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 (E), 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 → ER → 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 альбуминами 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 (E), эритрозина (ER), бенгальского розового (RB) и их смесей в условиях пространственного ограничения в обратных мицеллах натрий 1,4-бис (2-этилгексил) сульсукцината (AOT).

Эксперимент

Водно-мицеллярные растворы красителей и белка приготавливались по методике, описанной в [12]. Для приготовления исследуемых растворов применялись AOT, 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 $\omega = \frac{[H_2O]}{[AOT]}$ ([AOT] 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 (σ), 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

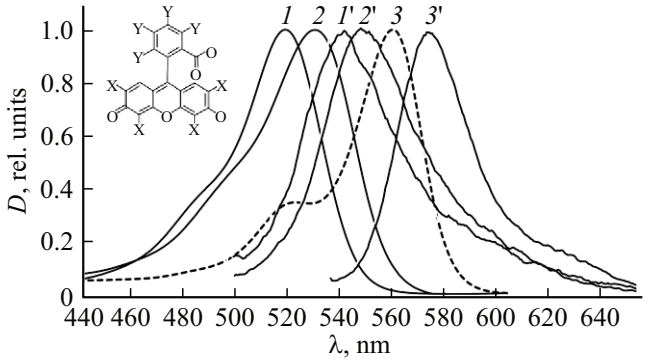


Рис. 1. Спектры поглощения (*1–3*) и флуоресценции (*1′–3′*) красителей: E (*1*, *1′*), ER (*2*, *2′*), RB (*3*, *3′*) в водно-мицеллярных растворах с $R_h = 11.0$ nm. На вставке — структурные формулы МК: E (X=Br и Y=H), ER (X=I и Y–H), RB (X=I и Y=Cl).

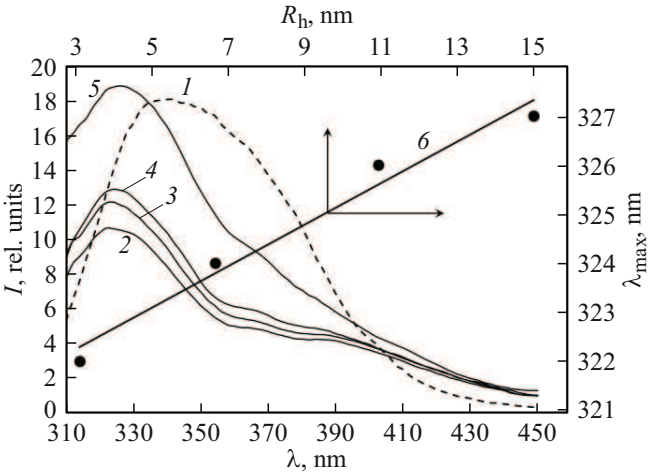


Рис. 2. Спектры флуоресценции растворов BSA концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l в воде (*1*) и в обратных мицеллах (OM) с различными R_h: 3.3 (*2*), 6.8 (*3*), 11 (*4*) и 15 nm (*5*). Зависимость положения максимума интенсивности флуоресценции спектра BSA λ_{max} от R_h (*6*).

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), фенилаламин (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 Tyr 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 AOT являются анионными. Исследовались растворы с pH 6. При таком значении pH заряд BSA является отрицательным [16]. При рассмотрении взаимодействия белок–обратная мицелла важное значение играет размер белка. В наших экспериментах при pH 6 гидродинамический радиус $R_{\mathrm{h}} = 3.4\,\mathrm{nm}$ [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 $R_{\mathrm{h}} = 3.3\,\mathrm{nm}$ и наименьшему для $R_{\mathrm{h}} = 15.0$ nm. Для описания спектров флуоресценции BSA в обратных мицеллах возможно привлечение несколько моделей солюбилизации 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 AOT. При $R_h = 3.3\,\mathrm{nm}$ 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 $R_{\mathrm{h}} = 6.8\,\mathrm{nm}$), молекулы локализуются за счет электростатического взаимодействия (молекулы BSA и AOT 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 *6*), обусловленный увеличением гидрофильных взаимодействий между белком и внутримицеллярной водой за счет уменьшения электростатических взаимодействий между молекулами BSA и заряженными головками AOT. При этом положение максимума спектра флуоресценции BSA не достигает своего положения для водного раствора.

