

Анализ влияния флуоресцентных красителей на комплексообразование азотсодержащих аминокислот

© Е.В. Назарьев, И.Л. Пластун

Саратовский государственный технический университет имени Ю.А. Гагарина,
Саратов, Россия

e-mail: agexxxecute@gmail.com

Поступила в редакцию 26.11.2025 г.

В окончательной редакции 26.01.2026 г.

Принята к публикации 27.03.2026 г.

Одним из значимых направлений в современной фармакологии является создание лекарственных препаратов на основе биосовместимых белковых структур и таргетная терапия на основе белковых капсул доставки. Критически важной задачей в этом контексте является отслеживание транспорта белкового комплекса по организму *in vivo*. В представленной статье рассматриваются квантово-химические механизмы взаимодействия белковых структур в процессе диагностики их транспорта с использованием флуоресцентных красителей. При этом важно, чтобы присутствие красителя не ослабляло взаимодействия между белковыми составляющими лекарственного препарата и белком-мишенью. Поскольку взаимодействие белковых структур определяется контактами между аминокислотными остатками, цель данного исследования — оценить влияние флуоресцентных красителей на комплексообразование между азотсодержащими аминокислотами, которые в этом взаимодействии играют ключевую роль. Результаты показали, что флуоресцентные красители могут по-разному влиять на нековалентное взаимодействие белковых структур: флуоресцеин и индигокармин не ослабляют, а существенно усиливают межмолекулярное взаимодействие как для основных, так и для нейтральных аминокислот, а метиленовый синий продемонстрировал противоположный эффект, ослабив связь в паре основных аминокислот, хотя и усилил взаимодействие нейтральных. Таким образом, в ходе применения флуоресцентных красителей для диагностики транспорта вещества *in vivo* в белковых структурах, основанных на нековалентном взаимодействии, необходимо учитывать особенности взаимодействия каждого конкретного красителя с учетом полярности.

Ключевые слова: теория функционала плотности, молекулярные структуры, ИК-спектры, водородные связи, аминокислоты, красители, нековалентное взаимодействие.

DOI: 10.61011/OS.2026.06.63413.68-25

Введение

Взаимодействие между клеточными белковыми структурами живого организма происходит, по большей части, за счет комплекса нековалентных сил, включая водородные связи, электростатические взаимодействия и гидрофобные эффекты, которые определяют специфичность и стабильность комплексов белок-белок и белок-пептид. Более того, даже короткие пептидные фрагменты способны образовывать плотные сети водородных связей с белковой поверхностью, что делает их важными элементами регуляции клеточных путей, включая модуляцию активности белковых ансамблей при сигналинге или сборке мультипротеиновых комплексов [1].

Аминокислоты, являющиеся „строительными блоками“ белковых структур, соединяются между собой пептидными связями — это ковалентная амидная связь, которая формируется между α -аминогруппой ($-\text{NH}_2$) одной аминокислоты и α -карбоксильной группой ($-\text{COOH}$) другой с выделением молекулы воды в результате реакции конденсации. Механизм образования пептидной связи, которая лежит в основе построения первичной структуры белков, в биосинтетическом контексте осуществляется на рибосоме — огромном рибонуклеопротеиновом комплексе, где химическая реакция соединения аминокислот карбоксильной группой одной и аминогруппой

другой осуществляется неэнзиматически, но в сильно ориентированном и стабилизирующем окружении большого субстрата из рРНК и белков. Последовательное присоединение аминокислот, таким образом, приводит к образованию дипептидов, трипептидов и далее длинных полипептидных цепей, которые составляют первичную структуру белков. Сами аминокислоты в этой цепи называются остатками аминокислот. В живых организмах образование пептидной связи во время трансляции на рибосоме осуществляется через посредничество активных тРНК и каталитической активности рибосомного пептидилтрансферазного центра, где энергия для реакции затрачивается на предварительное активирование аминокислот (например, в виде аминокоацил-тРНК) [2].

Аминокислоты различаются по своим кислотно-основным свойствам и полярности [3]. Чем ярче выражены основные и полярные свойства аминокислоты, тем она активнее в комплексообразовании. С уменьшением полярности и основных свойств межмолекулярное взаимодействие аминокислот также ослабевает.

Значимую роль в современной фармакологии играет взаимодействие белковых структур. Достаточно важной проблемой является диагностика транспорта вещества

по организму *in vivo* [4]. Для такой диагностики белковую структуру можно обогатить высокофлуоресцентным веществом. Однако необходимо убедиться, что присутствие такого вещества не ослабляет взаимодействие между белковыми структурами рецептора и лиганда, так как это исказит реальную картину и может привести к ошибочным выводам.

Таким образом, целью работы является оценка влияния флуоресцентных красителей на комплексообразование основных и нейтральных аминокислот: аргинина, лизина, глутамина и аспарагина на основе расчета ИК-спектров и молекулярных структур с последующим анализом водородных связей как основного показателя комплексообразования. В качестве исследуемых красителей будем рассматривать флуоресцеин, индигокармин и метиленовый синий.

1. Объекты исследования и моделирование

Основными аминокислотами, выбранными для исследования, были аргинин и лизин, а нейтральными — аспарагин и глутамин. Полярность аргинина и лизина значительно выше, чем у аспарагина и глутамина, поэтому ожидается, что уровень взаимодействия основных аминокислот будет выше, чем нейтральных.

В зависимости от pH среды структуры основных аминокислот (лизина и аргинина) могут принимать различную ионную форму. Подробное исследование влияния биполярной группы и аминокислотного остатка на колебательные ИК-спектры основных аминокислот в водном растворе было проведено в [5,6]. В результате сравнения рассчитанных и экспериментальных ИК-спектров поглощения было обнаружено, что большое влияние на взаимодействие этих аминокислот имеет нековалентное взаимодействие на основе водородного связывания, что было показано в работах [5,6].

Как было сказано, в классификации кислотно-основных свойств аргинин и лизин относятся к группе основных аминокислот. Их полярность по шкале Грантэма составляет +20 и +15 соответственно. Эта шкала показывает, насколько сильно боковая цепь аминокислоты „предпочитает“ взаимодействовать с полярной средой, а не с неполярной. Их боковые цепи полностью протонированы в нейтральной области pH. Лизин способствует регенерации тканей и здоровью опорно-двигательного аппарата. Это незаменимая аминокислота, т.е. она не синтезируется в организме человека. Аргинин вырабатывается в организме в ограниченных количествах, поэтому относится к группе условно незаменимых. Его основная функция — стимуляция выработки оксида азота, который способствует улучшению кровотока, расширению сосудов и повышению их эластичности. Кроме того, аргинин участвует в восстановлении тканей, укреплении иммунитета и поддержании функции почек.

