

На правах рукописи



Суржикова Дарья Павловна

**ВЛИЯНИЕ ПЕРЕНОСА ПРОТОНА
В ОСНОВНОМ И ВОЗБУЖДЕННОМ СОСТОЯНИЯХ
НА ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА
ИОННЫХ ФОРМ ФЛЮОРЕСЦЕИНА**

Специальность

1.3.6. Оптика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Красноярск – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский федеральный университет» (ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет»).

Научный руководитель:

Слюсарева Евгения Алексеевна

доктор физико-математических наук, доцент, ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», профессор базовой кафедры фотоники и лазерных технологий

Официальные оппоненты:

Кистенев Юрий Владимирович

доктор физико-математических наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», заведующий лабораторией лазерного молекулярного имиджинга и машинного обучения.

Луговцов Андрей Егорович

кандидат физико-математических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», старший научный сотрудник физического факультета.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский педагогический государственный университет»

Защита состоится «20» июня 2025 г. в 14 часов 30 мин. на заседании диссертационного совета **24.1.228.02** Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) по адресу: 660036, г. Красноярск, ул. Академгородок, 50/38.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физики им. Л.В. Киренского Сибирского отделения Российской академии наук - обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН и на официальном сайте: <http://kirensky.ru/ru/councils/dis/>.

Автореферат разослан «__» апреля 2025 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор физико-математических наук,

старший научный сотрудник



Втюрин

Александр

Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Флуоресцеин – органический краситель, относящийся к семейству ксантеновых красителей, который был синтезирован 1871 году немецким химиком Адольфом фон Байером. Первое практическое применение флуоресцеина произошло в геологии, где краситель был использован в качестве индикатора общей водной системы Дуная и Рейна. По пришествию лет, краситель нашел применение во многих областях начиная с биологических: визуализации при диагностике и проведении различных операций [1,2], во флуоресцентной микроскопии [3], заканчивая техническими: в качестве активной среды лазера [4], в полупроводниковой электронике [5] и солнечных элементах [6].

В случае медико-биологических применений флуоресцеина его нужно рассматривать в окружении воды. Присутствие в окружении красителя свободных катионов водорода [H^+] способствует их диссоциации/ассоциации со структурой флуоресцеина (переносу протона в основном состоянии), и, вследствие этого, появлению набора ионных форм красителя (С – катион, Q – хиноид, Z – цвиттерион, L – лактон, М – моноанион, D – дианион), существующих в равновесии друг с другом [7]. Данный процесс задействует хромофорную группу флуоресцеина, что отражается на фотофизических свойствах красителя при различных значениях рН [8]. Спектральные свойства ионных форм флуоресцеина в основном состоянии в широком диапазоне рН хорошо изучены методами спектрофотометрического титрования [9].

До сих пор не были детально изучены спектры флуоресценции, квантовые выходы и флуоресцентные времена жизни ионных форм флуоресцеина [10]. Причиной этого является сильное перекрытие широких бесструктурных спектров испускания, различная эффективность излучения ионных форм и перенос протона в возбужденном состоянии. Явление переноса протона заключается в изменении ионной формы за время жизни возбужденного состояния. Этот процесс конкурирует с излучательным процессом, что может приводить к ситуации, когда поглощает одна ионная форма, а излучает другая [11].

Флуоресцентным сенсором также является производный флуоресцеина – изотиоцианат флуоресцеина (ФИТЦ), который имеет схожие спектральные и кислотно-основные свойства с флуоресцеином, но, в отличие от него, фиксируется вблизи функциональной молекулы, благодаря ковалентному связыванию. Размер флуоресцентного сенсора (порядка 1 нм) позволяет проводить измерение локальных характеристик на поверхности белковой структуры на расстоянии длины Дебая (1-2 нм) [12] в физиологических условиях (рН 5÷8). В этом диапа-

зоне существует большинство физиологических жидкостей (кровь, ликвор, синовиальная жидкость и т.д.) и функционально-значимых биомакромолекул (напр. белков). Актуальность определения спектральных параметров флуоресцеина в возбужденном состоянии связана с необходимостью получать с высоким пространственным и временным разрешением локальные физико-химические характеристики (рН, температура, полярность и др.) сложных неоднородных сред, функциональных биомолекул.

Цель работы: выявить влияние переноса протона в основном и возбужденном состояниях на спектральные и люминесцентные свойства ионных форм флуоресцеина в водных растворах в широком диапазоне рН и проанализировать связь между спектральными свойствами и локальным окружением красителя в физиологическом диапазоне рН.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Измерить и проанализировать спектры люминесценции флуоресцеина в широком диапазоне рН $0 \div 10$, выявить форму спектров люминесценции, квантовые выходы, флуоресцентные времена жизни катионной, хиноидной и моноанионной ионных форм флуоресцеина, определить направление и эффективность переноса протона в возбужденном состоянии;

2. Разработать и реализовать в виде программы ЭВМ модель, описывающую распределение населенностей ионных форм в зависимости от рН, длины волны возбуждения, температуры для анализа экспериментальных данных и прогнозирования спектральных свойств флуоресцеина;

3. Выявить механизмы, ответственные за температурную чувствительность спектров поглощения и люминесценции водных растворов флуоресцеина, в физиологическом диапазоне рН;

4. Оценить применимость гомолога флуоресцеин-изотиоцианата (ФИТЦ) для оценки локального окружения на поверхности белковой молекулы в физиологическом диапазоне рН.

Методы исследования

Были использованы методы абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии. Флуоресцентные исследования включали в себя: стационарную, время-разрешенную и поляризационную спектроскопию.

В качестве модельных методов были использованы:

- метод Аленцева-Фока разделения составных контуров флуоресценции на контуры с заранее неизвестной произвольной формой;

- разложение составных спектров поглощения на компоненты с известным профилем с использованием алгоритма нелинейной аппроксимации Левенберга-Марквардта.

Была разработана модель на основе кинетического подхода, описывающая распределение населенностей ионных форм в зависимости от: pH, длины волны возбуждения и температуры.

Положения, выносимые на защиту

1. Несмотря на одинаковые хромофорные группы, близкое значение волновых чисел 0-0 переходов ($20300 \pm 100 \text{ см}^{-1}$) и квантовых выходов флуоресценции $0,46 \pm 0,05$, $0,42 \pm 0,04$ моноанионной и хиноидной форм флуоресцеина соответственно, их времена жизни ($3,3 \pm 0,1 \text{ нс}$ и $3,0 \pm 0,1 \text{ нс}$ для моноаниона и хиноида соответственно) и форма вибронных спектров люминесценции различаются.

2. Эффективный перенос протона в возбужденном состоянии заключается в фотоотрыве протона от катиона с образованием хиноида, от цвиттериона с образованием моноаниона, от моноаниона с образованием дианиона флуоресцеина. Это приводит к уменьшению величины показателя константы ионного равновесия в возбужденном состоянии указанных ступеней диссоциации по сравнению с основным состоянием на величину от 0,84 до 3,96.

3. Температурный аналитический ратиометрический сигнал флуоресцеина (I^{488}/I^{435}) линейен в диапазоне $283 \div 353 \text{ К}$, с угловыми коэффициентами $1,54 \pm 0,03 \cdot 10^{-2} \text{ К}^{-1}$ и $1,53 \pm 0,03 \cdot 10^{-2} \text{ К}^{-1}$ для pH 6,0 и 6,5 соответственно. Основное влияние на температурную чувствительность ратиометрического сигнала оказывает сдвиг дианион-моноанионного равновесия в основном состоянии.

4. Положительный удельный заряд поверхности белка обеспечивает жесткость связи макромолекулы с ковалентно пришитой меткой ФИТЦ, что позволяет корректно определять ее размер по анизотропии флуоресценции зонда. Удельный (на единицу площади) заряд белка линейно коррелирует с ратиометрическим флуоресцентным сигналом I^{488}/I^{435} с коэффициентом корреляции 0,999.

Научная новизна:

Впервые определены формы спектров люминесценции и волновые числа 0-0 переходов для катионной, хиноидной и моноанионной ионных форм флуоресцеина.

Впервые выявлена роль смещения равновесия в основном состоянии и изменение вероятности поглощения из-за температурного изменения формы спектра поглощения на моноанионной-дианионной ступени диссоциации в температурной зависимости ратиометрического сигнала флуоресцеина (I^{488}/I^{435}).

