

02

## Исследование взаимодействия между бычьим сывороточным альбумином и молекулами галогенпроизводных флуоресцеина в анионных обратных мицеллах

© А.А. Кулешова, А.М. Салецкий

МГУ имени М.В. Ломоносова, физический факультет,  
Москва, Россия

e-mail: kuleshova@physics.msu.ru

Поступила в редакцию 08.07.2025 г.

В окончательной редакции 11.10.2025 г.

Принята к публикации 11.03.2026 г.

Исследовано влияние пространственного ограничения в обратных мицеллах (ОМ) на спектрально-флуоресцентные характеристики молекул эозина (Е), эритрозина (ER), бенгальского розового (RB), бычьего сывороточного альбумина (BSA) и их смесей. Установлено, что размер обратных мицелл (их гидродинамический радиус  $R_h$ ) влияет на спектрально-люминесцентные характеристики как BSA, так и молекул красителей (МК). При этом микроокружение остатков тирозина в BSA при изменении  $R_h$  не претерпевает явных изменений, в то время как уменьшение радиуса мицелл приводит к увеличению интенсивности флуоресценции остатков триптофана. Для МК пространственное ограничение в водных пулах мицелл сказывается на изменении дипольного момента молекул при их возбуждении. Экспериментально получены зависимости коэффициента тушения флуоресценции BSA ( $K_{SV}$ ) МК и определено, что для исследованных красителей данная характеристика отличается для мицеллярных растворов по сравнению с буферными. Константы статического тушения ( $K_S$ ) для комплексов в мицеллах в исследованной области их гидродинамических радиусов на два порядка меньше, чем константа Штерна–Фольмера ( $K_{SV}$ ) для водных растворов. Значения  $K_S$  уменьшаются в ряду  $E \rightarrow ER \rightarrow BR$ , что обусловлено конформационными изменениями структуры молекул в этом ряду, связанными с перераспределением зарядов на атомах молекул. Динамическое тушение флуоресценции, являющееся основным, обусловлено переносом энергии электронного возбуждения с BSA на МК. Эффективность переноса электронного возбуждения увеличивается с уменьшением  $R_h$ .

**Ключевые слова:** обратные мицеллы, флуоресценция, флуоресцентные красители, сывороточный альбумин, галогенпроизводные флуоресцеина.

DOI: 10.61011/OS.2026.04.63014.8365-25

### Введение

Являясь ключевыми строительными блоками и одними из основных компонентов организмов, альбумины играют важную роль в живых организмах, выполняя различные биологические функции. Они взаимодействуют с различными веществами, такими как другие белки, ДНК, РНК и лекарства [1]. Многие лекарственные препараты и другие биоактивные малые молекулы связываются с альбумином, который в этом случае функционирует как их носитель. В свою очередь возникающие взаимодействия могут также влиять на стабильность и токсичность лекарственного средства в химиотерапевтических процессах. Изучение этих взаимодействий позволит лучше понять биологические процессы на молекулярном уровне. Для исследования механизмов и природы такого связывания, а также поверхностно-индуцированных конформационных изменений в интерфейсах белков используются комплексы „альбумин+молекулы красителей (МК)“ [2,3]. Общепринятыми методами исследования связывания малых ионов или молекул с альбумином являются различные спектральные методы, при этом

в качестве основного исследовательского инструмента таких процессов выступает флуоресцентная спектроскопия из-за своей высокой чувствительности обнаружения свечения молекул [4–6].

Обычно взаимодействие между МК и белком исследуется в разбавленных буферных растворах. В связи с этим возникает необходимость изучения таких взаимодействий в условиях, близких к клеткам. Для этого необходимо привлекать простые модели клетки, одной из которых является обратная мицелла, которая представляет собой наноразмерную частицу, состоящую из молекул поверхностно-активного вещества, которые собираются вокруг водного ядра, суспендированного в неполярном растворителе [7]. Размер такой „клетки“ (мицеллы) можно изменять соотношением концентраций воды и поверхностно-активного вещества в растворе.

В последнее время для изучения взаимодействия белок–МК используются производные флуоресцеина (F), которые получают замещением атома водорода в F атомами галогенов. Эти красители широко используются в медицине в качестве контрастных веществ, при

лечении меланомы [8] и в антимикробной фотодинамической терапии [9–11].

В настоящей работе исследованы спектрально-люминесцентные характеристики бычьего сывороточного альбумина (BSA) и МК эозина (Е), эритрозина (ER), бенгальского розового (RB) и их смесей в условиях пространственного ограничения в обратных мицеллах натрий 1,4-бис (2-этилгексил) сульфосукцината (АОТ).

## Эксперимент

Водно-мицеллярные растворы красителей и белка приготавливались по методике, описанной в [12]. Для приготовления исследуемых растворов применялись АОТ, декан и красители семейства флуоресцеина (флуоресцеин и его галогенпроизводные: бромированная производная — эозин Y, йодированная производная — эритрозин, тетра-йод- тетра-хлор производная — бенгальский розовый). Концентрации перечисленных красителей были  $10^{-5}$ ,  $1.5 \cdot 10^{-5}$ ,  $2.5 \cdot 10^{-5}$  и  $3 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Концентрация BSA  $C = 5 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Значение pH составляло 6.0, при данной кислотности среды рассматриваемые комплексы образуют стабильные структуры без эффектов денатурации со стороны сывороточного альбумина.

Размер мицелл регулировался изменением степени гидратации  $\omega = \frac{[H_2O]}{[АОТ]}$  ( $[АОТ]$  и  $[H_2O]$  — молярные концентрации воды и поверхностно-активного вещества в растворе) и определялся методом динамического рассеяния света [13] на приборе Photocor Complex. Гидродинамический радиус мицелл  $R_h$  определялся в предположении их сферической формы по формуле Стокса–Эйнштейна–Дебая.

