, смещенной батохромно относительно полосы мономеров, а также практически резонансной ей полосы люминесценции [1-3]. Отметим, что в зависимости от ориентации мономеров в цепочке, может появиться также и гипсохромно смещенная полоса (H-полоса), а также и обе эти полосы. Однако, люминесценция наблюдается только с J-полосы [1-3]. Основным параметром, определяющим оптические свойства J-агрегатов, является длина делокализации экситонов N_{del} – сегмент молекулярной цепочки, на котором делокализован экситон. При увеличении длины делокализации экситонов от минимального значения $N_{del} = 2$ (случай димеров) до сотен мономеров, наблюдается увеличение спектрального сдвига экситонной полосы (J- или H-) относительно полосы мономеров и уменьшение ее ширины [1-3].

Благодаря такой сильной зависимости оптических свойств от структуры, и в свою очередь от микроокружения, J-агрегаты оказались крайне привлекательным объектом в качестве люминесцентных зондов для биомедицинского применения [4-11]. Особый интерес в этом отношении проявляется к J-агрегатам красителя JC-1 (TTBC, 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1,3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) (Рис. 1а), которые оказались наиболее перспективными зондами для измерения мембранного потенциала митохондрий, причем не только в биологических экспериментах, но уже и в медицинской диагностике [4,5,7-9].

Однако, несмотря на уже длительное использование J-агрегатов JC-1, их структура и оптические свойства изучены недостаточно. Известно, что J-агрегаты JC-1 образуются на митохондриях живых клеток благодаря наличию потенциала на их внешней мембране, если же клетка погибает, то J-агрегаты разрушаются [4,5,8,9]. Т.о., в основном, J-агрегаты используются для “on-off” тестов, т.е. есть агрегаты – нет агрегатов, а их спектральные характеристики, такие ширина линий, их положение,

времена затухания люминесценции и т.д. остаются «за кадром». Только недавно появилась работа, подробно исследующая свойства J-агрегатов JC-1 в водном растворе [12]. Авторы [12] попытались установить структуру данных J-агрегатов исходя из данных оптической спектроскопии. Было обнаружено, что при малой концентрации красителя, J-агрегаты JC-1 выявляют интенсивную J-полосу в спектре поглощения. Повышение концентрации приводит к появлению и росту второй полосы – H-полосы, при одновременном уменьшении полосы мономеров и смещении J-полосы в длинноволновую область. Также, в спектре поглощения J-агрегатов JC-1, при высокой концентрации красителя, проявляется малоинтенсивная полоса, лежащая между полосой мономеров и J-полосой [12]. Присутствие в спектре поглощения и H-полосы и J-полосы свидетельствует о том, что молекулярная ячейка J-агрегатов состоит из двух разориентированных молекул, а значит, экситонная полоса расщепляется на две («давыдовское расщепление») [3,12,13]. Обычно, структуру таких J-агрегатов описывают в рамках модели «рыбья кость» (Рис.1б), которая представляет из себя две молекулярные цепочки разориентированные на некоторый угол [3,12].

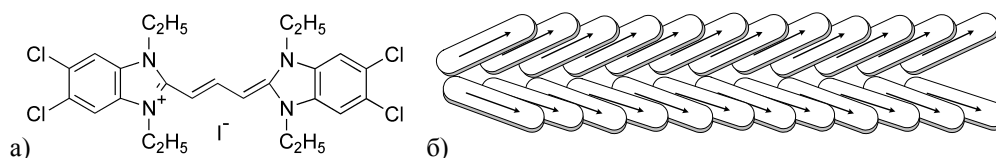


Рис.1 а) структурная формула JC-1; б) модель упаковки J-агрегатов типа «рыбья кость».

Симулированные спектры поглощения J-агрегатов JC-1, полученные с использованием данной модели их структуры, достаточно хорошо совпали с экспериментальными спектрами при высокой концентрации JC-1 [12]. При этом, малоинтенсивная полоса, лежащая между полосой мономеров и J-полосой, была сопоставлена со структурой, при которой расстояние между двумя цепочками (Рис. 1а) достаточно велико, а значит взаимодействие между ними слабое. Однако, в рамках модели «рыбья кость» оказалось невозможным интерпретировать спектры поглощения при малой концентрации красителя [12].