Впервые измерены и проанализированы абсорбционные и люминесцентные (спектры поглощения, стационарные спектры флуоресценции, среднее флуоресцентное время жизни, анизотропия флуоресценции) характеристики для ФИТЦ, ковалентно связанного с белками различного размера ($14 \div 79 \text{ кДа}$) и заряда ($+9 \div -21 e$).

Личный вклад

Автором выполнен основной объем теоретических и экспериментальных исследований, включая пробоподготовку, конъюгацию метки с белком, спектральные и др. измерения, обработку полученных данных, систематизацию результатов и подготовку научных статей и тезисов докладов, отражающих основные результаты исследования. Общее руководство и задание направления исследований (цель и задачи) осуществлялось научным руководителем д.ф.-м.н. Е.А. Слюсаревой. Методическую помощь в проведении спектральных исследований на протяжении всего исследования оказывала старший преподаватель кафедры общей физики ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет» М.А. Герасимова. Математическая модель фотопроцессов была реализована при технической поддержке доцента базовой кафедры фотоники и лазерных технологий к.ф.-м.н. А.С. Ципотана и инженера базовой кафедры фотоники и лазерных технологий ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет» А.В. Шамшурина. Анализ структурных свойств белков с помощью методов молекулярного моделирования проводил старший преподаватель кафедры биофизики ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет» к.ф.-м.н. Л.А. Суковатый. Обсуждение результатов проводилось совместно с соавторами публикаций – Е.А. Слюсаревой, М.А. Герасимовой, доцентом кафедры биофизики ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет» к.ф.-м.н. Е.В. Немцевой.

Практическая значимость работы

1. Создана модель расчета протолитического равновесия органического красителя с трехступенчатой диссоциацией в основном и возбужденном состояниях, описывающая распределение населенностей ионных форм в зависимости от рН, длины волны возбуждения, которая может быть использована для изучения природы излучения флуоресцентных соединений с выраженными фотокислотными или фотоосновными свойствами.

2. Определены диапазоны рН при которых возможно наблюдение люминесценции «чистых» ионных форм флуоресцеина: рН < 0 (катион) в диапазоне длин волн возбуждения 400–435 нм, рН 1,3 (хиноид), рН 4,4 (моноанион) в диапазоне длин волн возбуждения 435–490 нм.

3. Ратиометрический флуоресцентный сигнал флуоресцеина (I^{488}/I^{435}), имеющий линейную зависимость от температуры, может быть использован для аналитических целей в интервале температур 283÷353 К.

4. Найденные корреляции спектральных свойств ФИТЦ, ковалентно связанного с белками, ратиометрического сигнала (I^{488}/I^{435}) с удельным поверхност-

ным зарядом белка и диэлектрической проницаемости с площадью незаряженной поверхности белка, могут быть использованы при анализе зарядовых состояний широкого круга макромолекул.

Достоверность

Достоверность экспериментальных результатов обеспечена:

тщательностью пробоподготовки и использованием реактивов с аттестованной производителем чистотой, использованием приборов всемирно признанных брендов (Jobin Ivon, Perkin Elmer, Mettler Toledo, Agilent Technologies), соблюдением условий проведения спектральных измерений (калибровка, учет спектральной чувствительности детектора, фонового сигнала и реабсорбции люминесценции), воспроизводимостью результатов измерений для нескольких (3-5) повторов экспериментов, сопровождением всех результатов измерений величиной погрешности, использованием статистических критериев (χ^2 , R^2) установленных корреляций;

использованием для извлечения количественной информации принятых моделей (цикл Фёрстера, уравнения Вант-Гоффа, Стриклера-Берга, теория Хендерсона-Хассельбаха и др.), непротиворечивостью полученных данных опубликованным результатам для частных случаев и аналогичных систем.

Достоверность температурной зависимости флуоресцентных свойств флуоресцеина обеспечивается повторением результатов в цикле нагревания – охлаждения и использованием различных значений pH (6,0 и 6,5).

Верификация теоретической модели, описывающей распределение населенностей ионных форм от pH состоит в совпадении с опубликованным результатами для основного состояния всех ионных форм и дианионного возбужденного состояния, в подтверждении неизменности форм спектров флуоресценции (pH 1,3 и 4,4) при вариации длины волны возбуждения в диапазоне 435÷490 нм

Апробация результатов работы

Основные результаты работы докладывались на следующих научных фору-мах: 58-ой Международной научной студенческой конференции, МНСК-2020, (г. Новосибирск, 2020г.), Международных конференциях «Перспектив Свободный», (Красноярск, 2020 (Диплом II степени), 2021 (Диплом в специальной номинации «Актуальность»), 2023 гг.); Всероссийских научных конференциях с международным участием «Енисейская фотоника» (Красноярск, 2020, 2022, 2024 гг. (Диплом за лучший доклад в категории «Аспиранты»)); Международных конференциях по импульсным лазерам и применениям лазеров AMPL (г. Томск, 2021, 2023 гг.); XXIII Всероссийской научно-технической конференции «Современные проблемы радиоэлектроники» (Красноярск, 2022г.); Молодежной конференции с международным участием по люминесценции и лазерной физике

«LLPh» (Иркутск, 2023г.), Всероссийской научной конференции с международным участием «Невская фотоника» (г. Санкт-Петербург, 2023г.); Первой Всероссийской конференции по люминесценции «LUMOS-2024» (Москва, 2024 г.).

Основные результаты диссертации регулярно обсуждались на научных семинарах «Биофотоника», проводимых лабораторией Биофотоники совместно с лабораторией биолюминесцентных биотехнологий ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет».

Связь с плановыми исследованиями

Работа поддержана грантами:

1. РФФ № 22-22-00724 «Влияние диффузионного ограничения на фотокислотные свойства флуоресцеина при физиологических значениях pH» 2022-2023 гг.;

2. Госзадание Минобрнауки (FSRZ-2020-0008) «Разработка фундаментальных основ перспективных оптических и магнитных материалов и синхротронных рентгеноспектральных методов исследования вещества» 2021-2022 гг.;

3. РФФИ № 19-02-00450 «Роль фотоиндуцированного переноса протона в природе релаксации возбужденного состояния флуоресцеиновых красителей» 2019-2021 гг.

Публикации. Основные результаты исследования представлены в 13-х печатных работах. Результаты диссертации опубликованы в 5 статьях [A1-A5] из перечня ВАК и приравненных к ним работ, в том числе 4 статьи в изданиях «Белого списка» из которых 2 статьи K1, 1 статья K2 и 1 статья K3. Все пять статей цитируются международными базами данных WoS/Scopus, автор диссертации является в них первым автором. Результаты опубликованы в 3-х материалах в сборниках всероссийских и международных конференций [A6-A8], в 5-ти тезисах в сборниках всероссийских и международных конференций [A9-A13], получены 2 свидетельства о гос. регистрации программы для ЭВМ [A14-A15].

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав, заключения и списка литературы из 157 наименований. Полный объем текста – 121 страница, которые включают 48 рисунков, 11 таблиц и 41 формула.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении показана актуальность, сформулированы цели и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость результатов работы, представлены защищаемые положения и апробация результатов работы.

В первой главе проведен анализ большого количества публикаций, который продемонстрировал, что краситель флуоресцеин находит обширное применение как в технических, так и в биологических областях. На основании анализа

данных подтверждается необходимость дальнейшего изучения спектральных и фотофизических характеристик красителя.

В водном окружении флуоресцеин демонстрирует набор ионных форм с зарядом от -2 (дианион) до $+1$ (катион) и различными спектральными характеристиками вследствие изменения хромофорной группы из-за присоединения протона $[H^+]$ (Рисунок 1а). Концентрация ионных форм флуоресцеина в основном зависит от рН раствора, практически во всем диапазоне рН краситель существует в виде смеси форм (Рисунок 1б).