Для исследования были приготовлены водно-мицеллярные растворы белка и смеси белка и МК для четырех значений  $w$  18.6, 37, 55 и 70, что соответствовало  $R_h = 3.3, 6.8, 11.0$  и  $15.0$  nm.

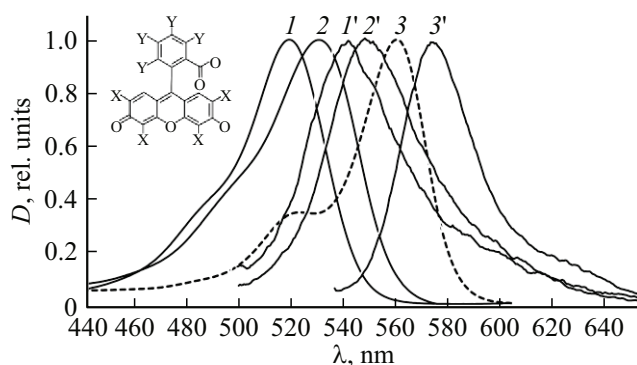
Спектры поглощения растворов измерялись на спектрофотометре SOLAR PB 2201 (Беларусь), спектры флуоресценции и синхронные спектры — на спектрофлуориметре SOLAR PB 2203 (Беларусь).

Температура образцов при всех измерениях была 295 K.

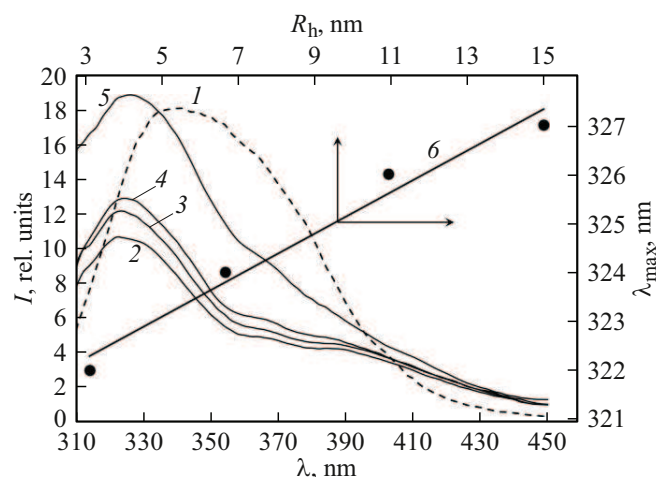
Полученные спектры обработаны программой OriginPro 8.5. Статистическую обработку данных проводили путем вычисления среднего арифметического ( $M$ ), стандартного отклонения ( $\sigma$ ), ошибки среднего арифметического ( $m$ ). Выборка составляла 5 повторов для каждого эксперимента.

## Результаты и их обсуждение

При взаимодействии BSA и МК наблюдается изменение их спектральных характеристик и тушение флуоресценции белка и МК [14,15]. Поэтому вначале



**Рис. 1.** Спектры поглощения (1–3) и флуоресценции (1'–3') красителей: Е (1, 1'), ER (2, 2'), RB (3, 3') в водно-мицеллярных растворах с  $R_h = 11.0$  nm. На вставке — структурные формулы МК: Е (X=Br и Y=H), ER (X=I и Y=H), RB (X=I и Y=Cl).



**Рис. 2.** Спектры флуоресценции растворов BSA концентрации  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l в воде (1) и в обратных мицеллах (ОМ) с различными  $R_h$ : 3.3 (2), 6.8 (3), 11 (4) и 15 nm (5). Зависимость положения максимума интенсивности флуоресценции спектра BSA  $\lambda_{max}$  от  $R_h$  (6).

нами были исследованы спектры флуоресценции водно-мицеллярных растворов белка и смеси BSA и МК для четырех значений  $R_h = 3.3, 6.8, 11.0$  и  $15.0$  nm.

На рис. 1 в качестве примера представлены спектры поглощения и флуоресценции исследованных красителей для водно-мицеллярных растворов с  $R_h = 11.0$  nm.

На рис. 2 представлены спектры флуоресценции BSA в мицеллах с разными значениями гидродинамического радиуса и в воде. Собственная флуоресценция белка в основном зависит от аминокислотных остатков (триптофан (Trp), фенилаланин (Phe) и тирозин (Tyr)). При этом Phe имеет очень низкий квантовый выход флуоресценции, поэтому его спектр излучения практически не наблюдается. BSA содержит два остатка триптофана: Trp 213 расположен в кармане гидрофобного связывания во втором домене (Sudlow I), а Trp 134 — на поверхно-

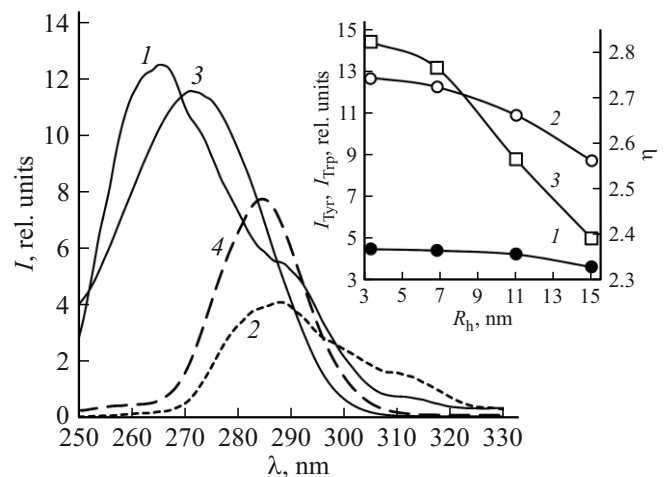
сти BSA в первом домене. Остатки Туг распределены во всех доменах BSA.