Глутамин и аспарагин относятся к группе нейтральных аминокислот. Их полярность по шкале Грантэма составляет +9.4 и +9.7. Хотя их амидные группы не ионогенны, эти молекулы обладают довольно высокой полярностью. Обе аминокислоты синтезируются в организме. Аспарагин важен для N-гликозилирования, метаболизма, детоксикации, роста и развития. Лизин играет роль в энергетическом обмене, синтезе нуклеотидов, синтезе глутамата, регуляции pH, поддержании работы кишечника, антиоксидантной защите и метаболизме мышц. Также обе кислоты поддерживают иммунную систему и участвуют в транспорте азота.

Раствор флуоресцеина широко применяется в медицине для диагностических целей. Индигокармин широко используется в диагностике и хирургии [7]. Метилтиониния хлорид, формально известный как метиленовый синий, применяется в биологии, химии и медицине, например, для скрининга некоторых опухолей желудочно-кишечного тракта.

Влияние растворителя на флуоресценцию метиленового синего носит в первую очередь опосредованный характер и реализуется через изменение агрегатного состояния красителя. В водной среде метиленовый синий существует в виде равновесной смеси мономеров и различных агрегатов (димеров, тримеров, тетрамеров), причем увеличение концентрации, ионной силы и изменение температуры смещают равновесие в сторону агрегированных форм. Эти агрегаты обладают отличными от мономера электронными спектрами и, как правило, характеризуются эффективным подавлением флуоресценции вследствие усиленных нерадиационных каналов релаксации и самоквенчинга. В воде, где агрегация выражена наиболее сильно, флуоресценция существенно ослаблена, тогда как изменение свойств растворителя (например, за счет добавок, снижающих агрегацию) должно приводить к увеличению вклада мономерной формы и соответственно к усилению флуоресцентного сигнала [8,9].

Молекулярное моделирование комплексообразования аминокислот, включая расчет структур и ИК-спектров молекул и их комплексов, проводилось на основе метода теории функционала плотности (ТФП) [10] с использованием функционала B3LYP и базисного набора 6-31G(d) [11] в программном пакете Gaussian [12]. Для визуализации молекулярных структур использовались программы Avogadro и GaussView. Были рассчитаны молекулярные структуры и ИК-спектры пар основных (аргинин (A), лизин (L)) и нейтральных (аспарагин (AS), глутамин (G)) аминокислот, а также их тройных комплексов с тремя красителями: флуоресцеином (F), индигокармином (IC) и метиленовым синим (MB). Анализ параметров водородных связей (длины, энергии, частотные сдвиги, интенсивность) использовался в качестве основного показателя силы взаимодействия.

Для учета влияния ангармонизма в работе выполнено масштабирование частот. На основе сравнения расчетных ИК-спектров с экспериментальными данными были

Таблица 1. Классификация водородных связей

Категория	Энергия связи, ΔH , kcal/mol	Длина водородного мостика, R_b , Å
Слабые	< 2.87	3.2–4.0
Средние	3.82–14.43	2.5–3.2
Сильные	14.34–28.65	2.2–2.5

Таблица 2. Условия снятия экспериментальных спектров

Вещество	Условия снятия спектра
Флуоресцеин (F)	Раствор в D ₂ O с добавлением NaOD
Индигокармин (IC)	Раствор в DMSO-d ₂
Метиленовый синий (MB)	ATR-ИК-спектр пленки из раствора в CHCl ₃
Аргинин (A)	Раствор в D ₂ O с добавлением NaOD
Лизин (L)	Раствор в D ₂ O с добавлением NaOD
Глутамин (G)	Раствор в D ₂ O с добавлением NaOD
Аспарагин (AS)	ATR-ИК-спектр твердого вещества без растворителя

выведены и использованы следующие масштабные коэффициенты: 0.987 (диапазон 0–1000 cm⁻¹), 0.961 (диапазон 1000–2000 cm⁻¹), 0.948 (диапазон выше 2000 cm⁻¹). Эти диапазоны выбраны на основании того, что влияние ангармонизма в низкочастотной области спектра минимально, так как этот диапазон соответствует колебаниям центра молекулы. В диапазоне 1000–2000 cm⁻¹ отклонение увеличивается. Максимальное отклонение наблюдается на периферии молекулы (выше 2000 cm⁻¹), что видно на спектрах.

Степень комплексообразования исследовалась путем анализа параметров водородных связей. Энергия водородных связей рассчитывалась с использованием программного обеспечения Gaussian и эмпирической формулы Иогансена [9]

$$-\Delta H = 0.3\sqrt{\Delta\nu - 40},$$

$\Delta\nu$ — сдвиг частоты для валентных колебаний связей.

Водородные связи оценивались согласно классификации, приведенной в [10] (табл. 1).

2. Результаты и их обсуждение

В ходе исследования были рассчитаны структуры и ИК-спектры исследуемых красителей и аминокислот. Они сравнивались с экспериментальными спектрами [15–21]. Спектры растворов регистрировали в дейтерированной воде (D₂O) или дейтерированном диметилсульфоксиде (DMSO-d₆), при необходимости с добавлением дейтерированного гидроксида натрия (NaOD). ATR-ИК-спектры получали без растворителя, анализируя твердый образец или пленку, сформированную после испарения хлороформа (CHCl₃). Условия снятия экспериментальных спектров приведены в табл. 2.

Результаты представлены на рис. 1, 2. Группы N-H и O-H, которые являются потенциальными точками образования водородных связей, и соответствующие им спектральные пики обозначены цифрами.

Далее были рассчитаны комплексы пар аминокислот: аргинин-лизин и аспарагин-глутамин (рис. 3). Между молекулами образуются водородные связи (обозначены цифрами). Колебания водородных связей в комплексе аргинин-лизин проявляются на частоте 3170 cm⁻¹, а в комплексе аспарагин-глутамин — 3347 cm⁻¹. Энергия связи составляет 3.5 и 1.2 kcal/mol соответственно.