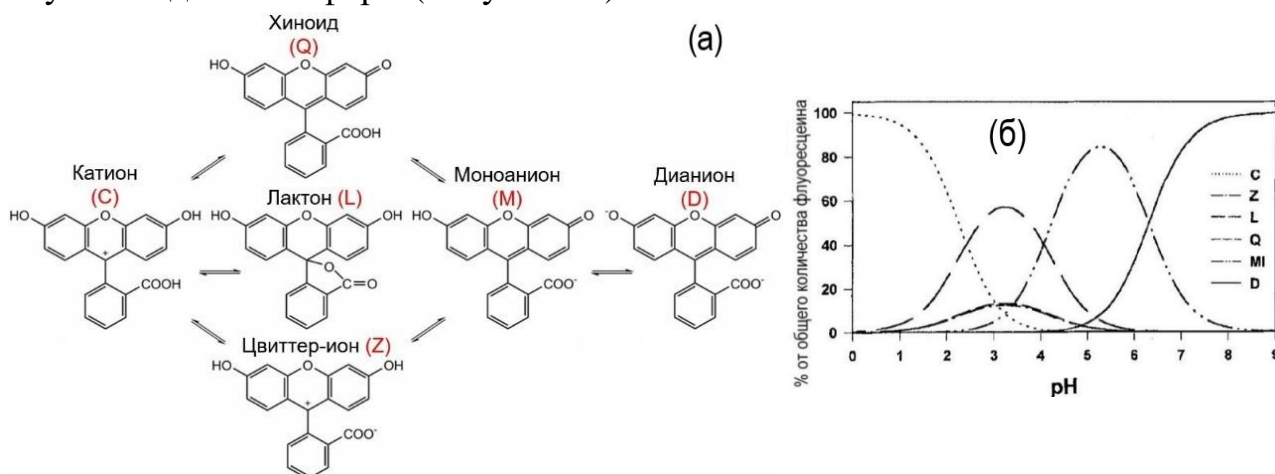


Рисунок 1 – Структурные формулы ионных форм флуоресцеина (а), зависимость концентрации ионных форм флуоресцеина от рН в основном состоянии (б) [9].

Равновесные концентрации ионных форм флуоресцеина для основного состояния в широком диапазоне рН можно оценить из теории Хендерсона-Хассельбаха:

$$pK_a = -\lg \left(\frac{[M^-][H^+]}{[MH]} \right), \quad (1)$$

где $[M^-]$ – концентрация M^- формы, $[MH]$ – концентрация MH формы, различающиеся на единицу заряда. Фотофизические характеристики (форма спектров и эффективность поглощения) и показатели констант ионного равновесия pK_a ионных форм красителя в основном состоянии являются изученными [9].

В возбужденном состоянии ситуация усложняется из-за нескольких факторов. Помимо того, что флуоресцеин существует в виде смеси нескольких ионных форм одновременно, их спектры флуоресценции сильно перекрываются. Ионные формы красителя имеют различную эффективность излучения (квантовый выход). Дополнительно, для соединения характерен перенос протона в возбужденном состоянии, который выражается в виде изменения ионной формы за время жизни возбужденного состояния. Показатели констант ионного равновесия в возбужденном состоянии pK_a^* можно оценить из цикла Фёрстера:

$$\Delta pK_a = pK_a^* - pK_a = hc \frac{\tilde{\nu}_{0-0}^{M^-} + \tilde{\nu}_{0-0}^{MN}}{2,303kT}, \quad (2)$$

где h – постоянная Планка, c – скорость света, $\tilde{\nu}_{0-0}^{M^-}$ и $\tilde{\nu}_{0-0}^{MN}$ – волновые числа 0-0 перехода для МН и М⁻ форм, T – температура, k – постоянная Больцмана. За счет переноса протона в возбужденном состоянии, конкурирующим с излучением, поглощает свет одна форма, а излучает другая форма красителя. Все перечисленные факторы приводят к тому, что спектры флуоресценции помимо рН зависят от многих факторов (длины волны возбуждения, вероятности переноса протона, температуры и т.д.) [А4,А9], что осложняет нахождение спектральных и фотофизических характеристик ионных форм флуоресцеина в возбужденном состоянии и приводит к расхождению в опубликованных ранее результатах. Только флуоресцентный контур D формы (рН>9) является известным. На основании данной главы были определены пути решения задач исследования.

Во второй главе подробно рассмотрена кинетическая модель населенности ионных форм флуоресцеина в основном и возбужденном состояниях, которая применяется для систем с конкуренцией между реакцией переноса протона в возбужденном состоянии и излучательным процессом. В модели совместно рассматриваются вероятности поглощения ($I\sigma_\lambda$), излучения ($k_{\text{фл}}$) и реакции протонирования ($k_{\text{МНМ}^-}$) и депротонирования ($k_{\text{М}^- \text{МН}}$) (Рисунок 2).

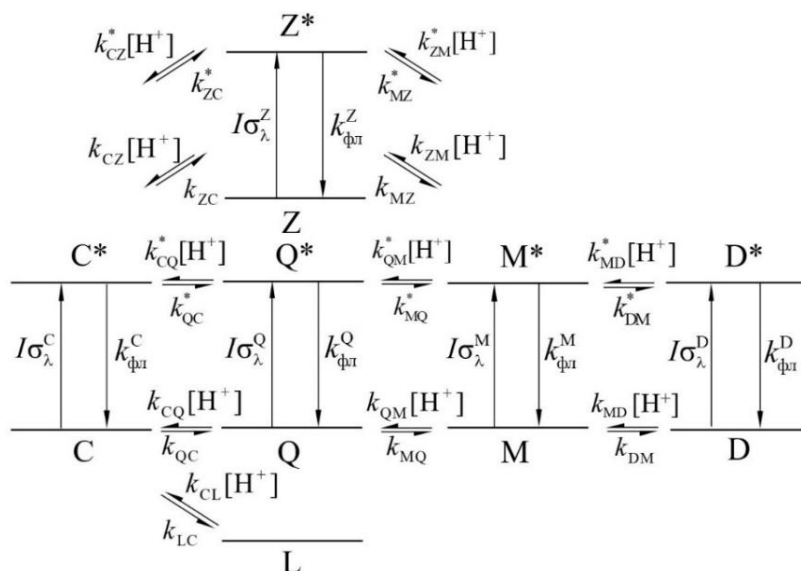


Рисунок 2 – Кинетическая схема процессов, происходящих в смеси ионных форм флуоресцеина [А14].

Для каждой ионной формы флуоресцеина в основном и возбужденном состояниях были составлены кинетические уравнения, которые учитывали возможные процессы активации-деактивации. Часть констант, отвечающих за основное состояние (сечение поглощения – σ (см²), константы протонирования

($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) и депротонирования (s^{-1})) были взяты из литературных источников. Для совместного расчета населенностей в основном и возбужденном состояниях были найдены константы, ответственные за возбужденное состояние.

Методом Аленцева–Фока в кислой среде ($\text{pH} < 3,5$) спектры флуоресценции были разделены на две компоненты, соответствующим С (χ_1) и Q(χ_2) ионным формам (Рисунок 3).

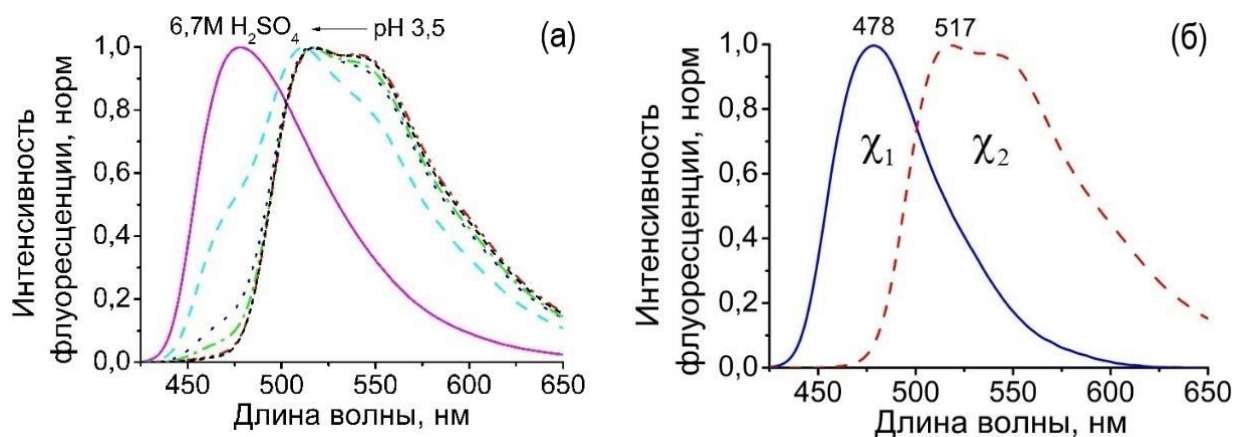


Рисунок 3 – Спектры флуоресценции водных растворов флуоресцеина при $\text{pH} < 3,5$ (а); Разложенные спектры флуоресценции, соответствующие С (χ_1) и Q(χ_2) ионным формам (б) [A6].