При внедрении BSA в обратную мицеллу его спектральные характеристики будут определяться его зарядом и гидрофильными или гидрофобными характеристиками, а также зарядом поверхностно-активного вещества. Молекулы АОТ являются анионными. Исследовались растворы с рН 6. При таком значении рН заряд BSA является отрицательным [16]. При рассмотрении взаимодействия белок–обратная мицелла важное значение играет размер белка. В наших экспериментах при рН 6 гидродинамический радиус  $R_h = 3.4 \text{ nm}$  [17].

При растворении в воде, а также в водных биологических растворах происходит перераспределение локально заряженных участков макромолекулы альбумина, что изменяет ее гидрофильные и гидрофобные свойства. Гидрофобность может быть причиной уплотнения макромолекул альбумина, в то время как преобладание гидрофильных взаимодействий может способствовать преобразованию компактного доменного строения в квазилинейную структуру. По-видимому, раскрытие белковой молекулы приводит к изменению флуоресценции аминокислотных остатков сывороточного альбумина.

Видно, что внедрение молекулы BSA в ОМ приводит к коротковолновому сдвигу спектра флуоресценции белка по сравнению с водными растворами, величина которого зависит от размера ОМ: наибольшему для  $R_h = 3.3 \text{ nm}$  и наименьшему для  $R_h = 15.0 \text{ nm}$ . Для описания спектров флуоресценции BSA в обратных мицеллах возможно привлечение несколько моделей сольбилизации белков [18]. Наиболее реалистичными для исследованной системы являются две следующие: 1) контакт с органическим раствором и взаимодействие со стенкой мицеллы, 2) водный пул и оболочка АОТ. При  $R_h = 3.3 \text{ nm}$  водный пул не может полностью покрыть макромолекулу BSA, что приводит к прямому контакту некоторых фрагментов BSA с раствором органического вещества, в результате наблюдается значительный сдвиг спектра флуоресценции белка (кривая 2, рис. 2). Когда водный пул обратной мицеллы вырастает (при  $R_h = 6.8 \text{ nm}$ ), молекулы локализуются за счет электростатического взаимодействия (молекулы BSA и АОТ имеют отрицательный заряд) в центре мицеллы, и спектр флуоресценции BSA сдвигается в длинноволновую область (кривая 3, рис. 2). При дальнейшем увеличении  $R_h$  наблюдается длинноволновый сдвиг спектра флуоресценции BSA (рис. 2, кривая б), обусловленный увеличением гидрофильных взаимодействий между белком и внутримицеллярной водой за счет уменьшения электростатических взаимодействий между молекулами BSA и заряженными головками АОТ. При этом положение максимума спектра флуоресценции BSA не достигает своего положения для водного раствора.

Для анализа изменения микроокружения остатков Туг и Тгр BSA были измерены и проанализированы синхронные спектры флуоресценции водно-мицеллярных растворов белка — спектры флуоресценции, получаемые



**Рис. 3.** Синхронные спектры флуоресценции BSA в обратных мицеллах с  $R_h = 3.3 \text{ nm}$  (1, 2) и в водных растворах (3, 4) для  $\delta\lambda = 60$  (1, 3) и  $\delta\lambda = 15 \text{ nm}$  (2, 4). Концентрация BSA равна  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ . Вставка: зависимости интенсивности  $I$  (в относительных единицах) в максимумах спектров  $I_{\text{Tyr}}$  (1),  $I_{\text{Tgr}}$  (2) и отношения интенсивностей в максимумах  $\eta = \frac{I_{\text{Tgr}}}{I_{\text{Tyr}}}$  ( $I_{\text{Tgr}}$  — интенсивность свечения при  $\delta\lambda = 60 \text{ nm}$ ,  $I_{\text{Tyr}}$  — при  $\delta\lambda = 15 \text{ nm}$ ) (3) от гидродинамического радиуса  $R_h$ . Концентрация BSA равна  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ .

в результате сканирования по длинам волн возбуждения ( $\lambda_{\text{возб}}$ ) и излучения ( $\lambda_{\text{изл}}$ ) при постоянной разности  $\delta\lambda = \lambda_{\text{изл}} - \lambda_{\text{возб}}$  (оба монохроматора спектрофлуориметра сканируются одновременно). Исследования проводились при двух значениях разности длин волн регистрации и возбуждения флуоресценции BSA  $\delta\lambda$ :  $15 \text{ nm}$  (спектр свечения Тгр) и  $60 \text{ nm}$  (спектр свечения Туг) [19]. Были измерены синхронные спектры флуоресценции BSA в мицеллярных структурах для всех четырех значений  $R_h$  и для водных растворов белка. Интервал сканирования для исследованных в работе систем был  $250\text{--}350 \text{ nm}$ . На рис. 3 в качестве примера представлены синхронные спектры мицеллярных с  $R_h = 3.3 \text{ nm}$  (кривые 1, 2) и водных (3, 4) растворов BSA для  $\delta\lambda = 60$  (кривые 1, 3) и  $\delta\lambda = 15 \text{ nm}$  (кривые 2, 4).

На вставке к рис. 3 представлены зависимости интенсивности  $I$  (в относительных единицах) в максимумах спектров Туг (кривая 1) и Тгр (кривая 2) от гидродинамического радиуса  $R_h$ . Видно, что если интенсивность свечения  $I_{\text{Tyr}}$  практически не зависит от  $R_h$ , то  $I_{\text{Tgr}}$  с ростом  $R_h$  уменьшается. На этом же рисунке представлена зависимость отношения интенсивностей в максимумах Тгр ( $I_{\text{Tgr}}$ ) и Туг ( $I_{\text{Tyr}}$ ) —  $\eta = \left(\frac{I_{\text{Tgr}}}{I_{\text{Tyr}}}\right)$  от  $R_h$  (кривая 3). С ростом значений  $R_h$  из-за ослабления пространственного ограничения внутри пула ОМ наблюдается уменьшение отношения  $\eta$  с ростом  $R_h$ , при этом  $\eta > 1$  (рис. 1, с, кривая 3). Таким образом, микроокружение остатков Туг не претерпевает явных изменений, в то время как уменьшение  $R_h$  приводит к увеличению интенсивности флуоресценции остатков Тгр.