Как и ожидалось, основные аминокислоты взаимодействуют друг с другом значительно сильнее, чем нейтральные. После добавления флуоресцентных красителей к комплексам аминокислот мы обращали внимание на параметры этих связей, чтобы определить влияние красителя на комплексообразование.

К каждому из полученных комплексов поочередно добавляли молекулы флуоресцентных красителей. В тройных комплексах оценивались параметры водородных связей между аминокислотами, образованными в двойных комплексах. Для начала рассмотрим молекулярные комплексы, полученные в результате добавления красителей к паре аминокислот аргинин-лизин (рис. 4, 5).

Как видно из табл. 3, в присутствии флуоресцеина и индигокармина водородные связи между аминокислотами не только не ослабли, но даже усилились. Энергия связи возросла до 4.7 и 4.5 kcal/mol соответственно, а ее интенсивность увеличилась до 897 и 628 km/mol. Параметры водородных связей, образовавшихся между аминокислотой и красителем, приведены в табл. 5.

В случае метиленового синего степень комплексообразования стала ниже, чем в двойном комплексе. Энергия связи снизилась до 2.9 kcal/mol.

Следующим шагом стало добавление красителей к комплексу аспарагин-глутамин аналогичным образом (рис. 6, 7).

Как следует из данных табл. 4, во всех исследуемых случаях добавление красителя приводило к усилению взаимодействия между аминокислотами. Параметры водородных связей, образовавшихся между аминокислотой и красителем, приведены в табл. 5.

Результаты, представленные в табл. 3, показывают, что добавление флуоресцеина и индигокармина привело к уменьшению длины водородной связи и водородного мостика, при этом частотный сдвиг, энергия связи и ее интенсивность увеличились. Это указывает на то, что в присутствии этих красителей степень комплексообразования не только не ослабла, но и стала выше. В случае метиленового синего, напротив, взаимодействие между аминокислотами ослабло.

Результаты моделирования комплекса нейтральных аминокислот, представленные в табл. 4, показывают, что во всех случаях длина связи и водородного мостика уменьшились, а сдвиг частоты, энергия и интенсивность связи увеличились, что свидетельствует об усилении взаимодействия между молекулами.

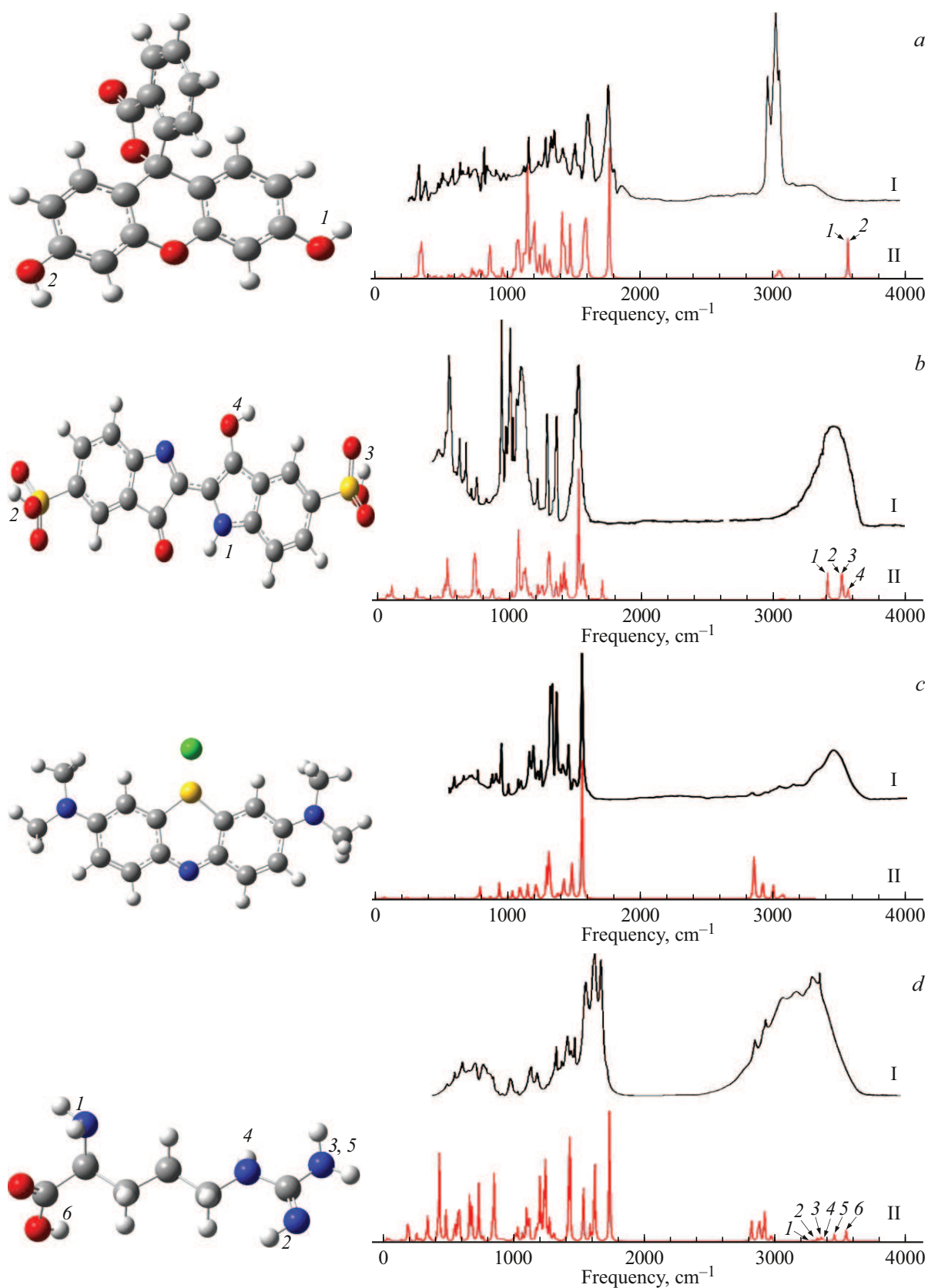


Рис. 1. Рассчитанные структуры молекул флуоресцеина (a), индигокармина (b), метиленового синего (c) и аргинина (d), их экспериментальные (I) и рассчитанные (II) ИК-спектры. Цифрами обозначены потенциальные точки для образования водородных связей и соответствующие им спектральные пики.