Поэтому, в данной работе исследованы оптические свойства J-агрегатов JC-1 (Рис.1а) в водном растворе и представлена новая модель их структуры, более полно соответствующая спектральным характеристикам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Краситель JC-1 был синтезирован к.х.н. Боровым И.А. (Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины). Его чистота контролировалась при помощи тонкослойной хроматографии. Поверхностно-активное вещество (ПАВ) цетилпиридиний бромид (ЦПБ) было приобретено в фирме Sigma Aldrich (США) и использовались без дальнейшей очистки. Для образования J-агрегатов JC-1, краситель растворялся в полярном растворителе (ДМСО, ДМФА), а далее исходный раствор разбавлялся водным буфером TRIS-HCl ($C = 0.05$ М, $pH = 8.0$), так что содержание водного буфера в полученном бинарном растворе составляла 90%. Для введения в раствор ПАВ ЦПБ, он добавлялся в исходный раствор красителя в полярном растворителе. Концентрация ЦПБ в растворе была 10^{-3} М.

Спектры люминесценции записывались при помощи спектрофлуориметра на базе двух решеточных монохроматоров МДР-23. Один из монохроматоров использовался для выделения требуемой длины волны возбуждения из спектра ксеноновой лампы (ширина линии на полувысоте, $FWHM \sim 0.5$ нм), а второй – для регистрации спектра

люминесценции. Для регистрации спектров поглощения спектрофлуориметр был дополнен лампой накаливания. Для регистрации спектров при повышении температуры использовался термостатированный кюветодержатель и водяной термостат TW-2.02. Для проведения низкотемпературных измерений использовался гелиевый криостат, в который образец помещался в тонкой кювете (1 мм). Затем в рубашку криостата заливался жидкий азот, что приводило к плавному охлаждению образца до температуры порядка 90 К. Таким образом получался стеклованный образец, что позволяло проводить измерения спектров поглощения и люминесценции. Затем жидкий азот заливался в камеру с образцом, охлаждая его до $T = 77$ К. Измерения проводились при температурах от 77 К до комнатных при естественном нагревании криостата.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Т.о. в работе [12] было обнаружено, что при повышении концентрации красителя в растворе, его спектры поглощения значительно трансформируются. Действительно, при низких концентрациях JC-1 ($5 \cdot 10^{-6}$ М) в спектре поглощения появляется интенсивная и достаточно широкая (FWHM = 570 см^{-1}) J-полоса ($\lambda_{\text{макс}} = 585 \text{ нм}$), смещенная в длинноволновую область относительно полосы мономеров ($\lambda_{\text{макс}} = 516 \text{ нм}$) (Рис.2а,б). При этом, в спектре люминесценции (Рис.2в) наблюдаются две интенсивные полосы – мономеров ($\lambda_{\text{макс}} = 530 \text{ нм}$) и J-агрегатов ($\lambda_{\text{макс}} = 585 \text{ нм}$, FWHM = 400 см^{-1}).

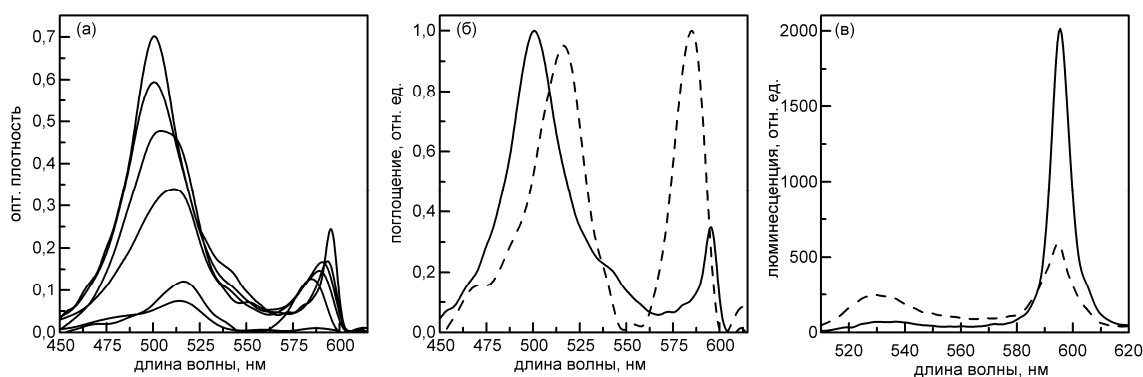


Рис.2 Спектры поглощения (а) JC-1 в бинарном растворе ДМФА/водный буфер (1:9) при разной концентрации красителя: 10^{-6} М, $5 \cdot 10^{-6}$ М, 10^{-5} М, $2.5 \cdot 10^{-5}$ М, $5 \cdot 10^{-5}$ М, 10^{-4} М; Спектры поглощения (б) и люминесценции (в) ($\lambda_{\text{возб}} = 500 \text{ нм}$) JC-1 при минимальной $5 \cdot 10^{-6}$ М (пунктирная линия) и максимальной 10^{-4} М (сплошная линия) концентрациях красителя.