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

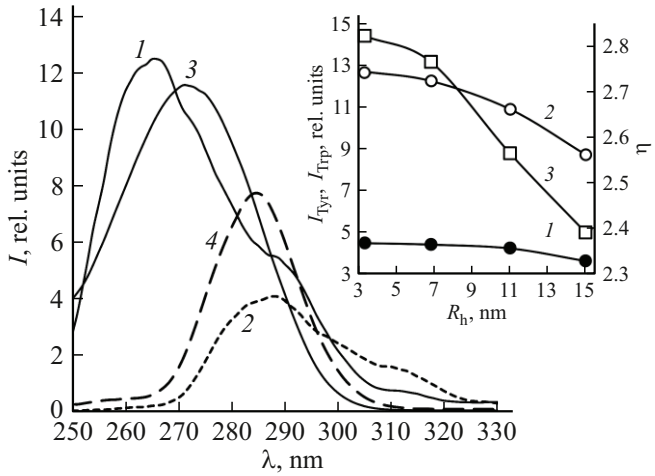


Рис. 3. Синхронные спектры флуоресценции BSA в обратных мицеллах с $R_{\mathrm{h}} = 3.3\,\mathrm{nm}$ (*1, 2*) и в водных растворах (*3, 4*) для $\delta\lambda = 60$ (*1, 3*) и $\delta\lambda = 15\,\mathrm{nm}$ (*2, 4*). Концентрация BSA равна $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Вставка: зависимости интенсивности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

в результате сканирования по длинам волн возбуждения ($\lambda_{\mathrm{возб}}$) и излучения ($\lambda_{\mathrm{изл}}$) при постоянной разности $\delta\lambda = \lambda_{\mathrm{изл}} - \lambda_{\mathrm{возб}}$ (оба монохроматора спектрофлуориметра сканируются одновременно). Исследования проводились при двух значениях разности длин волн регистрации и возбуждения флуоресценции BSA $\delta\lambda$: 15 nm (спектр свечения Tyr) и 60 nm (спектр свечения Trp) [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 250–350 nm. На рис. 3 в качестве примера представлены синхронные спектры мицеллярных с $R_{\mathrm{h}} = 3.3\,\mathrm{nm}$ (кривые *1, 2* и водных (*3, 4*) растворов BSA для $\delta\lambda = 60$ (кривые *1, 3*) и $\delta\lambda = 15\,\mathrm{nm}$ (кривые *2, 4*).

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

Введение галогензамещенных флуоресцеина в мицеллы AOT, 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 ν_g, ν_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 ($(\Delta\nu)_{\mathrm{BSA}} = \Delta\nu - \Delta\nu_{\mathrm{BSA}}$, $\Delta\nu_{\mathrm{BSA}}$ — 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 $\Delta\nu_{\mathrm{BSA}}$ от R_{h} для исследованных красителей при концентрации красителей $C = 3 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Величина $\Delta\nu_{\mathrm{BSA}}$ 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 $(\Delta\nu)_{\mathrm{BSA}}$ практически не изменяется (кривая *3*). Это указывает на слабое взаимодействие БР и BSA. Для E 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 $(\Delta\nu)_{\mathrm{BSA}}$.

Влияние R_{h} мицелл на $\Delta\nu$ МК может быть обусловлено изменением их дипольных моментов при возбуждении: $\Delta\mu = \mu_e - \mu_g$, где μ_e и μ_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 $\Delta\nu = \nu_g - \nu_e$:

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

где

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

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

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

где N_A — число Авогадро, ρ — плотность, M — молекулярная масса МК.

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

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 E (кривая *2*) и минимальные для RB (кривая *3*). На рис. 5 представлены также зависимости $\delta\mu = \Delta\mu - \Delta\mu_{\mathrm{BSA}}$ ($\Delta\mu_{\mathrm{BSA}}$ — разность дипольных моментов МК в возбужденном и основном состояниях в мицеллярных растворах белка и красителя,

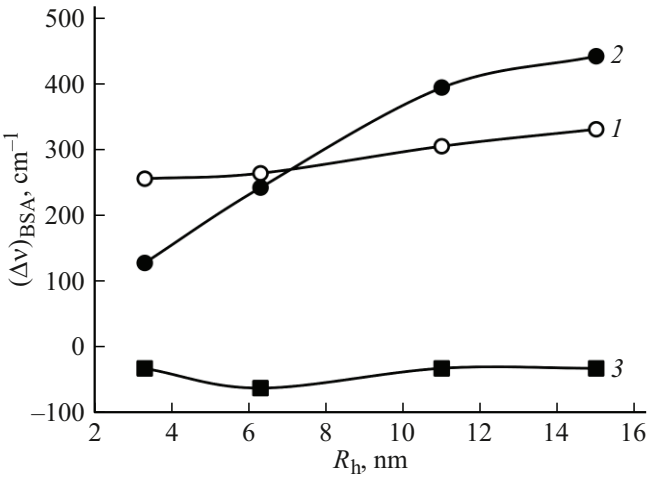


Рис. 4. Зависимости изменения стоксовых сдвигов спектров красителей с концентрацией $C = 3 \cdot 10^{-5}$ mol/l в смеси с BSA от R_{h} для E (*1*), ER (*2*) и RB (*3*).