Введение галогензамещенных флуоресцеина в мицеллы АОТ, содержащие BSA, вызывает изменение спектров флуоресценции МК из-за их взаимодействия с белком. Размер МК в воде следующий: для эозина и эритрозина размеры, рассчитанные как расстояние (диаметр) между самыми удаленными атомами, составил 1.08 и 1.12 nm соответственно [20], для бенгальского розового диаметр, измеренный с помощью динамического рассеяния света, 1.4 nm [21]. То есть, МК находятся внутри водного пула обратной мицеллы. Для характеристики этих изменений были определены стоксовы сдвиги  $\Delta\nu = \nu_g - \nu_e$ , где  $\nu_g$ ,  $\nu_e$  — частоты максимумов спектров поглощения и флуоресценции красителей в ОМ соответственно и изменения стоксова сдвига спектров красителей при добавлении BSA, т. е. разность между стоксовым сдвигом спектров красителей в мицелле и стоксовым сдвигом спектров красителей в смеси „краситель + BSA“ в мицелле ( $(\Delta\nu)_{BSA} = \Delta\nu - \Delta\nu_{BSA}$ ,  $\Delta\nu_{BSA}$  — стоксов сдвиг спектров красителей в ОМ белка и красителя,  $\Delta\nu$  — стоксов сдвиг для спектров МК в ОМ) для различных  $R_h$ .

На рис. 4 (кривые 1–3) в качестве примера представлены зависимости  $\Delta\nu_{BSA}$  от  $R_h$  для исследованных красителей при концентрации красителей  $C = 3 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Величина  $\Delta\nu_{BSA}$  характеризует влияние взаимодействия „белок–МК“ на стоксов сдвиг спектров красителей. Для всей области исследованных  $R_{exth}$  при добавлении BSA в мицеллы наблюдается уменьшение стоксова сдвига спектров. Из рис. 4 видно, что для системы „BSA + RB“ величина  $(\Delta\nu)_{BSA}$  практически не изменяется (кривая 3). Это указывает на слабое взаимодействие БР и BSA. Для Е и ER для всех  $R_h$  взаимодействие в системе „BSA + МК“ вызывает уменьшение стоксова сдвига МК (рис. 4, кривые 1, 2). При этом с увеличением  $R_h$  наблюдается рост  $(\Delta\nu)_{BSA}$ .

Влияние  $R_h$  мицелл на  $\Delta\nu$  МК может быть обусловлено изменением их дипольных моментов при возбужде-

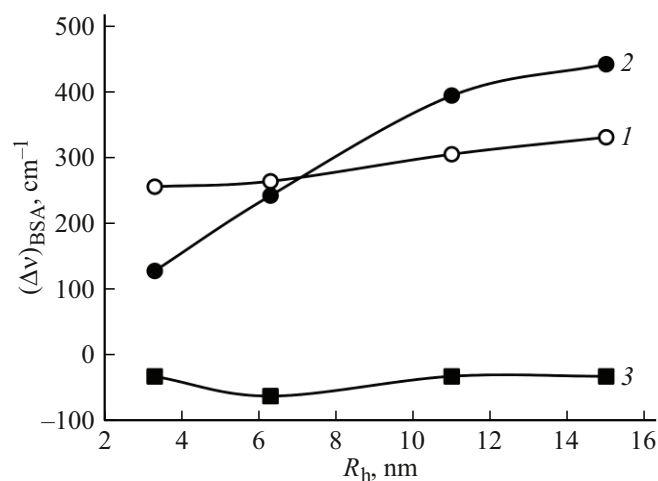


Рис. 4. Зависимости изменения стоксовых сдвигов спектров красителей с концентрацией  $C = 3 \cdot 10^{-5}$  mol/l в смеси с BSA от  $R_h$  для Е (1), ER (2) и RB (3).

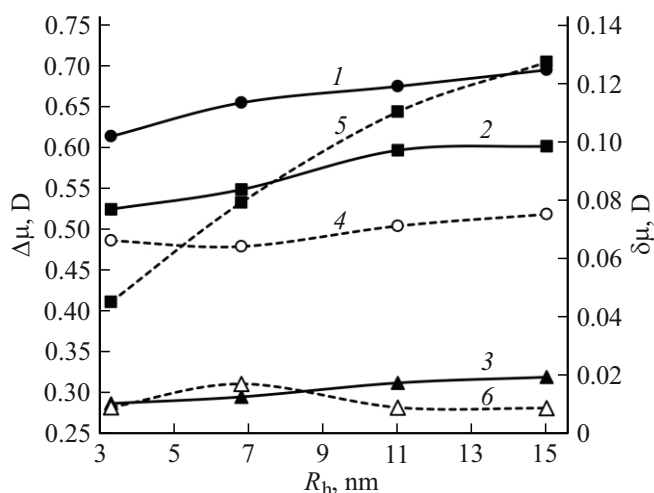


Рис. 5. Зависимости  $\Delta\mu$  (1–3) красителей с  $C = 3 \cdot 10^{-5}$  mol/l и изменение их дипольного момента  $\delta\mu$  (4–6) в смеси с BSA от  $R_h$  для Е (1, 4), ER (2, 5) и RB (3, 6).