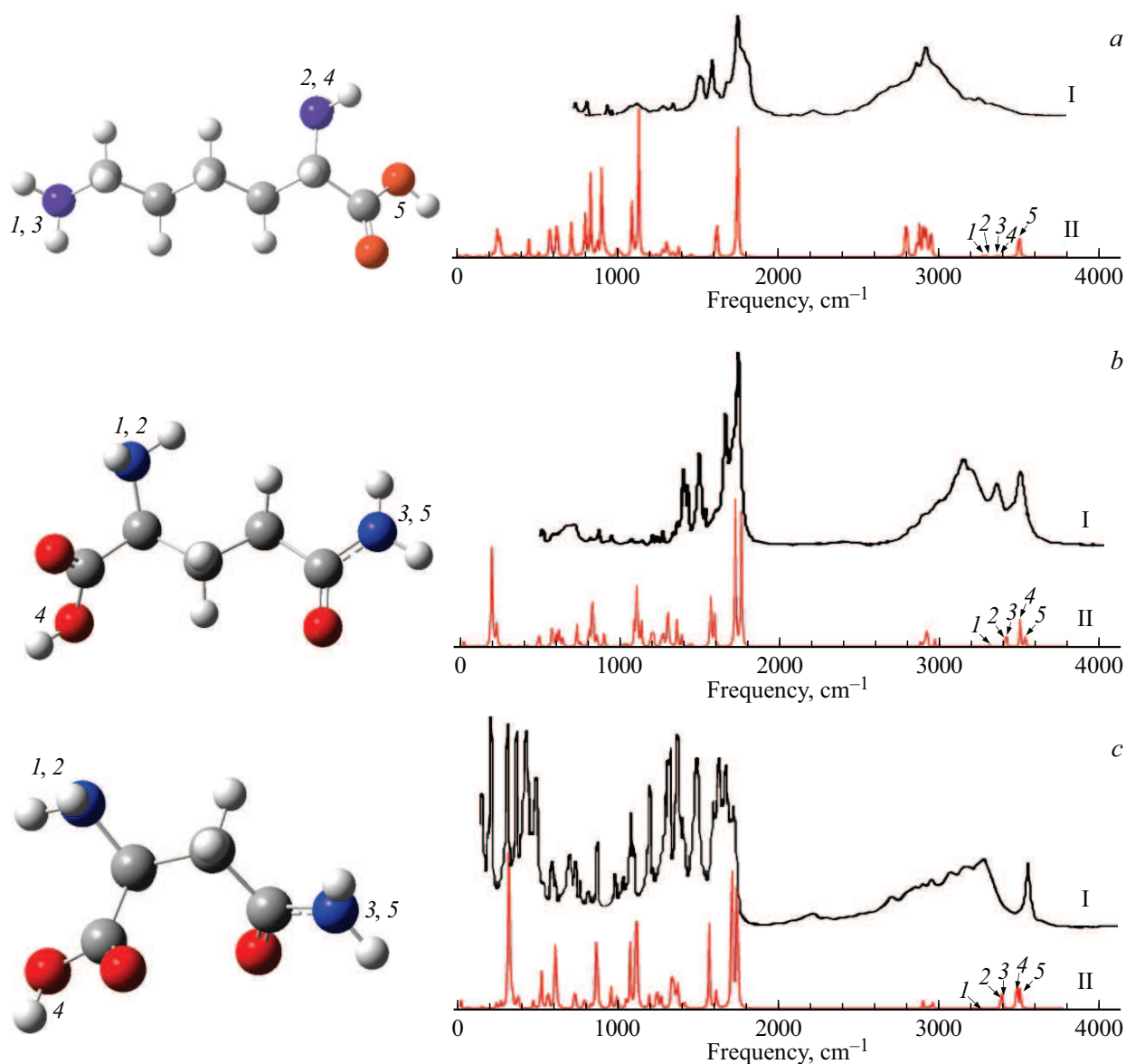


Рис. 2. Рассчитанные структуры молекул лизина (а), глутамина (b) и аспарагина (с), их экспериментальны (I) и рассчитанные (II) ИК-спектры. Цифрами обозначены потенциальные точки для образования водородных связей и соответствующие им спектральные пики.

Таблица 3. Взаимодействие основных аминокислот

Комплекс	Тип связи	Длина R , Å	Длина Н-связи водородного мостика R_b , Å	Частота ν , cm^{-1}	Частотный сдвиг $\Delta\nu$, cm^{-1}	Энергия связи ΔH , kcal/mol	Интенсивность I_{IR} , km/mol
A+L	N-H...N	2.04	3.07	3170	179	3.5	349
A+L+F(1)	N-H...N	1.96	2.99	3065	284	4.7	897
A+L+IC(1)	N-H...N	1.97	3.00	3088	261	4.5	628
A+L+MB(1)	N-H...N	2.07	3.09	3217	132	2.9	918

Исследование по влиянию растворителя на флуоресценцию метиленового синего подтверждает, что растворитель кардинально меняет его спектральные свойства. В полярных средах (вода, спирт) метиленовый

синий часто тускнеет (тушится), а в менее полярных или протонных средах может демонстрировать более яркую флуоресценцию, так как растворитель влияет на структуру красителя, его агрегацию и взаимодействие с