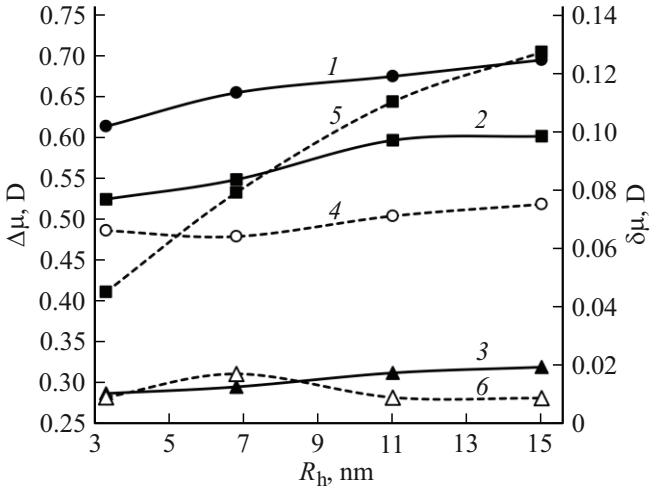


Рис. 5. Зависимости $\Delta\mu$ (*1–3*) красителей с $C = 3 \cdot 10^{-5}$ mol/l и изменение их дипольного момента $\delta\mu$ (*4–6*) в смеси с BSA от R_{h} для E (*1, 4*), ER (*2, 5*) и RB (*3, 6*).

$\Delta\mu$ — 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 ≈ 0.01 (рис. 5, кривая *4*), а для RB влияние взаимодействия „белок–МК“ на разность дипольных моментов μ_e и μ_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 ОМ 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 концентрации тушителя.

Образование нелюминесцируюших 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:

$$\mathrm{BSA} + \mathrm{MK} \xrightarrow{K_S} [\mathrm{BSA} + \mathrm{MK}],$$

где K_S — константа связи комплекса, которая равна

$$K_S = \frac{\alpha}{(1-\alpha)C_{\mathrm{MK}}}, \qquad (4)$$

где α — степень ассоциации.

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

$$\frac{1}{D-D_0} = \frac{1}{D_c-D_0} + \frac{1}{K_S(D_C-D_0)C_{\mathrm{MK}}}, \qquad (5)$$

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 $\frac{1}{C_{\mathrm{MK}}}$ 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 ординат. Из экспериментально полученных спектральных характеристик растворов, используя (5), методом наименьших квадратом были определены значения K_S. Результаты представлены в табл. 1.

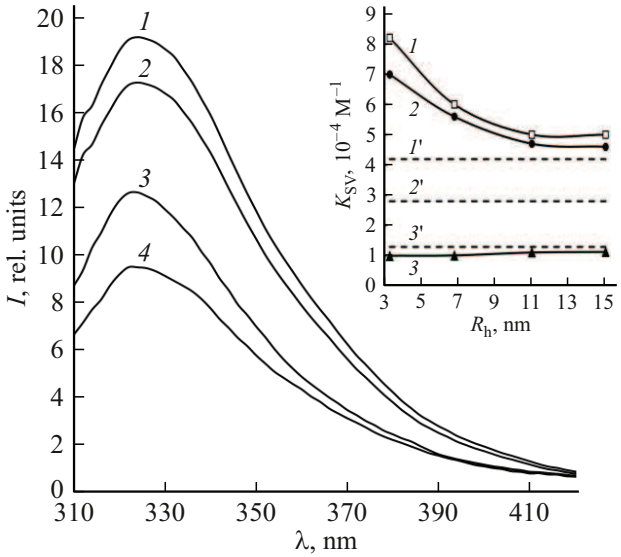


Рис. 6. Спектры флуоресценции BSA в смеси с ER с концентрацией красителя 10^{-5} (*1*), $1.5 \cdot 10^{-5}$ (*2*), $2.5 \cdot 10^{-5}$ (*3*) и $3 \cdot 10^{-5}$ (*4*) mol/l. Гидродинамический радиус мицеллы равен 3.3 nm. Вставка: зависимости K_{SV} от радиусов обратных мицелл R_h для растворов BSA с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