При $\text{pH} < 3,5$ излучают только С и Q формы. Излучение L формы исключается из рассмотрения из-за поглощения вне видимого спектра. Вероятность излучения Z формы флуоресцеина минимальна [A1]. Было найдено значение pH 4,4 при котором преимущественно излучает М форма флуоресцеина и измерен спектр флуоресценции.

Имея информацию о формах спектров флуоресценции, найденных нами, и спектров поглощения [9] были найдены частоты 0-0 переходов путем построения спектров в зеркальных координатах, показатели констант ионного равновесия в возбужденном состоянии были найдены через цикл Фёрстера (2). Найденные показатели были использованы в моделировании.

Таблица 1 – Значение констант ионного равновесия в основном и возбужденном состояниях для разных ступеней диссоциации флуоресцеина.

Ионная форма	Положение 0-0 перехода, $10^4 \pm 0,01\text{cm}^{-1}$	Равновесие	$\text{p}K_a$ [9]	$\Delta\text{p}K_a$	$\text{p}K_a^*$
С	2,21	С-Q	3,20	3,80	-0,60
Q	2,03	Q-M	3,27	0,03	3,30
Z	2,21	С-Z	3,01	-0,09	3,10
М	2,03	Z-M	3,46	3,96	-0,50
D	1,99	М-D	6,31	0,84	5,47

Распределение населенностей ионных форм в основном состоянии полностью соответствовало ранее найденному [9].

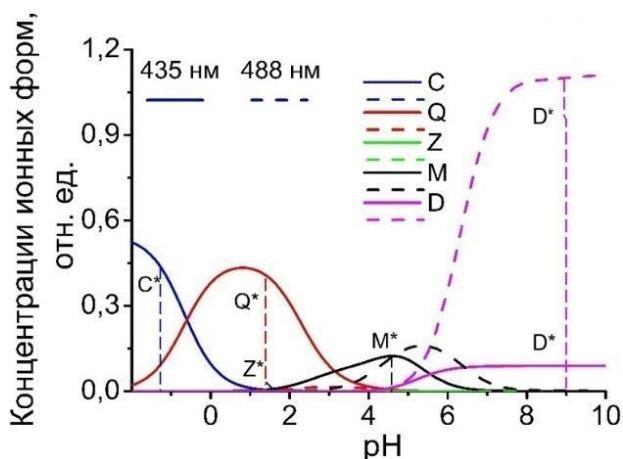


Рисунок 4 – Зависимость населенностей ионных форм флуоресцеина от рН в возбужденном состоянии на длинах волн возбуждения 488 нм и 435 нм [A2].

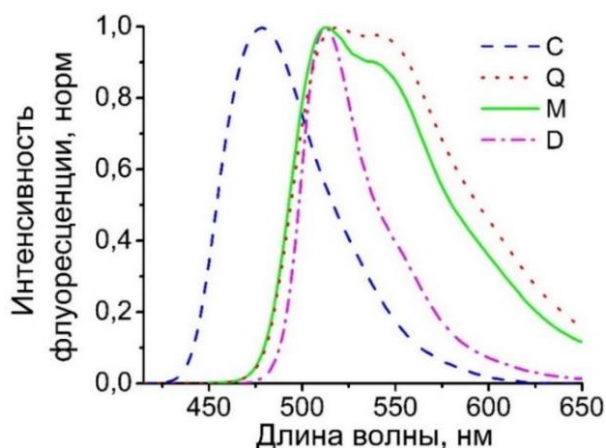


Рисунок 5 – Спектры флуоресценции ионных форм флуоресцеина.

Различная эффективность возбуждения ионных форм с различными спектрами поглощения и перенос протона в возбужденном состоянии формируют распределение населенностей ионных форм в возбужденном состоянии (Рисунок 4), которое отличается от распределения населенностей в основном состоянии [9]. Это распределение зависит не только от рН, но и от длины волны возбуждения.

Были найдены значения рН, при которых преимущественно излучали «чистые» ионные формы, это рН<0 (С), 1,3 (Q), 4,4 (М) и рН>9 (D) (Рисунок 4). В этих условиях были измерены спектры флуоресценции при вариации длины волны возбуждения. Показано, что при вариации длины волны возбуждения форма спектров флуоресценции неизменна, что подтверждает флуоресценцию одного типа излучателя после установления равнове-

сия. Формы спектров Q и М форм являются схожими, однако имеют различия в плече в красной области спектра, это свидетельствует о различной вибронной структуре уровней энергии, несмотря на одинаковую хромофорную группу. Были получены средние флуоресцентные времена жизни условиях существования «чистых форм» и рассчитан квантовый выход, как отношение флуоресцентного и радиационного времен жизни [A10].

Таблица 2 – Фотофизические характеристики ионных форм флуоресцеина.

Параметр	С	Q	М
Квантовый выход, $\phi \pm 0,05$, %	$0,92 \pm 0,07$	$0,42 \pm 0,04$	$0,46 \pm 0,05$
Флуоресцентное время жизни, $\tau_{\text{фл}} \pm 0,1$, нс	3,55	3,00	3,30
рН (λ)	< 0 (400÷435 нм)	1,3 (435÷490 нм)	4,4 (435÷490 нм)

Эффективный перенос протона в возбужденном состоянии заключается в фотоотрыве протона от С с образованием Q, от Z с образованием М, от М с образованием D формы флуоресцеина. Это приводит к уменьшению величины показателя константы ионного равновесия в возбужденном состоянии указанных ступеней диссоциации по сравнению с основным состоянием на величину от 0,84 до 3,96 (Таблица 1). Флуоресцеин демонстрирует фотокислотные свойства. При рассмотрении флуоресцеина в качестве рН сенсора необходимо учитывать, что форма и интенсивность спектра излучения флуоресцеина зависят от ряда факторов: i) рН, определяющего количество и вклад ионных форм в основном состоянии (Рисунок 1б) [9]; ii) длины волны возбуждения, влияющей на эффективность поглощения света этими формами (Рисунок 4); iii) переноса протона в возбужденном состоянии, формирующего перераспределение концентраций ионных форм в течение времени жизни возбужденных состояний; iv) формы спектра и квантового выхода возбужденных ионных форм, за которыми следуют перечисленные процессы (Рисунок 5).

Третья глава посвящена оценке вклада механизмов (I-IV) в ратиометрический сигнал флуоресценции (S), получаемый как отношение интегральных сигналов флуоресценции при двух длинах волн возбуждения. Оптимальными длинами волн возбуждения для построения S сигнала являются 435 и 488 нм: они соответствуют преимущественному поглощению М и D ионных форм. Предложено четыре механизма, которые могут оказывать влияние на флуоресцентный ратиометрический сигнал при изменении температуры (Рисунок 6):

- I. изменение ионного равновесия в основном состоянии;
- II. изменение ионного равновесия в возбужденном состоянии;
- III. изменение квантового выхода флуоресценции ионных форм;
- IV. изменение вероятности поглощения из-за температурного изменения формы спектра поглощения.

Для оценки температурного влияния на излучение красителя в физиологическом диапазоне рН (5÷8) (М-D ступени диссоциации), были измерены спектры поглощения растворов флуоресцеина при рН 6,0 и 6,5 в диапазоне температур 283÷353 К. Для поддержания постоянного рН во время эксперимента, был использован фосфатный буфер с концентрацией фосфат ионов 1М.

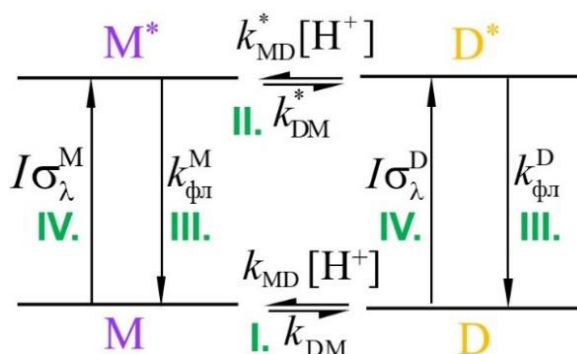


Рисунок 6 – Кинетическая схема фотопроцессов, протекающих в смеси ионных форм флуоресцеина рН 4÷8 с указанием механизмов влияния на эффективность процессов [A15].