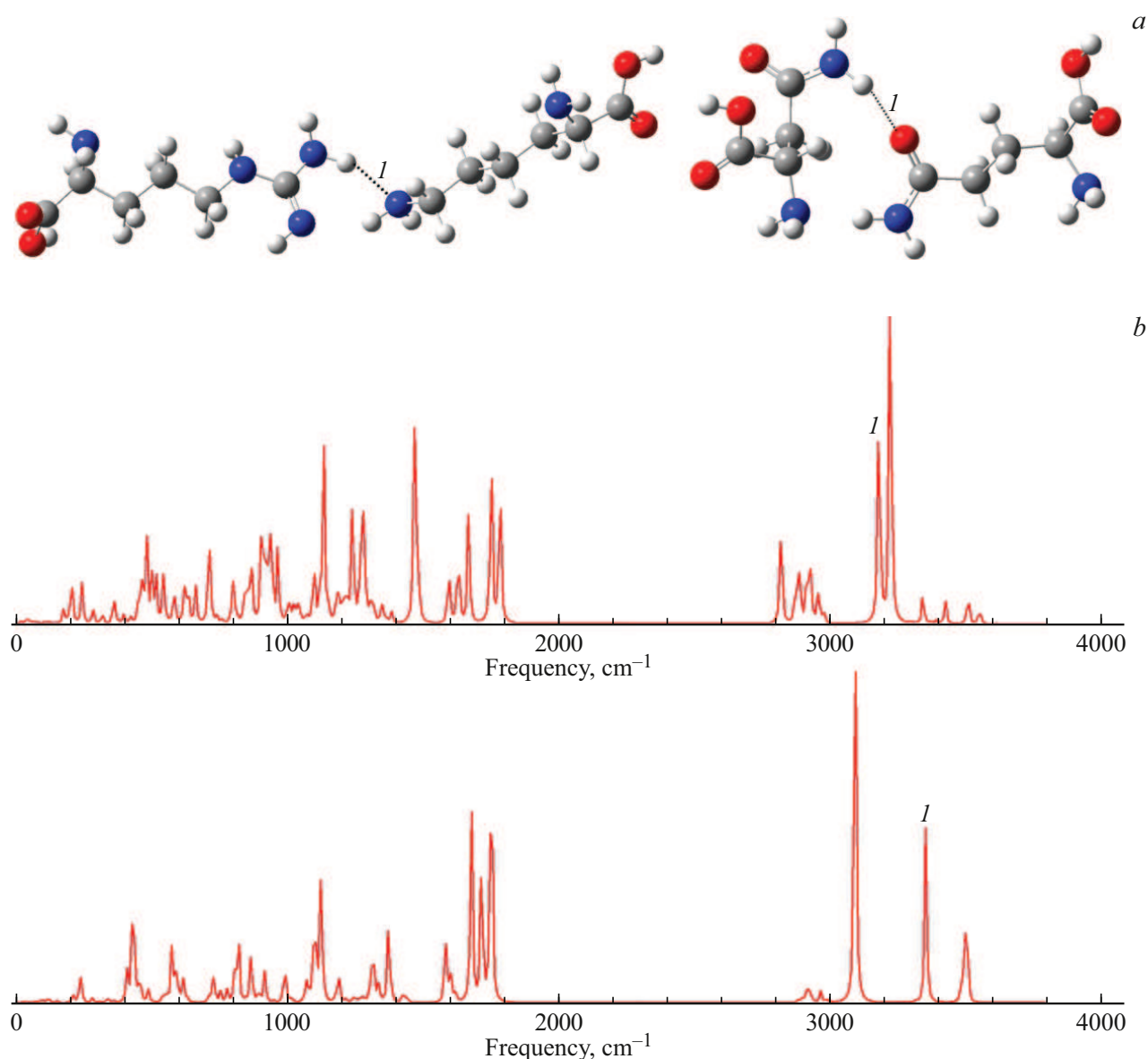


Рис. 3. Рассчитанные структуры (a) и ИК-спектры (b) молекулярных комплексов аргинин-лизин и глутамин-аспарагин. Цифрами обозначены образовавшиеся водородные связи в структурах и соответствующие им пики на спектрах.

Таблица 4. Взаимодействие нейтральных аминокислот

Комплекс	Тип связи	Длина R, Å	Длина Н-связи водородного мостика R _b , Å	Частота ν, см ⁻¹	Частотный сдвиг Δν, см ⁻¹	Энергия связи ΔH, kcal/mol	Интенсивность I _{IR} , km/mol
AS+G	N-H...O	1.98	2.99	3347	56	1.2	313
AS+G+F(1)	N-H...O	1.94	2.96	3316	87	2.1	461
AS+G+IC(1)	N-H...O	1.94	2.96	3236	167	3.4	505
AS+G+MB(2)	N-H...O	1.94	2.96	3317	86	2.0	432

фотонами. Изменение растворителя, а также pH влияют на тушение флуоресценции за счет комплексообразования и изменения электронных уровней, что делает MC важным зондом в химии растворов.

В табл. 5 отражено взаимодействие между флуоресцентными красителями и аминокислотами, к которым они были добавлены. Полученные результаты говорят о том, что степень комплексообразования существенно