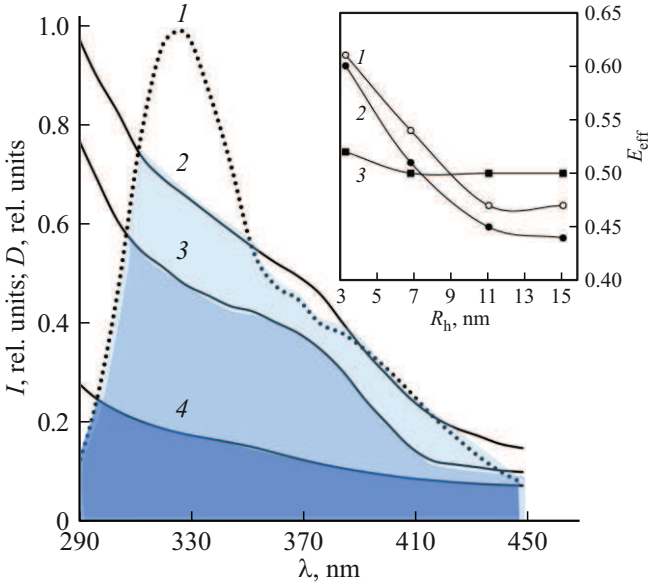


Рис. 7. Нормированные спектры флуоресценции BSA (*1*) и поглощения МК: E (*2*), ER (*3*) и RB (*4*). Вставка: зависимости эффективности переноса энергии электронного возбуждения от BSA к E (*1*), ER (*2*) и RB (*3*) от гидродинамического радиуса мицеллы.

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

K_S, M^{-1}					
R_h, nm	3.3	6.8	11.0	15.0	Водный раствор
E	350±52	357±54	434 ± 65	526 ± 75	1111 ± 130
ER	351 ± 52	357 ± 53	384 ± 58	416 ± 62	1000 ± 120
RB	165 ± 25	169 ± 25	17 ± 33	384 ± 58	588 ± 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 → ER → 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 ($C_{MK} = 10^{-5}-3\cdot10^{-5}$ mol/l) и для наибольшего значения $K_S = 526 \pm 75$ (E в мицелле с $R_h = 15$ nm) значение α 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 $\frac{I_{BSA}}{I^{MK}_{BSA}}$ для BSA при разных концентрациях красителей C_{MK}. Здесь I_{BSA}, I^{MK}_{BSA} — интенсивности флуоресценции в мицеллярных растворах и растворах смесей BSA и МК соответственно. Были построены зависимости $\frac{I_{BSA}}{I^{MK}_{BSA}}$ от C_{MK}, описываемые уравнением Штерна–Фольмера [25]:

$$\frac{I_{BSA}}{I^{MK}_{BSA}} = 1 + K_{SV}C_{MK}, \qquad (6)$$

где K_{SV} — константа Штерна–Фольмера.

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

Таблица 2. Значение интеграла перекрытия спектров флуоресценции BSA и МК

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

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 ($C_{MK} = 10^{-5}-3\cdot10^{-5}$ 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→ER→RB.

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

$$J = \int_0^\infty f_{\mathrm{D}}(\lambda)\varepsilon_A\lambda^4 d\lambda, \qquad (7)$$

где $f_{\mathrm{D}}(\lambda)$ — спектр флуоресценции донора (BSA), $\varepsilon_{\mathrm{A}}(\lambda)$ — спектр поглощения акцептора (МК), λ — 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_{eff} переноса энергии электронного возбуждения между BSA и МК, равный [25]

$$E_{\mathrm{ef}} = 1 - \frac{I_{\mathrm{BSA}}^{\mathrm{MK}}}{I_{\mathrm{BSA}}}. \qquad (8)$$

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

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

Заключение

Экспериментально показано, что коэффициенты $_{\mathrm{SV}}$ 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 ($\Delta\mu(R_{\mathrm{h}})$ 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 — $0.042 \cdot 10^{10}\,\mathrm{s}^{-1}$, для ER — $0.85 \cdot 10^{10}\,\mathrm{s}^{-1}$, для RB — $1.0 \cdot 10^{10}\,\mathrm{s}^{-1}$ [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 $_{\mathrm{SV}}$ 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. Летута, 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. Suppan. 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. Eichwurzel, H. Stiel. Acta Phys. Polonica A, **95** (2), 207–220 (1999).