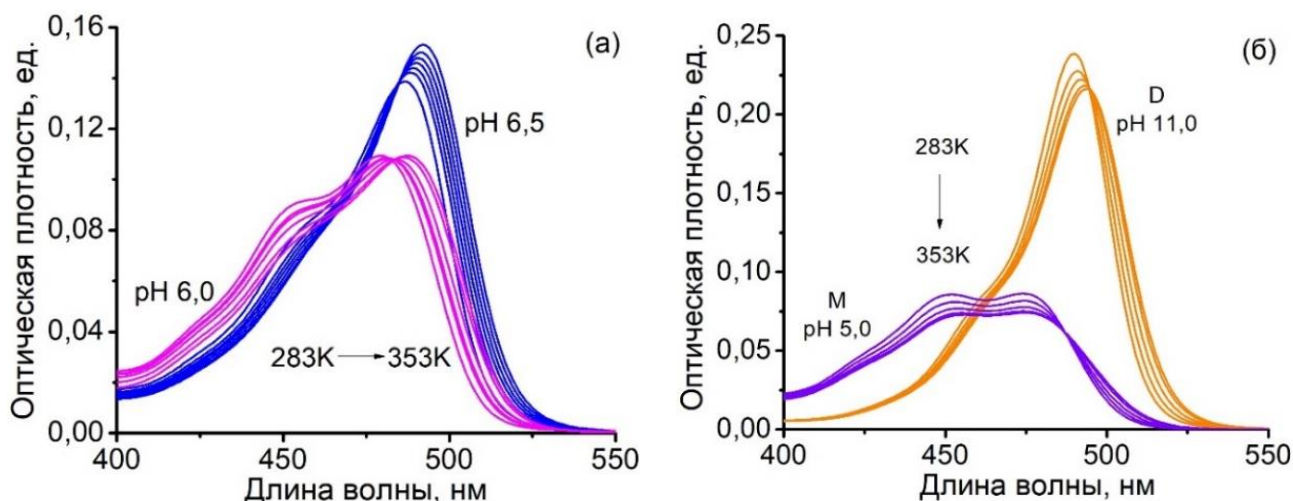


Рисунок 7 – Спектры поглощения растворов флуоресцеина при pH 6,5 (синий) и 6,0 (розовый) (а) и 11,0 (D, оранжевый) 5,0 (M, фиолетовый) в диапазоне температур 283÷353 К (б).

Используя разложение спектров поглощения флуоресцеина (Рисунок 8) при pH 6,5 на спектры D (pH 11,0) и M (pH 5,0) форм при соответствующих температурах (Рисунок 7б), была рассчитана константа ионного равновесия K_a для флуоресцеина при различных температурах через формулу для показателя константы ионного равновесия (1) [A3,A4].

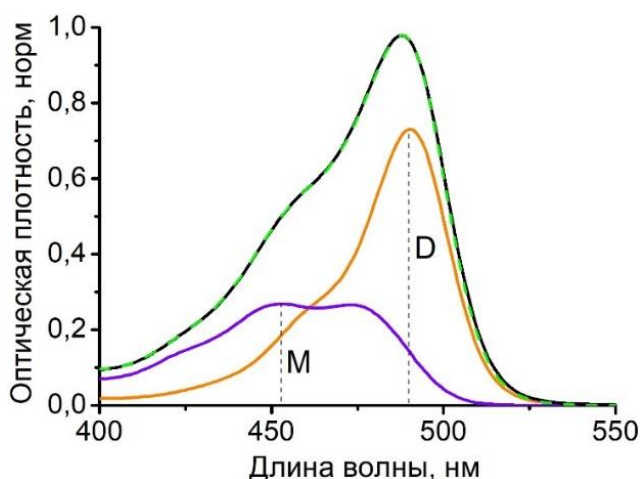


Рисунок 8 – Пример разложения измеренного спектра при pH 6,5 температуре 298 К на две компоненты спектров поглощения M и D ионных форм флуоресцеина [A3,A7].

Было обнаружено, что при нагреве pK_a уменьшилось для обоих pH. В исследованном диапазоне температур $\Delta pK_{a \text{ temp}}$ (разница показателей констант ионного равновесия в основном состоянии при температурах 283 и 353 К) составило $0,26 \pm 0,01$ и $0,27 \pm 0,01$ для pH 6,0 и pH 6,5, соответственно [A11]. Определено изменение молярной энтальпии реакции диссоциации протона на M-D ступени диссоциации $\Delta_r H$.

Для pH 6,5 было получено значение

$\Delta_r H = 7,4 \pm 0,4 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$, для pH 6,0 значение $\Delta_r H = 7,3 \pm 0,4 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$. Реакция диссоциации (переноса) протона в основном состоянии является эндотермической.

Для оценки изменения равновесия в возбужденном состоянии (pK_a^*), был произведен расчет через цикл Фёрстера (2), где подставлялись значения равновесий в основном состоянии при соответствующих температурах, а оценка изменения волнового числа 0-0 перехода была произведена для каждой ионной

формы отдельно. Величина $\Delta pK_{a\ temp}^*$ (разница равновесий в возбужденном состоянии при температурах 283 и 353К) составила $0,28 \pm 0,4$ для рН 6,0 и $0,27 \pm 0,4$ для рН 6,5. При сравнении с результатом для основного состояния $\Delta pK_{a\ temp}$, можно сделать вывод, что сдвиг показателя ионного равновесия в возбужденном состоянии сонаправлен со сдвигом показателя в основном состоянии, и в пределах ошибки сдвиги имеют идентичные значения.

Спектры флуоресценции растворов флуоресцеина при рН 6,5 и 6,0 были измерены в диапазоне температур 283÷353К. Был найден ратиометрический сигнал S (Рисунок 9) как отношение интегральных интенсивностей на двух различных длинах волн возбуждения 488 (I^{488}) нм и 435(I^{435}) нм на которых преимущественно поглощает D и M форма красителя.

S сигналы при рН 6,5 и 6,0 линейно зависят от температуры ($R^2 > 0,997$). При охлаждении наблюдается реверсивность, т.е. возвращение в исходное положение, что прослеживается для обоих рН. Несмотря на различные начальные значения сигналов, обусловленными рН раствора в экспериментах, дальнейший рост значений происходит с близкими величинами углового коэффициента $1,53 \cdot 10^{-2}$ и $1,54 \cdot 10^{-2} \text{ K}^{-1}$.

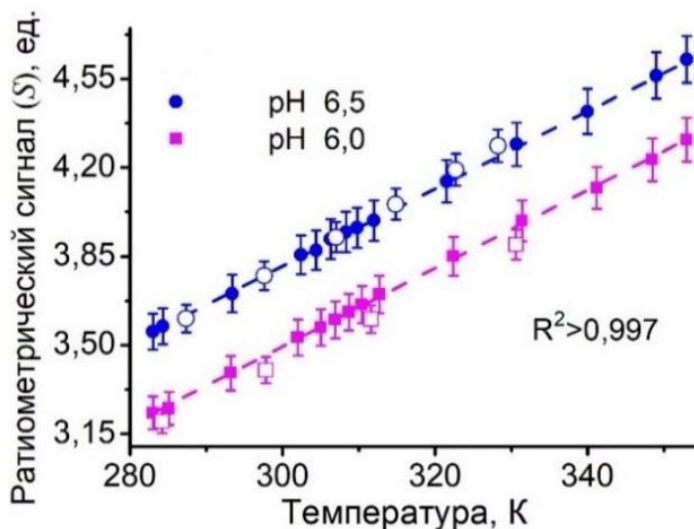


Рисунок 9 — Температурная зависимость ратиометрического (S) в диапазоне температур 283÷353К для рН 6,5 и 6,0. Сплошные символы — цикл нагревания, не закрашенные символы — цикл охлаждения.

Для оценки возможного применения ратиометрического сигнала в качестве оптического аналитического сигнала на локальное значение температуры были сделаны оценки принятых для этого термометрических характеристик. Тепловое разрешение флуоресцентного температурного ратиометрического сигнала составило 7К. Существуют перспективы улучшения разрешения до 2К путем более тщательного контроля рН среды и выбора оптимальной длины волны возбуждения с учетом температурного сдвига спектра поглощения. Кроме того, флуоресцеин, в связи со своей низкой токсичностью, может использоваться как датчик стабильности температуры в режиме реального времени.