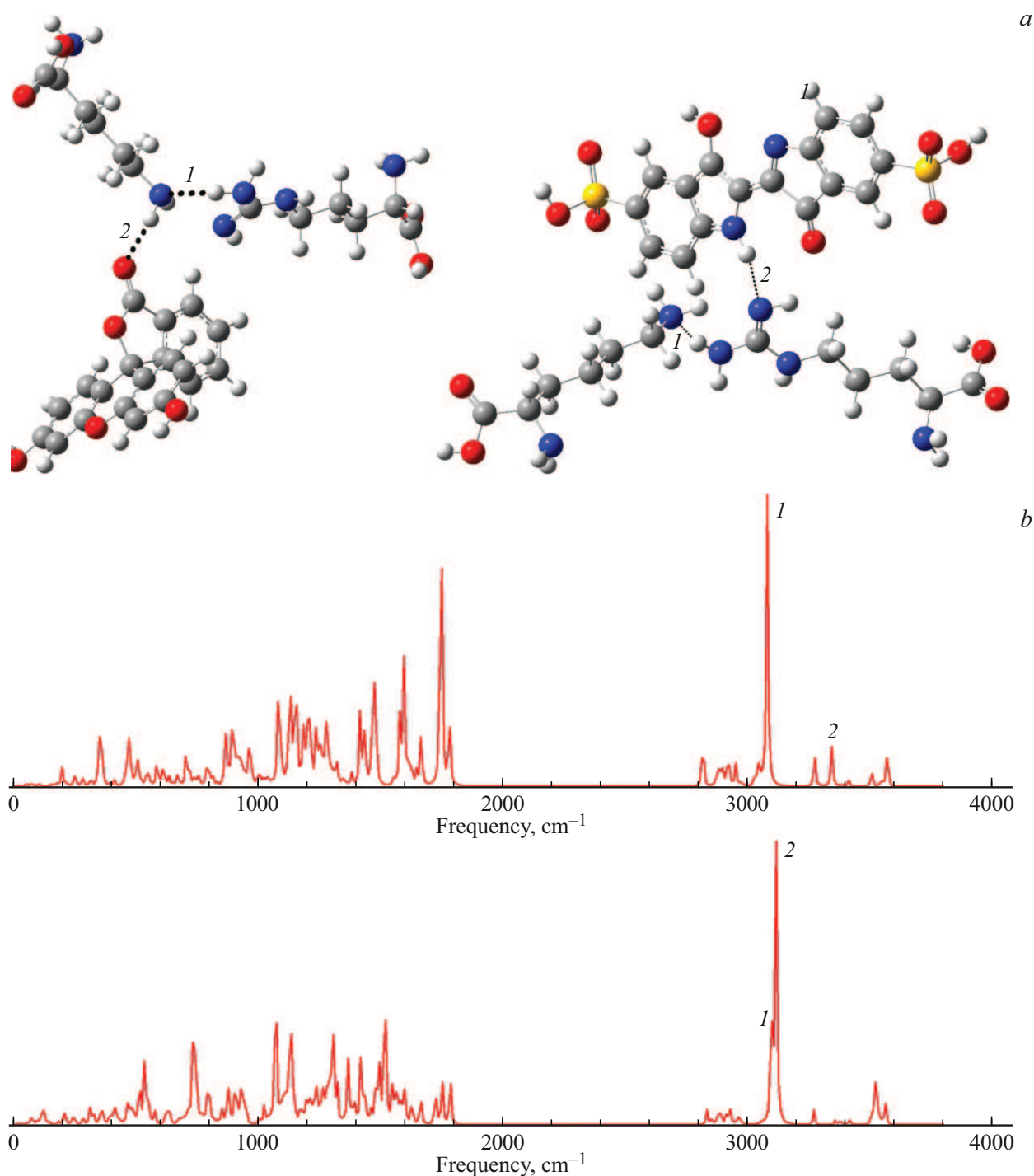


Рис. 4. Рассчитанные структуры и ИК-спектры молекулярных комплексов флуоресцеин-аргинин-лизин (*a*) и индигокармин-аргинин-лизин (*b*). Цифрами обозначены образовавшиеся водородные связи в структурах и соответствующие им пики на спектрах.

повышается в случае, когда оно основано на связи N-H...N.

Выводы

Из результатов расчетов видно, что присутствие флуоресцеина и индигокармина не только не ослабило

взаимодействие между аминокислотами, но и способствовало его усилению. Использование метиленового синего ослабило взаимодействие между основными аминокислотами, но усилило его в случае с нейтральными.

Это обусловлено высокой реактивной способностью метиленового синего, механизм его взаимодействия с аминокислотами отличается от остальных рассмотрен-

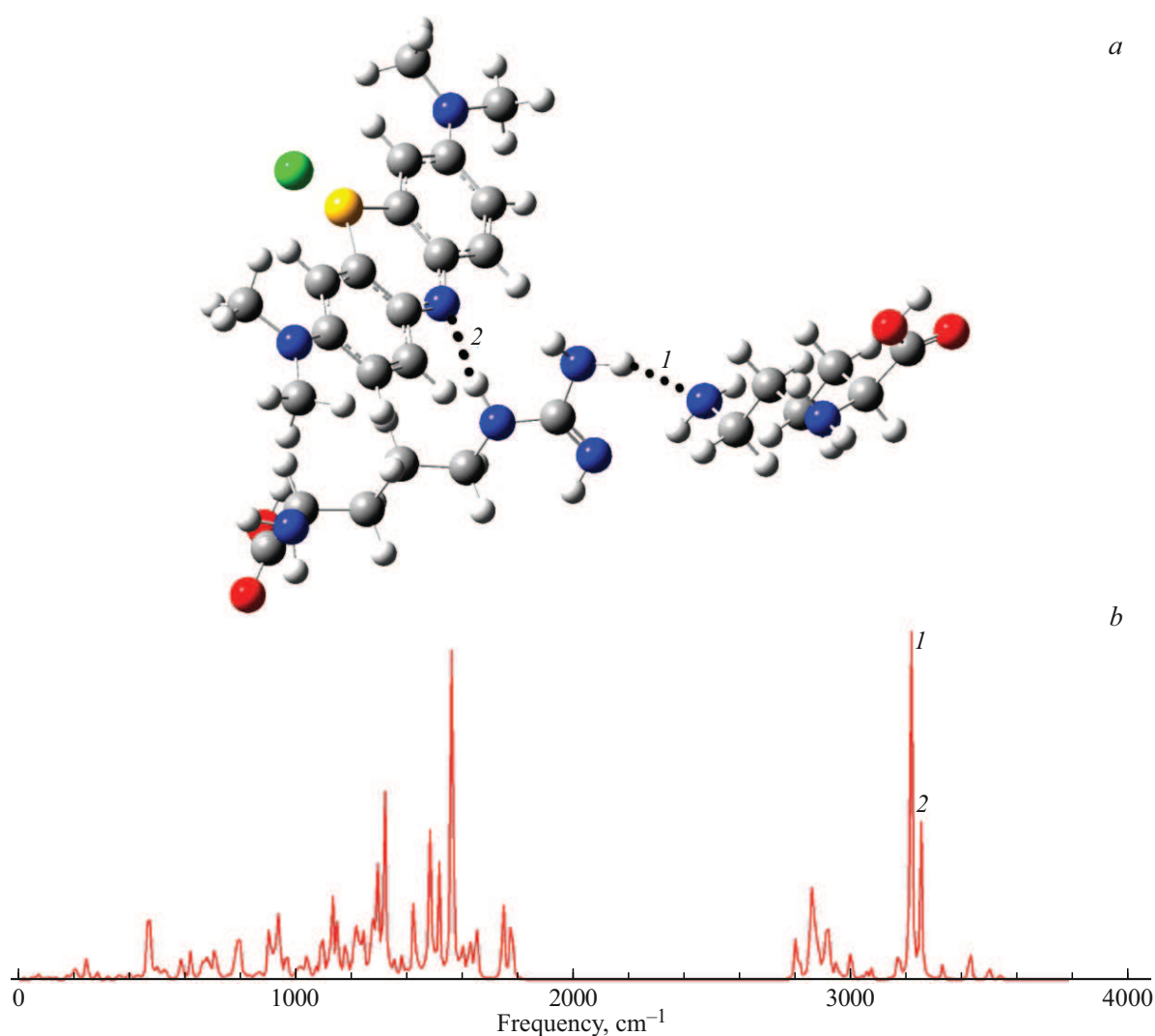


Рис. 5. Рассчитанная структура и ИК-спектр молекулярного комплекса метиленовый синий-аргинин-лизин. Цифрами обозначены образовавшиеся водородные связи в структурах и соответствующие им пики на спектрах.