нии:  $\Delta\mu = \mu_e - \mu_g$ , где  $\mu_e$  и  $\mu_g$  — дипольные моменты флуорофора в возбужденном и основном состояниях. Для определения таких изменений воспользуемся уравнением, предложенным Н.Г. Бахшиевым [22,23] в рамках метода, учитывающего сольватохромию, которое связывает  $\Delta\mu$  и  $\Delta\nu = \nu_g - \nu_e$ :

$$\Delta\mu = (\nu_g - \nu_e) \frac{hca^3}{2F}, \quad (1)$$

где

$$F = \frac{2n^2 + 1}{n^2 + 2} \left( \frac{\epsilon - 1}{\epsilon + 2} - \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right), \quad (2)$$

$h$  — постоянная Планка,  $c$  — скорость света,  $n$  — показатель преломления,  $\epsilon$  — диэлектрическая постоянная растворителя, радиус полости растворителя (радиус Онзагера), внутри которой находится флуорофор [24],

$$a = \left[ \frac{3M}{4\pi\rho N_A} \right]^{\frac{1}{3}}, \quad (3)$$

где  $N_A$  — число Авогадро,  $\rho$  — плотность,  $M$  — молекулярная масса МК.

Радиусы Онзагера, вычисленные с помощью (3), для исследованных красителей равны:  $a_E = 6.98 \text{ \AA}$ ,  $a_{ER} = 7.65 \text{ \AA}$ ,  $a_{RB} = 5.53 \text{ \AA}$ .

На рис. 5 представлены зависимости  $\Delta\mu$  исследованных красителей от  $R_h$  (кривые 1–3), определенные по формуле (1) из экспериментально полученных спектральных характеристик МК. Из рис. 5 видно, что между  $\Delta\mu$  и  $R_h$  наблюдается прямая зависимость. Причем изменения  $\Delta\mu$  наибольшие для Е (кривая 2) и минимальные для RB (кривая 3). На рис. 5 представлены также зависимости  $\delta\mu = \Delta\mu - \Delta\mu_{BSA}$  ( $\Delta\mu_{BSA}$  — разность дипольных моментов МК в возбужденном и основном состояниях в мицеллярных растворах белка и красителя,

$\Delta\mu$  — разность дипольных моментов МК в возбужденном и основном состояниях в мицеллярных растворах от  $R_h$  (кривые 4–6). Величина  $\delta\mu$  характеризует влияние взаимодействия „BSA + МК“ на изменение дипольных моментов в возбужденном и основном состояниях МК. Из рис. 5 видно, что в системе „BSA+МК“ происходит уменьшение разности  $\Delta\mu$  для всех исследованных красителей и размеров мицелл  $R_h$ . Наибольший „размерный“ эффект наблюдается для ER: при увеличении  $R_h$  от 3.3 до 15 nm изменение  $(\Delta\mu)_{BSA} \approx 0.08$  (рис. 5, кривая 5). При этом для E это изменение равно  $\approx 0.01$  (рис. 5, кривая 4), а для RB влияние взаимодействия „белок–МК“ на разность дипольных моментов  $\mu_e$  и  $\mu_g$  практически отсутствует (рис. 5, кривая 6).

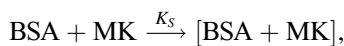
Как уже отмечалось выше, с ростом концентрации МК наблюдается тушение флуоресценции BSA. На рис. 6 в качестве примера представлены спектры флуоресценции BSA в смеси с ER разной концентрации для OM с  $R_h = 3.3$  nm.

Процессы межмолекулярного тушения флуоресценции могут быть как динамическими, так и статическими [25,26].

Статическое тушение может произойти, когда флуорофор и тушитель образуют нефлуоресцентные комплексы, оно не зависит от диффузии или столкновений молекул [26]. В случае статического тушения флуоресценции также существует линейная зависимость между снижением интенсивности флуоресценции и концентрацией тушителя.

Образование нелюминесцирующих комплексов (ассоциатов) сказывается на спектрах поглощения — добавление МК в растворы BSA увеличивает поглощение.

Оценим эффективность этого процесса. Равновесие для образования комплекса между BSA и МК описывается следующей схемой:



где  $K_S$  — константа связи комплекса, которая равна

$$K_S = \frac{\alpha}{(1 - \alpha)C_{МК}}, \quad (4)$$

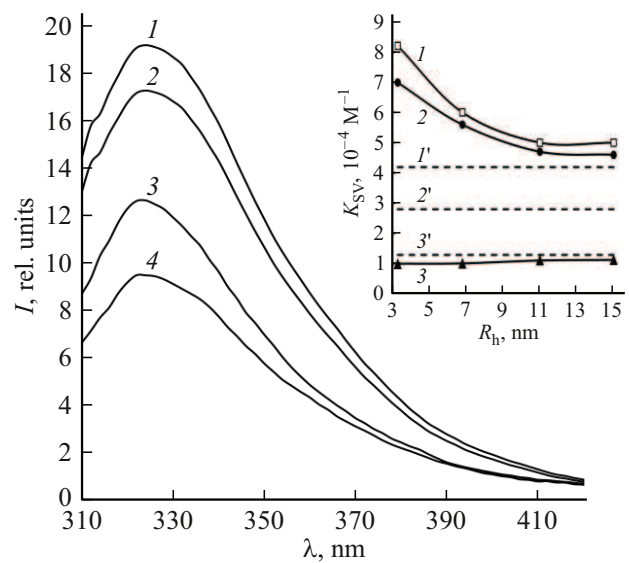
где  $\alpha$  — степень ассоциации.