При увеличении концентрации красителя, J-полоса в спектре поглощения постепенно смещается в длинноволновую область до $\lambda_{\text{макс}} = 595 \text{ нм}$ и сужается (до FWHM = 250 см^{-1}) (Рис.2а). Это указывает на увеличение размеров J-агрегатов и улучшение их структуры [1-3]. Одновременно, появляется коротковолновая H-полоса ($\lambda_{\text{макс}} = 500 \text{ нм}$), интенсивность которой возрастает по мере увеличения концентрации (Рис.2а). При этом интенсивность полосы мономеров падает, и она не выделяется даже в виде перегиба. Отметим, что также появляется еще одна полоса ($\lambda_{\text{макс}} = 540 \text{ нм}$), смещенная в длинноволновую область относительно полосы мономеров, которая проявляется в виде перегиба. Для наглядного отображения происходящих изменений, на рис. 2б приведены нормированные спектры поглощения J-агрегатов при минимальной (для образования агрегатов) и максимальной концентрациях красителя. В спектре люминесценции (Рис.2в), при наибольшей использованной концентрации красителя (10^{-4} М), как и в случае малой концентрации, наблюдаются обе полосы – мономеров и J-агрегатов. Однако, их интенсивности оказываются перераспределенными – интенсивность свечения мономеров упала, а интенсивность

свечения J-агрегатов значительно возросла, при этом их полоса, как и в случае поглощения, оказывается смещенной в длинноволновую область ($\lambda_{\text{макс}} = 595.5 \text{ нм}$) и более узкой (до $\text{FWHM} = 225 \text{ см}^{-1}$) (Рис.2в).

Для того, чтобы проверить модель структуры J-агрегатов JC-1, использованную в [12], были исследованы особенности термического разрушения данных J-агрегатов при высокой концентрации красителя (10^{-4} М) (Рис.3). Отметим, что полного разрушения J-агрегатов JC-1 достигнуть не удалось, из-за технических трудностей регистрации спектров поглощения при температуре выше 95° С . При анализе полученных данных необходимо выделить несколько важных моментов. Во-первых, наблюдается смещение J-полосы в коротковолновую область и ее уширение, аналогично наблюдаемым эффектам при уменьшении концентрации (Рис. 2а). Т.е. происходит уменьшение J-агрегатов в размерах и разупорядочение их структуры. Далее, не наблюдается смещение максимума H-полосы, что говорит о том, что цепочка мономеров, отвечающая за нее, разрушается на мономеры целиком без промежуточных стадий (т.е. нет разрушения по цепочке n-меры \Rightarrow (n-1)-меры \Rightarrow (n-2)-меры и т.д., как в случае J-полосы). Такое поведение и малый спектральный сдвиг H-полосы относительно полосы мономеров указывает на то, что она отвечает поглощению димеров [1-3,10,11]. Отметим, что в первую очередь разрушаются H-полоса и полоса с $\lambda_{\text{макс}} = 540 \text{ нм}$, в то время как J-полоса оказывается наиболее стабильной. Суммарные спектральные изменения, наблюдаемые для J-агрегатов JC-1 при повышении температуры, представлены на Рис. 3в, где показаны спектры поглощения J-агрегатов при минимальной и максимальной температурах. Если использовать модель структуры агрегатов типа «рыбья кость» (Рис. 1), то при термическом разрушении в первую очередь, должно уменьшаться взаимодействие между двумя молекулярными цепочками, которое намного слабее, чем между молекулами внутри цепочки [12]. Как показано при помощи компьютерного моделирования [12], спектрально это должно проявляться в одновременном смещении H- и J-полос по направлению друг к другу и росте интенсивности полосы с $\lambda_{\text{макс}} = 540 \text{ нм}$.