Таблица 5. Взаимодействие красителей с аминокислотами

Комплекс	Тип связи	Длина R , Å	Длина Н-связи водородного мостика R_b , Å	Частота ν , cm^{-1}	Частотный сдвиг $\Delta\nu$, cm^{-1}	Энергия связи ΔH , kcal/mol	Интенсивность I_{IR} , km/mol
A+L+F(2)	N-H...O	2.11	3.13	3338	25	~ 0	113
AS+G+F(2)	N-H...O	2.09	3.11	3397	132	2.9	589
A+L+IC(2)	N-H...N	1.94	2.97	3107	299	4.8	1271
AS+G+IC(2)	N-H...O	2.14	3.15	3382	27	~ 0	167
A+L+MB(2)	N-H...N	2.13	3.15	3253	125	2.8	375
AS+G+MB(1)	N-H...N	2.05	3.07	3247	282	4.6	1289

Примечание. Сокращения: **A** — Аргинин, **L** — Лизин, **AS** — Аспарагин, **G** — Глутамин, **F** — Флуоресцеин, **IC** — индигокармин, **MB** — метиленовый синий.

ных красителей. Поэтому при мечении белковых структур для диагностики транспорта по организму *in vivo* стоит учитывать особенности межмолекулярного нековалентного взаимодействия каждого конкретно используемого красителя.

Финансирование работы

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-22-00258, <https://rscf.ru/project/25-22-00258/>.

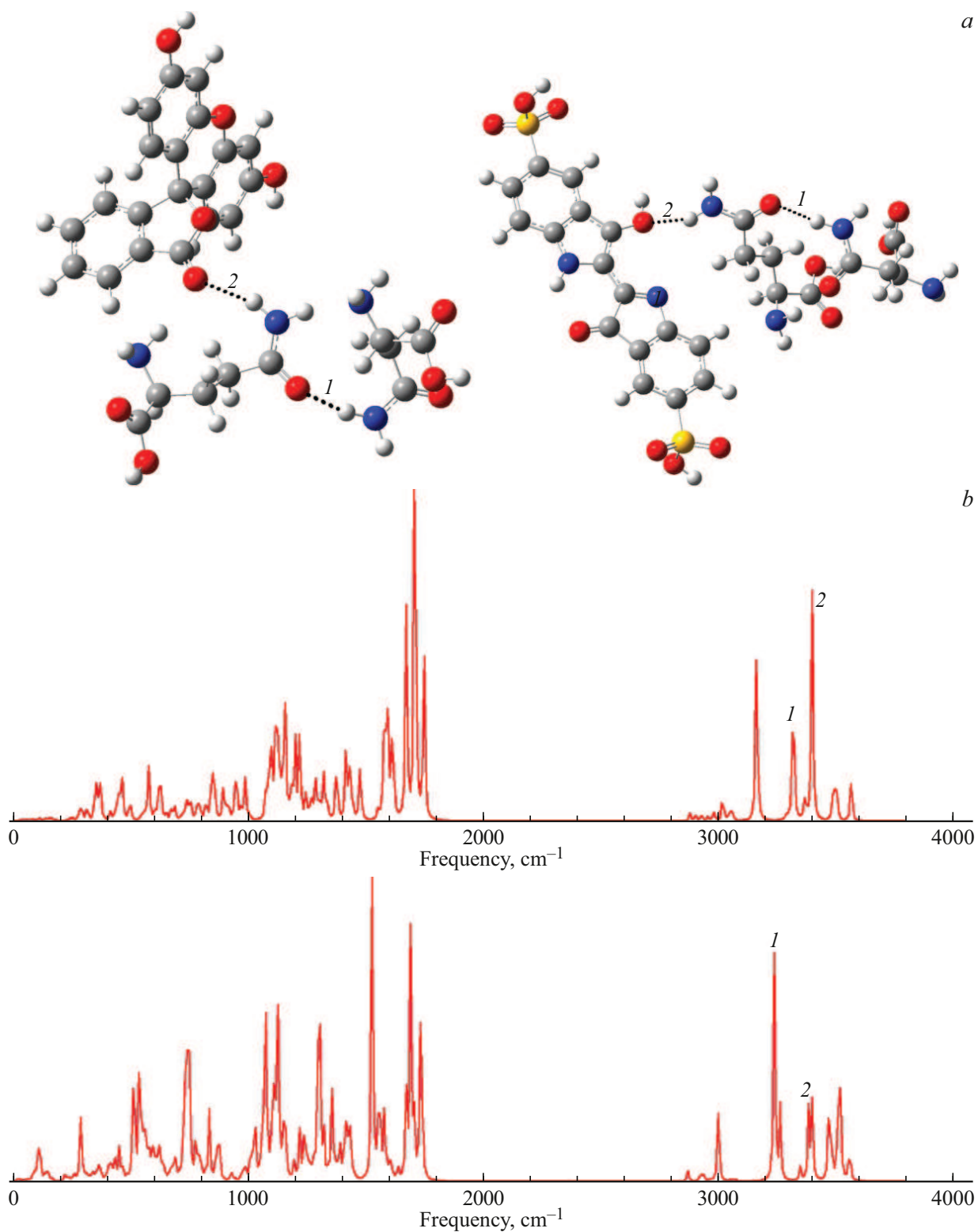


Рис. 6. Рассчитанные структуры (a) и ИК-спектры (b) молекулярных комплексов флуоресцеин-аспарагин-глутамин и индигокармин-аспарагин-глутамин. Цифрами обозначены образовавшиеся водородные связи в структурах и соответствующие им пики на спектрах.