Константу связи комплекса  $K_S$  рассчитывали с помощью уравнения Бенеша–Гильдебранда [27]:

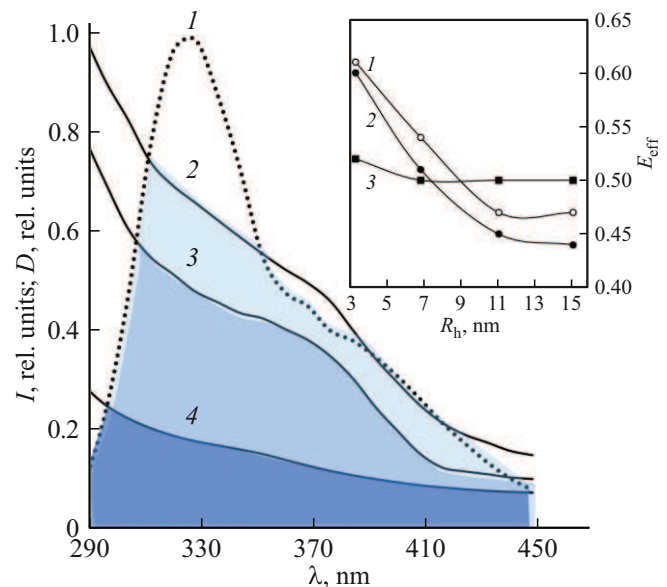
$$\frac{1}{D - D_0} = \frac{1}{D_c - D_0} + \frac{1}{K_S(D_c - D_0)C_{МК}}, \quad (5)$$

где  $D$  — оптическая плотность растворов BSA, содержащих МК различной концентрации в максимуме спектров поглощения,  $D_0$  — оптическая плотность растворов BSA,  $D_c$  — оптическая плотности комплекса „BSA+МК“.

Из (5) следует, что зависимость  $\frac{1}{D - D_0}$  от  $\frac{1}{C_{МК}}$  является линейной, при этом  $\frac{1}{K_S(D_c - D_0)}$  — коэффициент наклона прямой, а  $\frac{1}{D_c - D_0}$  — точка пересечения прямой с осью



**Рис. 6.** Спектры флуоресценции BSA в смеси с ER с концентрацией красителя  $10^{-5}$  (1),  $1.5 \cdot 10^{-5}$  (2),  $2.5 \cdot 10^{-5}$  (3) и  $3 \cdot 10^{-5}$  (4) mol/l. Гидродинамический радиус мицеллы равен 3.3 nm. Вставка: зависимости  $K_{SV}$  от радиусов обратных мицелл  $R_h$  для растворов BSA с E (1), ER (2) и RB (3). 1'–3' — значения  $K_{SV}$  для буферных растворов красителей: 1' — E, 2' — ER, 3' — RB.



**Рис. 7.** Нормированные спектры флуоресценции BSA (1) и поглощения МК: E (2), ER (3) и RB (4). Вставка: зависимости эффективности переноса энергии электронного возбуждения от BSA к E (1), ER (2) и RB (3) от гидродинамического радиуса мицеллы.

ординат. Из экспериментально полученных спектральных характеристик растворов, используя (5), методом наименьших квадратов были определены значения  $K_S$ . Результаты представлены в табл. 1.

**Таблица 1.** Значения константы  $K_S$  комплексов „BSA + МК“ для различных красителей в обратных мицеллах для разных  $R_h$  и водных растворах

$R_h, \text{nm}$	$K_S, \text{M}^{-1}$				Водный раствор
	3.3	6.8	11.0	15.0	
E	$350 \pm 52$	$357 \pm 54$	$434 \pm 65$	$526 \pm 75$	$1111 \pm 130$
ER	$351 \pm 52$	$357 \pm 53$	$384 \pm 58$	$416 \pm 62$	$1000 \pm 120$
RB	$165 \pm 25$	$169 \pm 25$	$17 \pm 33$	$384 \pm 58$	$588 \pm 70$

Из табл. 1 видно, во-первых, значения  $K_S$  комплексов в мицеллах с гидродинамическими радиусами от 3.3 до 15.0 nm меньше, чем в водных растворах. Во-вторых, значения  $K_S$  уменьшаются в ряду  $E \rightarrow ER \rightarrow RB$ , что обусловлено конформационными изменениями структуры молекул в этом ряду, связанными с перераспределением зарядов на атомах молекул [20].

Используя значения  $K_S$ , с помощью формулы (4) можно определить степени ассоциации для любых концентраций МК в растворах. Так, для исследованной области концентраций МК ( $C_{МК} = 10^{-5} - 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ ) и для наибольшего значения  $K_S = 526 \pm 75$  (E в мицелле с  $R_h = 15 \text{ nm}$ ) значение  $\alpha$  равно 0.015. То есть количество молекул E и МК, образующих комплексы в основном состоянии, незначительно. Следовательно, влияние образования таких комплексов на тушение флуоресценции BSA очень мало, и можно считать, что основной механизм тушения флуоресценции — динамический.

Согласно рекомендациям Международного союза теоретической и прикладной химии [28], динамическое тушение — это процесс, который препятствует испусканию из возбужденного состояния флуорофора после того, как возбужденное состояние сформировалось. Согласно этому определению, динамическое тушение флуоресценции обусловлено не только дезактивацией флуорофора в возбужденном состоянии при контакте или столкновении с другой молекулой (тушителем) в растворе, но и переносом энергии, переносом электронов и т.д.

Для установления эффективности такого тушения флуоресценции BSA были вычислены значения  $\frac{I_{BSA}}{I_{МК}^{BSA}}$  для BSA при разных концентрациях красителей  $C_{МК}$ . Здесь  $I_{BSA}$ ,  $I_{МК}^{BSA}$  — интенсивности флуоресценции в мицеллярных растворах и растворах смесей BSA и МК соответственно. Были построены зависимости  $\frac{I_{BSA}}{I_{МК}^{BSA}}$  от  $C_{МК}$ , описываемые уравнением Штерна–Фольмера [25]:

$$\frac{I_{BSA}}{I_{МК}^{BSA}} = 1 + K_{SV}C_{МК}, \quad (6)$$

где  $K_{SV}$  — константа Штерна–Фольмера.