В данной главе модель была применена для выяснения вклада процессов, происходящих как в основном так и в возбужденном состояниях, в итоговый ратиометрический сигнал. В диапазоне рН 4÷8, флуоресценция красителя преимущественно складывается из вклада флуоресценции М и D форм.

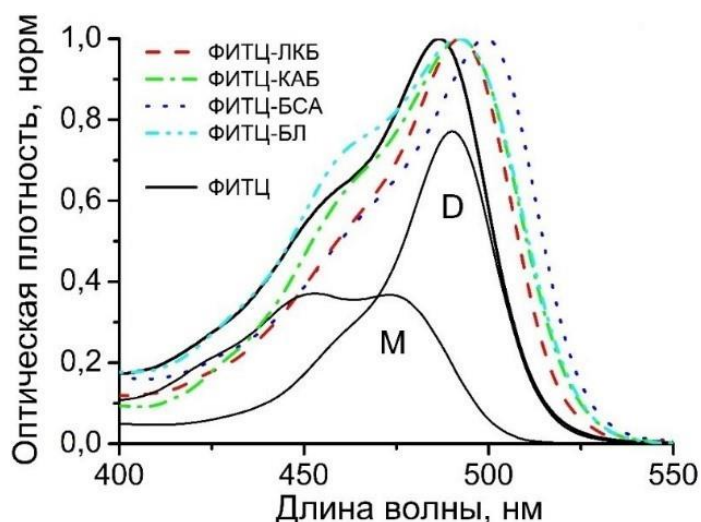
S сигнал был рассчитан на основании модели по формуле (3), учитывающей квантовый выход дианионной и моноанионной форм (ϕ_D , ϕ_M) и их концентрацию в возбужденном состоянии (D^* , M^*) при двух длинах волн возбуждения [A15]:

$$\frac{I^{488}}{I^{435}} = \frac{\phi_M M_{488}^* + \phi_D D_{488}^*}{\phi_M M_{435}^* + \phi_D D_{435}^*}. \quad (3)$$

Модельные S сигналы также, как и экспериментальные, линейны в исследуемом диапазоне температур. Основной вклад в увеличение углового коэффициента вносит изменение равновесия в основном состоянии (I) [A5]. Была рассчитана зависимость углового коэффициента модельного S сигнала от значения рН. Моделирование показало, что его величина углового коэффициента принимает максимальные значения в диапазоне рН 5,5÷7, вблизи показателя константы ионного равновесия М-D ступени диссоциации с максимальным значением в области рK_a (6,31) [9]. Это определяет диапазон практического применения S сигнала флуоресцеина в качестве аналитического сигнала.

В четвертой главе было исследовано влияние гетерогенной фазы белков, которые имеют различные размеры, поверхностные заряды и функциональные свойства на отклик флуоресцентного зонда ФИТЦ (флуоресцеин-5-изотиацианат, аналогичный по своим спектральным свойствам с флуоресцеином, способный ковалентно связываться с белком). Присоединение флуоресцентной метки ФИТЦ к белкам проводили по стандартному протоколу пришивки [13]. Для лизоцима куриного белка (ЛКБ), карбоксиангидразы Б быка II (КАБ), бычьего сывороточного альбумина (БСА), бактериальной люциферазы из *Photobacterium leiognathi* (БЛ) соотношение белок/метка имели значения 0,41, 0,09, 0,36 и 0,24 соответственно. Соотношение не превышало единицу, поскольку большое количество меток на белке могут привести к переносу энергии между метками и изменению структуры меченого белка. Были измерены спектры поглощения и флуоресценции свободного ФИТЦ в растворе и связанного с белками.

Рисунок 10 – Спектры поглощения ФИТЦ, свободного и ковалентно связанного с белками, в буфере рН 6,5 и пример разложения спектров поглощения свободного ФИТЦ на М и D составляющие [A8].



Спектры поглощения ФИТЦ связанного с белками имеют отличную форму из-за изменения ионного равновесия $[D]/[M]$, батохромные сдвиги спектров поглощения флуоресцеина объясняются уменьшением полярности среды (ϵ_{local}). По аналогии с результатами, описанными в главе 3, было проведено разложение спектров поглощения свободного ФИТЦ в растворе и связанной метки с белками на известные контуры двух ионных М и D форм ФИТЦ (Рисунок 10) [A8]. В результате разложения спектра поглощения были определены относительные концентрации ($[D]/[M]$) М и D ФИТЦ в свободном и связанном с белком состояниях. Дополнительно был определен сдвиг максимума спектра поглощения D ($\Delta\lambda_D$) в красную область и соотнесен с полярностью окружения. Результаты показали, что ионное равновесие зонда было нарушено вблизи поверхности белка, величина $[D]/[M]$ варьировалась от 0,90/0,10 (ЛКБ) до 0,24/0,76 (БЛ) для исследованных белков.

Изменение формы спектра флуоресценции не является настолько выраженным как у спектров поглощения, сдвиг максимума флуоресценции не превышал 3 нм. Форма спектров флуоресценции ФИТЦ-ЛКБ не зависит от длины волны возбуждения, что говорит о том, что D форма излучает при обоих условиях возбуждения. Был проанализирован ратиометрический сигнал S свободного и ковалентно связанного зонда с поверхностью белков [A12]. Изменение среднего флуоресцентного времени жизни $\langle\tau_{\text{фл}}\rangle$ для ФИТЦ в связанном состоянии в диапазоне 2,9 нс (для ФИТЦ-БЛ) и 3,8 нс (для ФИТЦ-ЛКБ). Эти крайние значения соответствуют самым высоким значениям $[M]$ и $[D]$ соответственно.

Была измерена стационарная анизотропия флуоресценции r , чтобы в дальнейшем связать ее величину с объемом (V_r) и размером излучателя R_r , вращающейся частицы в соответствии с уравнениями Перрена и Стокса-Эйнштейна-Дебая:

$$\frac{r}{r_0} = 1 + \left\langle \tau_{\text{фл}} \right\rangle \frac{kN_a T}{\eta V_r}, \quad (4)$$

где r_0 – предельная анизотропия, η – вязкость, N_A – число Авогадро. Было получено значение r от 0,024 (для свободного ФИТЦ) до 0,172 (для ФИТЦ-ЛКБ). Предполагая вращение ФИТЦ-ковалентно связанных белков в буфере с вязкостью 1 сП и сферическую форму излучателя, был рассчитан его кажущийся радиус R_r [A13].

Для сравнения полученных спектральных параметров зонда с его локальным окружением были использованы результаты расчета структурных свойств ЛКБ, КАБ, БСА и БЛ с помощью методов молекулярного моделирования. Параметры были получены Л.А. Суковатым. Были рассчитаны следующие характеристики: 1. Общий заряд белка при pH 6,5 q_n , e; 2. Общая площадь поверхности O , нм²; 3. Площадь незаряженной поверхности O_{phob} , нм²; 4. Радиус гирации R_g , нм.

Был проведен корреляционный анализ между экспериментальными и расчетными параметрами. Анализ был проведен на основании значений для четырех белков с использованием коэффициента Пирсона (K).

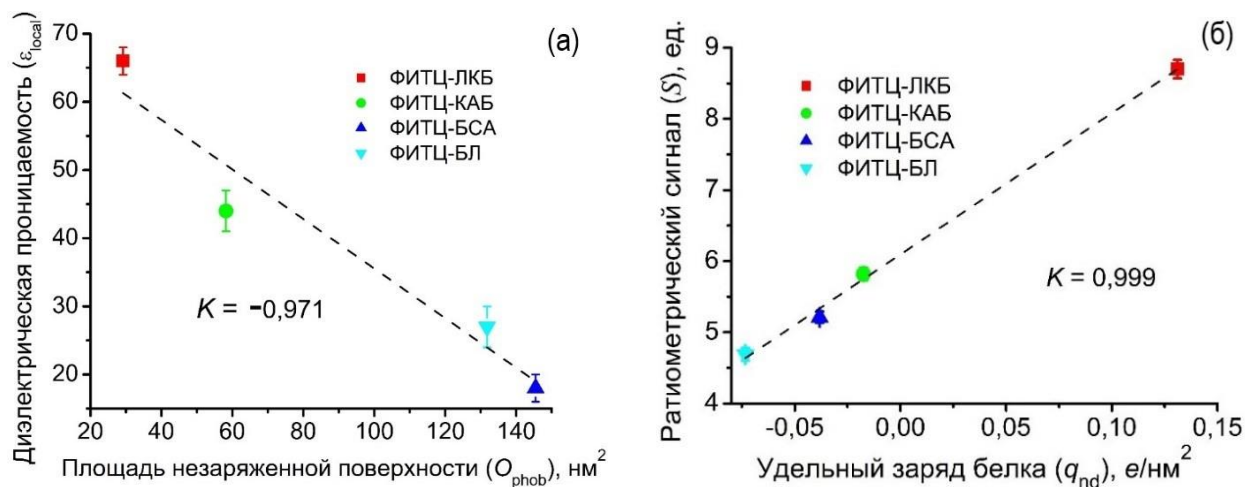


Рисунок 11 – Зависимость диэлектрической проницаемости от площади незаряженной поверхности белков (O_{phob}) (а), зависимость ратиометрического сигнала S от удельного заряда белков (q_{nd}) (б).