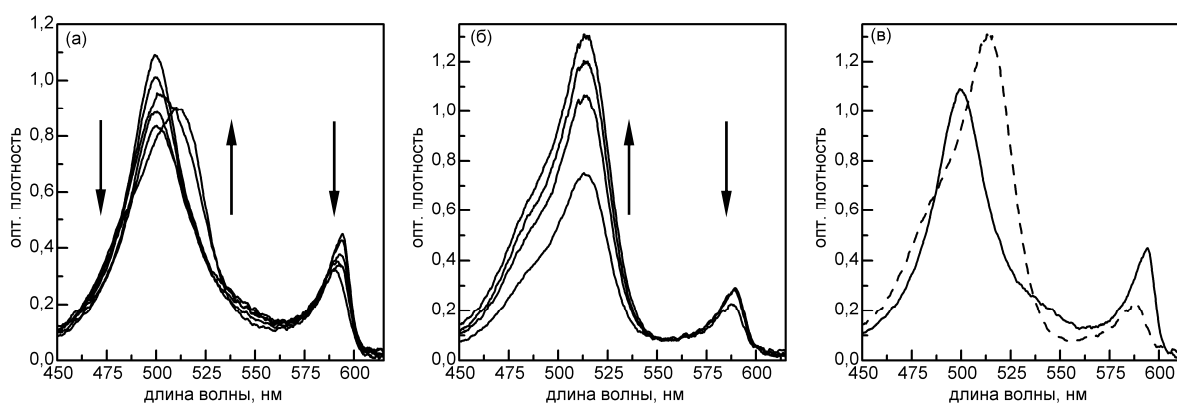


Рис.3 Спектры поглощения J-агрегатов JC-1 при разных температурах: а) 15° С , 20° С , 30° С , 40° С , 50° С , 55° С ; б) 60° С , 70° С , 80° С , 95° С ; в) 15° С (сплошная линия) и 40° С (пунктирная линия). Стрелки указывают направление изменения интенсивности полос при росте температуры.

Можно предложить другую модель структуры J-агрегатов JC-1, которая более точно описывает их спектральные особенности. При низкой концентрации красителя (или высокой температуре), J-агрегаты имеют типичную структуру линейной цепочки (Рис. 4а) и выявляют только J-полосу в спектре поглощения (Рис. 2б и 3б) [1-3].

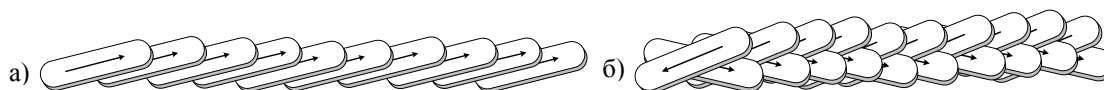


Рис. 4 Модель структуры J-агрегатов JC-1: а) цепочка из мономеров, б) цепочка из димеров.

При повышении концентрации красителя и увеличении J-агрегатов в размерах, цепочки сжимаются, что приводит к разориентации молекул друг относительно друга (Рис. 4б) и образованию димеров. В таком случае, молекулярная цепочка уже состоит не из мономеров, а из димеров. В результате разориентации молекул внутри димера, в их спектре наблюдаются две полосы – Н-полоса ($\lambda_{\text{макс}} = 500$ нм) и J-полоса ($\lambda_{\text{макс}} = 540$ нм) [3]. При образовании молекулярной цепочки из димеров, их J-полосы обобществляются и образуют общую J-полосу (с $\lambda_{\text{макс}} = 585\text{--}595$ нм, в зависимости от концентрации). При этом, интенсивность J-полос димеров уменьшается, и в спектре поглощения наблюдаются только малоинтенсивная полоса, соответствующая димерам, по каким-либо причинам не встроенным в цепочку. При увеличении температуры (уменьшении концентрации) размеры цепочек уменьшаются, их структура разупорядочивается и димеры разрушаются, а молекулярные цепочки из димеров (Рис. 4а) превращаются в цепочки из мономеров (Рис. 4б).

Основную роль в образовании димеров, как предполагается, играет сжатие цепочек. Недавно было показано [14], что добавление ПАВ ЦПБ в растворы, содержащие J-агрегаты ряда цианиновых красителей, приводит к образованию оболочки из молекул ПАВ вокруг агрегатов, которая значительно упорядочивает их структуру. При добавлении ЦПБ в раствор с J-агрегатами JC-1 с малой концентрации красителя (10^{-5} М), видно, что происходит значительная модификация спектра поглощения (Рис. 5). В общем, изменения соответствуют повышению концентрации красителя до 10^{-4} М (Рис. 2): появляются интенсивная Н-полоса и малоинтенсивная J-полоса димеров, J-полоса протяженных цепочек сужается и смещается в длинноволновую область.