Из экспериментально полученных значений интенсивности флуоресценции растворов, используя (6), методом наименьших квадратов были определены значения  $K_{SV}$ . На вставке к рис. 6 представлены зависимости  $K_{SV}$  ( $R_h$ )

**Таблица 2.** Значение интеграла перекрытия спектров флуоресценции BSA и МК

$J \times 10^{-16}, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{nm}^4$		
BSA–E	BSA–ER	BSA–RB
15.4	11.7	5.44

для исследованных красителей в растворах с белками и МК (кривые 1–3). На этом же рисунке представлены значения  $K_{SV}$  для буферных растворов этих красителей (кривые 1'–3'). Видно, что для E и ER константа тушения флуоресценции BSA МК в мицеллярных растворах больше, чем в буферных. При увеличении  $R_h$  для этих красителей наблюдается уменьшение  $K_{SV}$  (рис. 6, кривые 1, 2). Для BR константа тушения  $K_{SV}$  для всех  $R_h$  меньше, чем для E и ER, и при этом практически не зависит от  $R_h$  (вставка к рис. 6, кривая 3).

Из рис. 6 видно, что  $K_{SV}$  на два порядка больше, чем  $K_S$  (табл. 1). Связано это с тем, что молекулы BSA и МК заряжены отрицательно и находятся на расстояниях, недостаточных для образования комплекса. В результате при малых концентрациях МК ( $C_{МК} = 10^{-5} - 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ ) вероятность образования комплексов в основном состоянии мала.

Таким образом, основной механизм тушения флуоресценции — динамический, который обусловлен переносом энергии электронного возбуждения (ПЭЭВ), так как в исследованной системе маловероятны столкновения одноименно заряженных молекул BSA и МК. Для ПЭЭВ необходимо, чтобы расстояние между взаимодействующими молекулами было порядка 5–7 nm и существенное перекрытие спектров флуоресценции донора (BSA) и поглощения акцептора (МК). Эти два условия выполняются для исследованной системы: соответствующее расстояние обеспечивается локальным концентрированием молекул в мицелле, наблюдается перекрытие спектров флуоресценции BSA и поглощения МК. На рис. 7 представлены нормированные спектры флуоресценции BSA (кривая 1) и поглощения МК (кривые 2–4). Из рис. 7 видно, что наблюдается перекрытие спектров флуоресценции BSA и поглощения МК, причем величина этого перекрытия уменьшается в ряду  $E \rightarrow ER \rightarrow RB$ .

Определим интеграл перекрытия спектров флуоресценции BSA и поглощения МК по формуле [25]

$$J = \int_0^{\infty} f_D(\lambda) \varepsilon_A \lambda^4 d\lambda, \quad (7)$$

где  $f_D(\lambda)$  — спектр флуоресценции донора (BSA),  $\varepsilon_A(\lambda)$  — спектр поглощения акцептора (МК),  $\lambda$  — длина волны.

В табл. 2 представлены значения  $J$  для исследованных систем. Из табл. 2 видно, что наибольший интеграл перекрытия спектров наблюдается у E и наименьший у RB. Это указывает, что эффективность переноса энергии электронного возбуждения уменьшается в ряду E→ER→RB.

Для учета этого эффекта определим для различных концентраций МК относительный показатель эффективности  $E_{\text{ef}}$  переноса энергии электронного возбуждения между BSA и МК, равный [25]

$$E_{\text{ef}} = 1 - \frac{I_{\text{BSA}}^{\text{МК}}}{I_{\text{BSA}}}. \quad (8)$$

Полученные зависимости показателя  $E_{\text{ef}}$  для исследованных систем представлены на вставке к рис. 7.

Как следует из рис. 7, показатель  $E_{\text{ef}}$  уменьшается с увеличением  $R_h$  для всех красителей. При этом наименьшее изменение  $E_{\text{ef}}$  связанное с увеличением  $R_h$ , наблюдается для RB.

## Заключение

Экспериментально показано, что коэффициенты  $s_V$  динамического тушения флуоресценции BSA МК в мицеллах и буферных растворах различны. Для мицелл с гидродинамическим радиусом от 3.3 до 15.0 nm наибольшее значение  $K_{SV}$  зафиксировано для E и ER. При увеличении  $R_h$  величины  $K_{SV}$  для E и ER уменьшаются и при этом существенно отличаются от аналогичных коэффициентов в буферных растворах. Константы  $K_{SV}$  тушения флуоресценции белка молекулами RB практически не зависят от размера мицелл (в диапазоне  $R_h$  от 3.3 до 15.0 nm) и меньше констант тушения в буферных растворах.

Для МК пространственное ограничение в водных пулах мицелл сказывается на изменении дипольного момента МК при их возбуждении. Установлено, что с уменьшением размера мицеллы (при уменьшении  $R_h$ ) наблюдается уменьшение разности дипольных моментов в возбужденном и основном состояниях  $\Delta\mu$ . Причем изменения этой величины  $\Delta\mu$  наибольшие для E и минимальные для RB ( $\Delta\mu(R_h)$  практически не изменяется). В связи с тем, что представленный ряд флуорофоровых красителей характеризуется последовательным замещением атомов водорода атомами галогенов (бром, йод и хлор), изменения параметра  $\Delta\mu$  связаны с „эффектом внутреннего тяжелого атома“. Действительно, для

исследованных красителей константы интеркомбинационной конверсии равны: для E —  $0.042 \cdot 10^{10} \text{ s}^{-1}$ , для ER —  $0.85 \cdot 10^{10} \text{ s}^{-1}$ , для RB —  $1.0 \cdot 10^{10} \text{ s}^{-1}$  [29].

Полученные из экспериментальных данных зависимости коэффициента динамического тушения  $K_{SV}$  флуоресценции BSA МК отличаются в мицелле по сравнению с буферными растворами. Для E и ER  $K_{SV}$  больше для всей области исследованных их размеров. При увеличении  $R_h$  для E и ER наблюдается уменьшение  $K_{SV}$ , при этом значения констант тушения флуоресценции BSA не достигает своего значения в буферных растворах. При наличии RB в мицеллах  $K_{SV}$  белка в растворах практически не изменяется в зависимости от их размера и меньше значения констант тушения в буферных растворах.

Константа статического тушения  $K_S$  для комплексов в мицеллах на два порядка меньше, чем  $s_V$  в водных растворах. Значения  $K_S$  уменьшаются в ряду E→ER→RB.