Была построена зависимость диэлектрической проницаемости (ϵ_{local}), полученной из анализа эксперимента от рассчитанной площади незаряженной поверхности белков, O_{phob} (Рисунок 11а). Коэффициент Пирсона (K) принял значение $-0,971$, на основании чего можно сделать вывод, что диэлектрическая проницаемость (ϵ) имеет обратную связь с площадью незаряженной поверхности белков. Это подтверждает идею о том, что наблюдаемый спектральный сдвиг D формы ФИТЦ связан с уменьшением полярности среды зонда. Зависимость ратиометрического сигнала S от удельного заряда белков имеет прямую линейную

зависимость с высоким коэффициентом корреляции ($K = 0,999$) (Рисунок 11б). Это позволяет на основе измерения ратиометрического сигнала S оценить удельный заряд белков с высокой точностью.

Для оценки жесткости связывания ФИТЦ с белками сравнивали размеры белков, рассчитанные на основе стационарной анизотропии и среднего флуоресцентного времени жизни (R_r) и молекулярной структуры (R_g) (Рисунок 12) [A13].

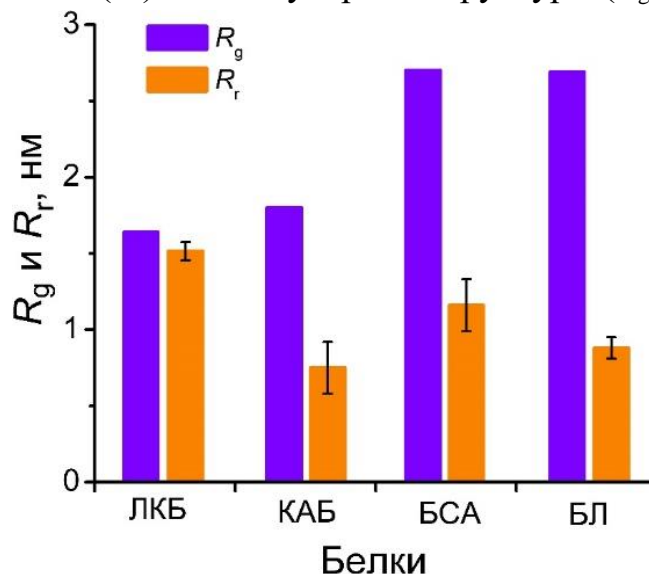


Рисунок 12 – Радиус гирации белков R_g (фиолетовый) и кажущийся радиус вращающегося излучателя R_r (оранжевый) для ФИТЦ ковалентно связанных белков.

Близкие значения R_r и R_g были получены только для ФИТЦ-ЛКБ, тогда как для остальных связанных с зондом белков R_r был ниже R_g как минимум в два раза. Причиной более высокой жесткости связи ФИТЦ с ЛКБ, является электростатическое притяжение между противоположно заряженным зондом и поверхностью белка. Положительный удельный заряд белка обеспечивает жесткость связи макромолекулы с ковалентно пришитой отрицательно заряженной меткой ФИТЦ, что позволяет корректно определять ее размер по анизотропии флуоресценции зонда.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

Определены ионные формы, ответственные за излучение красителя флуоресцеина в широком диапазоне pH. Получены фотофизические параметры ионных форм флуоресцеина в возбужденном состоянии. Впервые разрешены спектры флуоресценции С, Q и М форм. Определены частоты 0–0 перехода С, Q и М форм, 22100 см^{-1} , 20300 см^{-1} , 20300 см^{-1} соответственно. Определены квантовые выходы С, Q и М форм, 0,92, 0,42 и 0,46 соответственно. Определены характерные времена жизни С, Q и М форм, 3,55 нс, 3,00 нс, 3,30 нс соответственно.

Оценены показатели константы ионного равновесия в возбужденном состоянии водных растворов флуоресцеина. pK_a^* для различных степеней диссоциации: $-0,60$ для $C \leftrightarrow Q$, $3,10$ для $C \leftrightarrow Z$, $-0,50$ для $Z \leftrightarrow M$, $3,30$ для $Q \leftrightarrow M$, $5,47$ для

$M \leftrightarrow D$. Определены направления и эффективность переноса протона в возбужденном состоянии. Эффективный перенос протона в возбужденном состоянии заключается в фотоотрыве протона от С с образованием Q, от Z с образованием M, от M с образованием D флуоресцеина. Это приводит к уменьшению величины показателя константы ионного равновесия в возбужденном состоянии указанных ступеней диссоциации по сравнению с основным состоянием на величину от 0,84 до 3,96. Для красителя характерен фотоотрыв протона на всех ступенях диссоциации, что характеризует его как фотокислоту.

Установлена чувствительность спектров поглощения и флуоресценции водных растворов флуоресцеина при фиксированных pH 6,0 и 6,5 к температуре окружения в диапазоне 273÷353 К. Чувствительность проявляется в батохромном сдвиге максимума и изменении формы спектров поглощения и флуоресценции. Количественно влияние температуры оценено аналитическим ратиометрическим сигналом S , который линейен в исследуемом диапазоне температур с угловыми коэффициентами $1,54 \cdot 10^{-2} K^{-1}$ и $1,53 \cdot 10^{-2} K^{-1}$ для pH 6,0 и 6,5 соответственно. Основное влияние на чувствительность радиометрического сигнала выражается в сдвиге равновесия в основном состоянии (на 0,27 ед). Следующим по значимости фактором является температурное изменение формы спектра поглощения рассматриваемых ионных форм. Определен диапазон pH применимости флуоресцеина в качестве флуоресцентного зонда, равный 5,5÷7.

Противоположно заряженные ФИТЦ и белок (лизозим куриного белка) при pH 6,5 обеспечивают жесткую связь, что выражается в повышенном значении анизотропии флуоресценции (0,17). При анализе спектрального сдвига и ионного равновесия ФИТЦ, ковалентно связанного с четырьмя различными белками, были определены локальные параметры на поверхности белков. Спектральный сдвиг максимума D формы ФИТЦ, связанного с четырьмя различными белками, был связан с локальной диэлектрической проницаемостью. Ратиометрический флуоресцентный сигнал S имеет высокую корреляцию как экспериментальным параметром смещения равновесия ФИТЦ ($[D]/[M]$), так и удельным зарядом белка.

Полученные результаты вносят вклад понимание механизмов переноса протона в основном и возбужденном состояниях в люминесцентных свойствах флуоресцеина. Исследование направлено на развитие методов флуоресцентного зондирования функционально значимых биологических систем, в частности, на повышение информативности сигнала флуоресцеинового зонда, связанного с белковыми макромолекулами.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи из перечня ВАК и приравненных к ним работ

- [A1] Surzhikova, D. Emission properties of fluorescein in strongly acidic solutions / D. Surzhikova, M. Gerasimova, V. Tretyakova, A. Plotnikov, E. Slyusareva // J. Photochem. Photobiol. A. – 2021. – V.413 – №113233.
- [A2] Surzhikova, D.P. Protolytic Equilibrium of Excited States of Fluorescein / D.P. Surzhikova, M.A. Gerasimova, E.A. Slyusareva // Russ. Phys. J. – 2022. – V.64. – Is.11. – P.2102-2109.
- [A3] Surzhikova, D.P. Functioning of a Fluorescein pH-Probe in Aqueous Media: Impact of Temperature and Viscosity / D.P. Surzhikova, L.A. Sukovatyi, E.V. Nemtseva, E.N. Esimbekova, E.A. Slyusareva // Micromachines. – 2023. – V.14. – №1442.
- [A4] Surzhikova, D.S. Effect of Phosphate Ions on the Dianion–Anion Equilibrium of Fluorescein Excited State / D.S. Surzhikova, M.A. Gerasimova, E.A. Slyusareva // Bull. Russ. Acad. Sci.: Phys. – 2022. – V.86. – Is.10. – P.1203-1206.
- [A5] Surzhikova, D.P. Mechanisms of temperature dependence of the ratiometric signal of fluorescein / D. P. Surzhikova, N.Yu. Romanova, E.A. Slyusareva // Proc. of SPIE. – 2023. – V. 12920. – №. 129200Z.