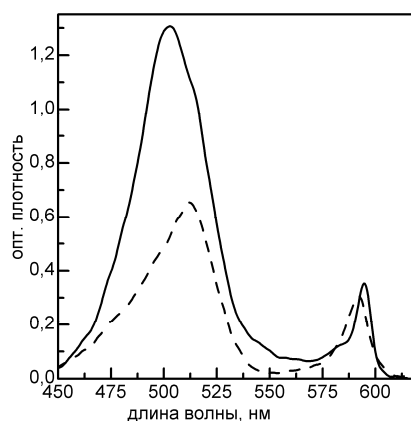


Рис. 5 Спектры поглощения J-агрегатов JC-1 в присутствии ПАВ ЦПБ (сплошная линия) и в его отсутствие (пунктирная линия). Концентрация красителя составляет 10^{-5} М.

В предложенной модели предполагается, что полоса с $\lambda_{\text{макс}} = 540$ нм принадлежит димерам, которые не встроены в протяженную молекулярную цепочку J-агрегата. Но в таком случае, они должны обладать собственной полосой люминесценции, которая, однако, не зарегистрирована в спектре люминесценции J-агрегатов (Рис. 2в). Это может быть связано с малой концентрацией таких димеров, а также с переносом энергии с отдельных димеров на протяженные цепочки. Для того, чтобы зарегистрировать спектры свечения отдельных димеров, необходимо разрушить протяженные цепочки

так, чтобы сжатие, приводящее к димеризации, сохранилось. Для этого, J-агрегаты JC-1 были заморожены и получены их спектры при низких температурах (Рис. 6).

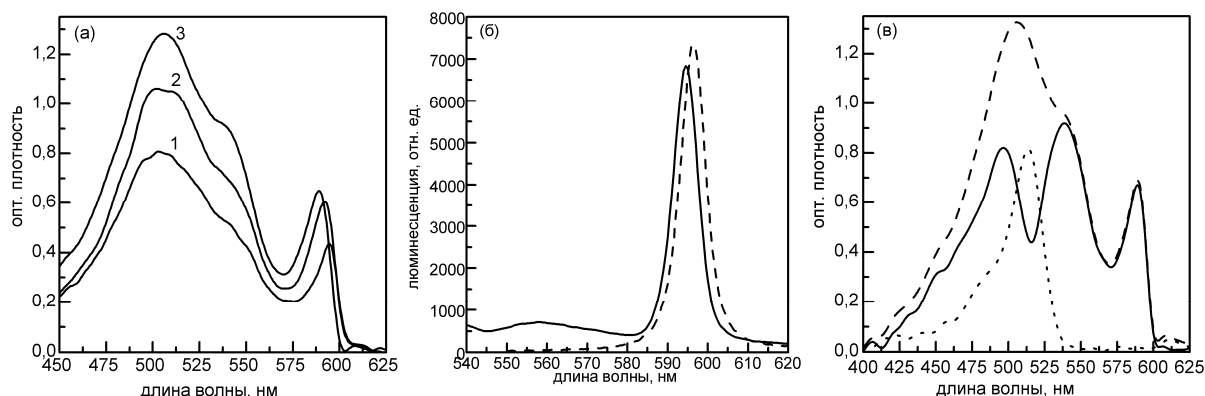


Рис. 6. а) Спектры поглощения J-агрегатов JC-1 при низких температурах: 1) 260 К, 2) 180 К, 3) 80 К. б) Спектры люминесценции J-агрегатов JC-1 при разных температурах: 80 К (сплошная линия) и 290 К (пунктирная линия). в) Выделенные агрегатные полосы (сплошная линия) из общего спектра поглощения (пунктирная линия) при вычитании полосы мономеров (линия из точек).

Из рис. 6а видно, что при азотной температуре J-полоса протяженных цепочек уширена и смещена в коротковолновую область, а интенсивность J-полосы димеров увеличена. Это можно интерпретировать, как сокращение длины делокализации экситонов [1-3], т.е. разрушение экситонных состояний в протяженных цепочках J-агрегатов на меньшие сегменты, в частности димеры. Однако, такое разрушение не является необратимым, т.к. повышение температуры приводит к постепенному восстановлению спектру поглощения, наблюдаемому при комнатной температуре (Рис. 2). В спектре люминесценции при азотной температуре проявляется новая малоинтенсивная полоса с $\lambda_{\text{макс}} = 560$ нм, которая отсутствует в спектре при комнатной температуре (Рис. 6б). Данную полосу можно сопоставить со свечением отдельных димеров, т.к. она отличается по спектральному положению как от полосы мономеров ($\lambda_{\text{макс}} = 530$ нм), так и от полосы протяженных агрегатов ($\lambda_{\text{макс}} = 595$ нм). Для наглядности, агрегатные полосы были выделены из общего спектра (Рис. 6в). На данном рисунке четко видны три основные полосы, принадлежащие агрегатному состоянию красителя JC-1: J-полосы, принадлежащие димерам ($\lambda_{\text{макс}} = 540$ нм) и протяженным цепочкам из димеров ($\lambda_{\text{макс}} = 585\text{--}595$ нм) и H-полоса ($\lambda_{\text{макс}} = 500$ нм), принадлежащая как отдельным димерам, так и димерам, составляющим цепочку. Т.о. полученные спектральные данные доказывают присутствие димеров в растворе J-агрегатов JC-1.