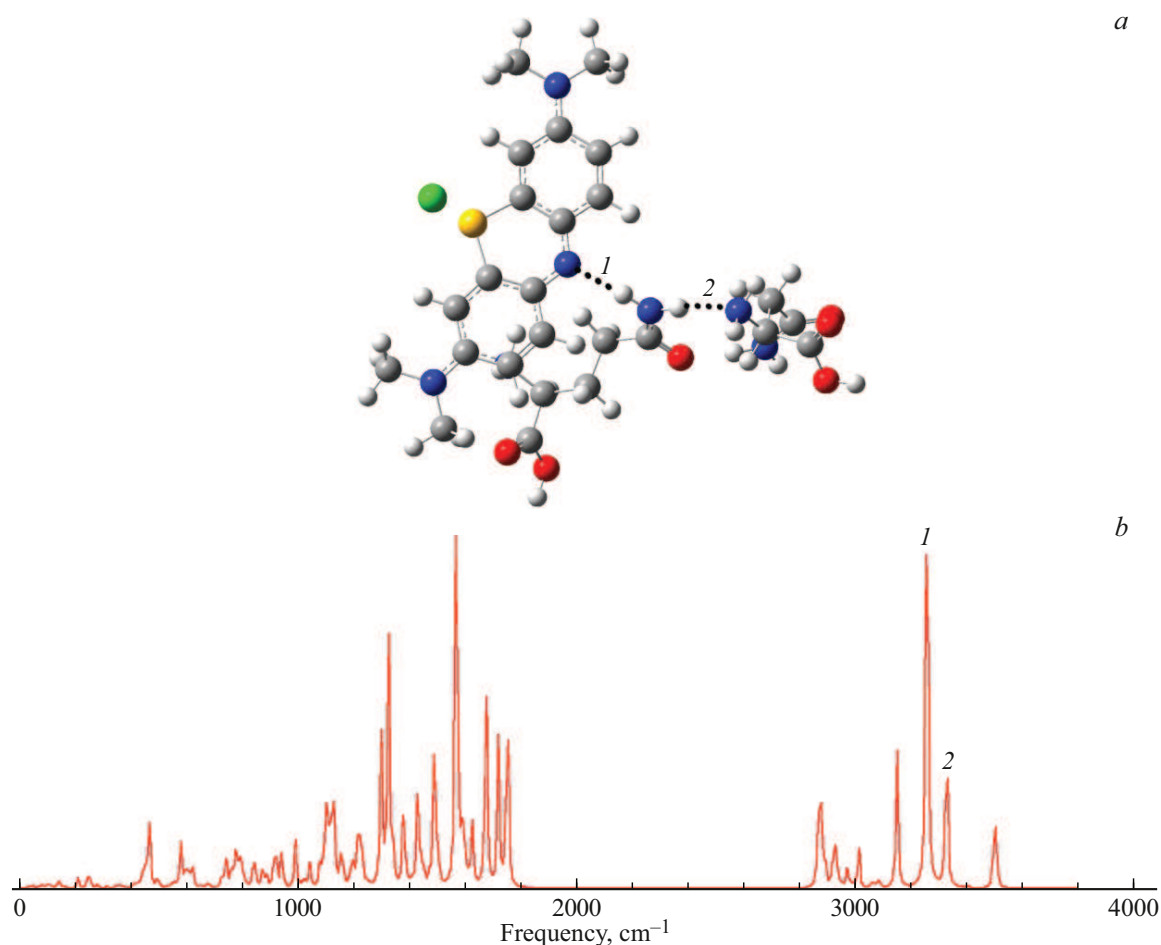


Рис. 7. Рассчитанная структура и ИК-спектр молекулярного комплекса метиленовой синей-аспарагин-глутамин. Цифрами обозначены образовавшиеся водородные связи в структурах и соответствующие им пики на спектрах.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] K. Luck et al. *Nature*, **580** (7803), 402 (2020). DOI: 10.1038/s41586-020-2188-x
- [2] D. Rolf, T. Inaki, L. Damien. *Am Chem Soc.*, **146** (20), 14213 (2024). DOI: 10.1021/jacs.4c03445
- [3] Я. Кольман, К.-Г. Рем. *Наглядная биохимия* (Лаборатория знаний, М., 2019), с. 66–67.
- [4] П.А. Гервас, Н.В. Литвяков, Н.О. Попова, А.Ю. Добродеев, А.С. Тарасова, Е.Л. Юмов, Ф.Г. Иванова, О.В. Черемисина, С.Г. Афанасьев, В.Е. Гольдберг, Н.В. Чердынцева. *Сиб. онкол. журн.*, **62** (2), 46 (2014).
- [5] Г.Н. Тен, Н.Е. Щербакова, В.И. Баранов. *Колесательные спектры аминокислот в разных фазовых состояниях* (Изд-во Саратовского ун-та, С., 2017), 188 с.
- [6] Г.Н. Тен, Н.Е. Щербакова, В.И. Баранов. *Естественные науки*, **3** (60), 85 (2017).
- [7] M.-E. Ristea, O. Zarnescu. *J. Xenobiot.*, **13** (4), 509 (2023). DOI: 10.3390/jox13040032
- [8] A. Fernandez-Perez, G. Marban. *ACS Omega*, **5** (46), 29801 (2020). DOI: 10.1021/acsomega.0c03830
- [9] Z. Zhao, E.R. Malinowski. *J. Chemometrics*, **13** (2), 83 (1999). DOI: 10.1366/0003702991946028
- [10] W. Kohn. *Rev. Mod. Phys.*, **71** (5), 1253 (1999). DOI: 10.1103/RevModPhys.71.1253
- [11] A.D. Becke. *J. Chem. Phys.*, **98** (7), 5648 (1993). DOI: 10.1063/1.464913
- [12] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel et al. *Gaussian 03, Revision B.03* (Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 2003).
- [13] А.В. Иогансен. *Водородная связь* (Наука, М., 1981), 155 с.
- [14] J.W. Steed, J.L. Atwood. *Supramolecular Chemistry*, 2nd ed. (John Wiley & Sons, Chichester, 2009), 970 p.
- [15] *FreeSpectralDatabase* [Электронный ресурс]. URL: <https://spectrabase.com/compound/5G3SgzEul7q>
- [16] *FreeSpectralDatabase* [Электронный ресурс]. URL: <https://spectrabase.com/compound/CLtDf3EKtRq>
- [17] *FreeSpectralDatabase* [Электронный ресурс]. URL: <https://spectrabase.com/compound/FNTSDUMCIV1>
- [18] *FreeSpectralDatabase* [Электронный ресурс]. URL: <https://spectrabase.com/compound/K1B2HAWMHQJ>
- [19] *FreeSpectralDatabase* [Электронный ресурс]. URL: <https://spectrabase.com/compound/6OrTtwlZsb>
- [20] *FreeSpectralDatabase* [Электронный ресурс]. URL: <https://spectrabase.com/compound/8yty4gvbDYX>
- [21] *FreeSpectralDatabase* [Электронный ресурс]. URL: <https://spectrabase.com/spectrum/1m3Z6HLFXyu>