Материалы в сборниках всероссийских и международных конференций

- [A6] Суржикова, Д.П. Флуоресцентные свойства флуоресцеина в экстремально кислых средах / Д.П. Суржикова, Е.А. Слюсарева // В сборнике: Проспект Свободный-2020. Материалы XVI Международной конференции студентов и молодых ученых, посвященной году памяти и славы 75-летию Победы в Великой Отечественной войне 1941–1945 годов. – 2020. – С. 860–862.
- [A7] Суржикова, Д.П. Влияние температуры на ионное равновесие флуоресцентного pH-зонда / Д.П. Суржикова, Е.А. Слюсарева // В сборнике: Проспект Свободный – 2023. Материалы XIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. – Красноярск. – 2023. – С. 3199–3201.
- [A8] Боргоякова, А.В. Влияние локализации зонда на поверхности разнотаряженных белков на его спектральные свойства / А.В. Боргоякова, Д.П. Суржикова Е.А. Слюсарева / В сборнике: Проспект Свободный – 2024. Материалы юбилейной XX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. – Красноярск. – 2024. – Т.4 – С. 520-523.

Тезисы в сборниках всероссийских и международных конференций

- [A9] Суржикова, Д.П. Влияние фосфат-ионов на дианион-анионное равновесие флуоресцеина в возбужденном состоянии / Д.П. Суржикова, М.А. Гераси-

мова, Е.А. Слюсарева // В книге: Енисейская Фотоника – 2022. Всероссийская научная конференция с международным участием сборник научных трудов. – Красноярск. – 2022. – Т. 2. – С. 159-160.

[A10] Суржикова, Д.П. Спектральные и кислотно-основные характеристики ионных форм флуоресцеина в возбужденном состоянии / Д.П. Суржикова, В.И. Третьякова, М.А. Герасимова, Е.А. Слюсарева // В книге: Енисейская фотоника-2020. – Тезисы докладов. – 2020. – С. 142-143.

[A11] Суржикова, Д.П. Механизмы влияния на температурный флуоресцентный сигнал флуоресцеина / Д.П. Суржикова, Е.А. Слюсарева // В книге: Материалы XIX Международной молодежной конференции по люминесценции и лазерной физике. – Иркутск. – 2023. – С. 191–192.

[A12] Суржикова, Д.П. Индикативные свойства флуоресцентной метки ФИТЦ при ковалентном связывании с белками / Д.П. Суржикова, А.В. Боргоякова, Е.В. Немцева, Е.А. Слюсарева // В сборнике: Lumos, Всероссийская конференция по люминесценции сборник тезисов. – 23-26 апреля 2024 МГУ имени М.В. Ломоносова – Москва. – 2024. – С. 174.

[A13] Суржикова, Д.П. Спектральные исследования жесткости связи флуоресцентной метки на основе флуоресцеина с белками разной структуры / Д.П. Суржикова, Л.А. Суковатый, Е.В. Немцева, Е.А. Слюсарева // В сборнике: Енисейская Фотоника – 2024. Всероссийская научная конференция с международным участием сборник научных трудов. – Красноярск. – 2024. – С. 124–125.

Свидетельство о гос. регистрации программы для ЭВМ

[A14] Суржикова, Д.П. Программа расчета протолитического равновесия органического красителя с трехступенчатой диссоциацией в основном и возбужденном состояниях / Д.П. Суржикова, Е.А. Слюсарева, А.С. Ципотан, А.В. Шамшуринов // Свидетельство о гос. регистрации программы для ЭВМ: 2021616577, от 23.04.2021.

[A15] Суржикова, Д.П. Программа расчета равновесной концентрации ионных форм органического флуорофора с учетом влияния термодинамического и кинетического факторов на трехступенчатую диссоциацию / Д.П. Суржикова, Е.А. Слюсарева, А.В. Шамшуринов // Свидетельство о гос. регистрации программы для ЭВМ: 2022669602, от 21.10.2022.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

[1] Moore, G.E. Fluorescein as an agent in the differentiation of normal and malignant tissues / G.E. Moore // Science. – 1947. – V.106. – P.130-131.

- [2] Koc, K. Fluorescein sodium-guided surgery in glioblastoma multiforme: A prospective evaluation / K. Koc, I. Anik, B. Cabuk, S. Ceylan // *Br. J. Neurosurg.* – 2008. – V.22. – P.99-103.
- [3] Bandamwar, K.L. Fluorescein staining and physiological state of corneal epithelial cells / K.L. Bandamwar, E.B. Papas, Q. Garrett // *Contact Lens Anterio.* – 2014. – V.37. – Is.3. – P.213-223.
- [4] AL-Aqmar, D.M. Spectroscopic properties and amplified spontaneous emission of fluorescein laser dye in ionic liquids as green media / D.M. AL-Aqmar, H.I. Abdelkader, M.T.H. Abou Kana // *Optical Materials.* – 2015. – V.47. – P.573-581.
- [5] Aydin, M.E. Molecular control over Ag/p-Si diode by organic layer / M.E. Aydin, F. Yakuphanoglu // *J. Phys. Chem. Solids.* – 2007. – V.68. – Is.9. – P.1770-1773.
- [6] Sharma, G.D. Quasi solid state dye sensitized solar cells employing a polymer electrolyte and xanthene dyes / G.D. Sharma, P. Balraju, M. Kumar, M.S. Roy // *Mater. Sci. Eng. B.* – 2009. – V.162. – P.32-39.
- [7] Sjöback, R. Absorption and fluorescence properties of fluorescein / R. Sjöback, J. Nygren, M. Kubista // *Spectrochim. Acta A.* – 1995. – V.51. – Is.6. – P.L7-L21.
- [8] Martin, M.M. The pH dependence of fluorescein fluorescence / M.M. Martin, L. Lindqvist // *J. Lumin.* – 1975. – V.10. – Is.6. – P.381-390.
- [9] Klonis, N. Spectral properties of the prototropic forms of fluorescein in aqueous solution / N. Klonis, W.H. Sawyer // *J. Fluoresc.* – 1996. – V.6. – P.147-157.
- [10] Togashi, D.M. Investigating tryptophan quenching of fluorescein fluorescence under protolytic equilibrium / D.M. Togashi, B. Szczupak, A.G. Ryder, A. Calvet, M. O'Loughlin // *J. Phys. Chem. A.* – 2009. – V.113. – Is.12. – P.2757-67.
- [11] Slyusareva E.A. pH-Dependence of the Absorption and Fluorescent Properties of Fluorone Dyes in Aqueous Solutions / E.A. Slyusareva, M.A. Gerasimova // *Russ. Phys. J.* – 2014. – V.56. – P.1370–1377.
- [12] Israelachvili, J.N. Intermolecular and Surface Forces: With Applications to Colloidal and Biological Systems / J.N. Israelachvili // Academic Press, London; Orlando Fla, 1985. – 710 c.
- [13] Hungerford, G. Effect of the labelling ratio on the photophysics of fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated to bovine serum albumin / G. Hungerford, J. Benesch, J.F. Mano, R.L. Reis // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2007. – V.6. – P.152-158.

Подписано в печать 11.04.2025. Печать плоская. Формат 60х84/16
Бумага офсетная. Усл. печ. л. 1,5. Тираж 80 экз.
Отпечатано полиграфическим центром
Библиотечно-издательского комплекса
Сибирского федерального университета
660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 82а
Тел./факс: (391) 206-25-88; тел. (391) 206-26-16
E-mail: publishing_house@sfu-kras.ru; <https://bik.sfu-kras.ru>