ВЫВОДЫ

В данной работе были исследованы оптические свойства J-агрегатов цианинового красителя JC-1, которые широко используются в качестве люминесцентных зондов для биомедицинского применения. Анализ экспериментальных данных позволил предложить новую модель структуры данных J-агрегатов, которая наиболее адекватно описывает его спектральные свойства. Показано, что J-агрегаты JC-1 представляют собой протяженные линейные молекулярные цепочки. При низких концентрациях красителя или высоких температурах, данные цепочки состоят из мономеров красителя. Повышение концентрации или создание молекулярной оболочки вокруг J-агрегатов приводят к деформации цепочки за счет сжатия, в результате чего образуются димеры красителя, организованные в протяженные цепочки. Были получены спектры

поглощения и люминесценции отдельных димеров, которые не встроились в цепочки J-агрегатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mobius D. Scheibe Aggregates // *Adv. Matter.* – 1995. – Vol. 7, № 5. – P. 437–444.
2. Kobayashi T. (Ed.) *J-Aggregates*. Singapore: World Scientific Publishing. – 1996. – 230 p.
3. Шапиро Б.И. Молекулярные ансамбли полиметиновых красителей // *Успехи химии.* – 2006. – Т. 75, № 5. – С. 484–510.
4. Smiley S.T., Reers M., Mottola-Hartshorn C. et al. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – Vol. 88. – P. 3671–3675.
5. Salvioli S., Ardizzoni A., Franceschi C., Cossarizza A. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess $\Delta\Psi$ changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis // *FEBS Letters.* – 1997. – Vol. 411. – P. 77–82.
6. Wang M., Silva G.L., Armitage B.A. DNA-Templated Formation of a Helical Cyanine Dye J-Aggregate // *J. Am. Chem. Soc.* – 2000. – Vol. 122. – P. 9977–9986.
7. Jones R.M., Lu L., Helgeson R. et al. Building highly sensitive dye assemblies for biosensing from molecular building blocks // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – Vol. 98, № 26. – P. 14769–14772.
8. Legrand O., Perrot J.-Y., Simonin G. et al. JC-1: a very sensitive fluorescent probe to test Pgp activity in adult acute myeloid leukemia // *Blood.* – 2001. – Vol. 97, № 2. – 502–508.
9. Van Blerkom J., Davis P., Mathwig V., Alexander S. Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos // *Human Repr.* – 2002. – Vol. 17, № 1. – P. 393–406.
10. Guralchuk G.Ya., Sorokin A.V., Katrunov I.K. et al. Specificity of cyanine dye L-21 aggregation in solutions with nucleic acids // *J. Fluorescence.* – 2007. – Vol. 17, № 4. – P. 370–376.
11. Гуральчук Г.Я., Гринёв Р.С., Катрунов И.К. и др. Применение агрегатов цианиновых красителей для детекции нуклеиновых кислот // *Биофиз. вестн. ХНУ.* – 2007. – Т. 18, № 1. – С. 102–107.
12. Birkan B., Güllen D., Özçelik S. Controlled Formation of the Two-Dimensional TTBC J-Aggregates in an Aqueous Solution // *J. Phys. Chem. B.* – 2006. – Vol. 110. – P. 10805–10813.
13. Давыдов А.С. Теория молекулярных экситонов. Москва: Наука. – 1968. – 296 с.
14. Guralchuk G.Ya., Katrunov I.K., Gryniov R.S. et al. Anomalous Surfactant-Induced Enhancement of Luminescence Quantum Yield of Cyanine Dye J-Aggregates // *J. Phys. Chem. C.* – 2008. – Vol. 112, № 38. – P. 14762–14768.