Следовательно, основным механизмом тушения флуоресценции является динамический, обусловленный переносом энергии электронного возбуждения с BSA на МК. Эффективность переноса электронного возбуждения увеличивается с уменьшением  $R_h$ . При этом с уменьшением  $R_h$  увеличение эффективности переноса энергии электронного возбуждения отличается для различных МК: наименьшее для RB, наибольшее для E.

## Финансирование работы

Исследования выполнены в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## Список литературы

- [1] L. Wang, W. Zhang, Yu. Shao, D. Zhang, G. Guo, X. Wang. *Anal. Chim. Acta*, **1219**, 340012 (2022).
- [2] X.J. Guo, X.D. Sun, S.K. Xu. *J. Molec. Structure*, **931**, 55–59 (2009).
- [3] M. Makarska-Bialokoz. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **184**, 262–269 (2017).
- [4] Rodrigues dos Santos, G.G. Delgado, Thyerre Santana da Costa, L. Tasic. *BBA Advances*, **3**, 100091 (2023).
- [5] Д.С. Тарасов, М.П. Самцов, И.И. Хлудеев, Е.В. Малюшкова, И.В. Семак. *Журнал прикладной спектроскопии*, **89** (5), 605–613 (2022).
- [6] Е.С. Городничев, А.А. Кулешова, А.В. Быков, А.М. Салецкий. *Журнал прикладной спектроскопии*, **86** (5), 772–777 (2019).
- [7] A. Rahdar, M. Almasi-Kashi, A.M. Khan, M. Aliahmad, A. Salimi, M. Guettari, H.E.G. Kohne. *J. Molecular Liquids*, **252**, 506–513 (2018).
- [8] S.K. Dhillon, S.L. Porter, N. Rizk, Y. Sheng, Th. McKaig, K. Burnett, B. White, H. Nesbitt, R.N. Matin, A.P. McHale, B. Callan, J.F. Callan. *J. Med. Chem.*, **63**, 1328–1336 (2020).

- [9] A. Naranjo, A. Arboleda, J.D. Martinez, H. Durkee, C. Aguilar, N. Relhan, N. Nikpoor, A. Galor, S.R. Dubovy, R. Leblanc, H.W. Flynn, D. Miller, Jean-Marie Parel, G. Amescua. *Am. J. Ophthalmology*, **208**, 387–396 (2019).
- [10] K. Shitomi, H. Miyaji, S. Miyata, T. Sugaya, N. Ushijima, T. Akasaka, H. Kawasaki. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **30**, 101647 (2020).
- [11] С.Н. Летуа, С.Н. Пашкевич, А.Т. Ишемгулов, А.Н. Никиян. *Биофизика*, **65** (4), 705–712 (2020).
- [12] О.И. Волкова, А.А. Кулешова, Б.Н. Корватовский, А.М. Салецкий. *Опт. и спектр.*, **128**, 1842–1848 (2020).
- [13] A.V. Potapov, D.B. Alekseev, I.G. Alekseeva, A.M. Saletsky. *Laser Phys. Lett.*, **4**, 61–65 (2007).
- [14] E.S. Gorodnichev, A.A. Kuleshova, O.I. Volkova, A.M. Saletsky. *Laser Physics*, **31** (6), 065601 (2021).
- [15] Y. Feng, W. Liu, R. Mercadé-Prieto, X. Dong. *Chem. J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, **408**, 113092 (2021).
- [16] S. Salgın, U. Salgın, S. Bahadır. *Int. J. Electrochem. Sci.*, **7** (12), 12404-12414 (2012).
- [17] B. Jachimska, M. Wasilewska, Z. Adamczyk. *Langmuir*, **24**, 6866–6872 (2008).
- [18] P.L. Luisi, M. Giomirfi, M.P. Hleni, B.H. Robinson. *Biochimica et Biophysica Acta*, **947**, 209–246 (1988).
- [19] Y.Q. Wang, H.M. Zhang, G.C. Zhang, Q.H. Zhou, Z.H. Fei, Z.T. Liu, Z.X. Li. *J. Mol. Struct.*, **886** (1–3), 77–84 (2008).
- [20] Слюсарева Е.А. *Фотоника флуороновых красителей в гомогенных и гетерогенных биополимерных средах*. Диссертация на соискание ученой степени доктора физ.-мат. наук (Красноярск, 2014). С. 41–46.
- [21] А.С. Курьянова, Н.А. Аксенова, М.А. Савко, Н.Н. Глаголев, А.С. Дубовик, И.Г. Плащина, П.С. Тимашев, А.Б. Соловьева. *Журнал физ. химии*, **96** (5), 747–753 (2022).
- [22] Н.Г. Бахшиев. *Спектроскопия межмолекулярных взаимодействий* (Наука, Л., 1972). С. 98–145.
- [23] Н.Г. Бахшиев, М.И. Княжанский, В.И. Минкин, О.А. Осипов, Г.В. Сайдов. *Успехи химии*, **38** (9), 1644–1673 (1969).
- [24] P. Supran. *Chem. Phys. Lett.*, **94** (3), 272–275 (1983).
- [25] Дж. Лакович. *Основы флуоресцентной спектроскопии* (Мир, М., 1986). С. 262–344.
- [26] Л.В. Левшин, А.М. Салецкий. *Люминесценция и ее измерения. Молекулярная люминесценция* (Изд.-во МГУ, М., 1989). С. 143–155.
- [27] W. Misiuk, M. Jozefowicz. *J. Molecular Liquids*, **202**, 101–106 (2015).
- [28] S.E. Braslavsky. *Pure Appl. Chem.*, **79** (3), 293–465 (2007).
- [29] O. Berndt, F. Bandt, I. Eichwurz, H. Stiel. *Acta Phys. Polonica A*, **95** (2), 207–220 (1999).