

ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ НЕЛИНЕЙНОГО ХАРАКТЕРА ДИНАМИКИ ДЕЗАКТИВАЦИИ ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ ТРИПТОФАНА В РАЗЛИЧНЫХ СРЕДАХ

© 2023 г. В. В. Горохов¹, П. П. Нокс¹, Б. Н. Корватовский¹, Н. Х. Сейфуллина¹, С. Н. Горячев¹, Н. П. Гришанова¹, В. З. Пашенко^{1*}, А. Б. Рубин¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: vz.paschenko@gmail.com

Поступила в редакцию 11.01.2022;

после доработки 18.01.2022;

принята в печать 20.01.2022

Представлен обзор работ авторского коллектива по исследованию динамики возбужденных состояний триптофана в различных растворителях в зависимости от температуры ($-170 \div +20^\circ\text{C}$). Был обнаружен антибатный ход температурных зависимостей времен затухания двух компонент (быстрой и средней) флуоресценции триптофана в температурном диапазоне от -60 до $+10^\circ\text{C}$. Третья, медленная, компонента показывала слабую зависимость от температуры. Антибатное поведение времен затухания двух компонент кинетики флуоресценции моделировали в предположении, что в определенном температурном интервале происходит переход части молекул триптофана, находящихся в возбужденном состоянии, из коротковолновой ротамерной В-формы, обладающей коротким временем жизни флуоресценции, в длинноволновую ротамерную R-форму с промежуточным временем жизни флуоресценции. Для объяснения наблюдаемых изменений в спектрах и длительности флуоресценции триптофана в зависимости от температуры была также разработана новая модель переходов между возбужденным и основным состояниями с привлечением состояния с переносом заряда (CTS), учитывающая нелинейный характер динамики этих переходов. В данных процессах важную роль играет взаимодействие молекул триптофана с его микроокружением, а также перестройки в системе водородных связей в окружении молекулы триптофана. Выделены три основные спектральные области флуоресценции триптофана, отличающиеся различным поведением температурных зависимостей скоростей перехода из возбужденного состояния триптофана в CTS. Показана ключевая роль динамики системы водородных связей, определяющих нелинейный характер изменения параметров флуоресценции триптофана в выделенных спектральных областях.

Ключевые слова: триптофан, кинетика флуоресценции, температурная зависимость, водородные связи, молекулярная динамика.

DOI: 10.31857/S0207401X23060055, **EDN:** UHHZSJ

ВВЕДЕНИЕ

Функциональная активность главных “исполнительных” молекул любой живой системы — белков существенно зависит от их конформационной динамики — способности к конформационным перестройкам, необходимым для реализации их специфических функций [1]. Считается, что решающее значение для функционально значимых конформационных изменений имеют быстрые стохастические структурные флуктуации в пико или наносекундном временном интервале [2] между различными конформационными подсостояниями белковых молекул [3]. Полагают, что белки характеризуются большим набором этих конформационных подсостояний, разделенных локальными энергетическими барьерами и отражающих сложные рельефы их энергетических поверхностей. Поскольку

высоты данных энергетических барьеров могут значительно варьировать, временная шкала белковой подвижности может охватывать диапазон в несколько порядков величины [4, 5].

При понижении температуры стохастическая белковая подвижность замедляется и может локализоваться на временной шкале, характерной для специфического функционального процесса, осуществляемого конкретным белком. На динамические характеристики белка существенное воздействие оказывают также тип и количество окружающих его молекул растворителя (прежде всего — воды). Эти молекулы создают локальный поверхностный слой, который может действовать как пластификатор или, наоборот, как стабилизатор конформационных мод, соответственно облегчая или затрудняя переходы между конформационными

ми подсостояниями [3, 6]. Следовательно, подвижность белка, влияющая на его функциональную активность, может быть модифицирована не только с помощью температурного фактора, но и путем внедрения белка в матрицу полимерного геля, сольватации различными криорастворителями и дегидратации [6–10].

Флуоресцентная спектроскопия триптофанилов в составе белков широко используется в качестве природного внутреннего индикатора конформации белков, их динамики, межмолекулярных взаимодействий. Известно, что динамическое (спектрально-кинетическое) поведение молекул триптофана (Trp) очень чувствительно к состоянию окружающей среды [11, 12]. Флуоресценция индольного хромофора высокочувствительна к состоянию его окружения, в результате чего он является индикатором даже небольших изменений в этом окружении [13]. Если структура белков известна, то изменения триптофановой флуоресценции могут быть, в принципе, интерпретированы в терминах структурных изменений на уровне атомного разрешения. В качестве показателя состояния внутримолекулярной динамики белка, в том числе при понижении/повышении температуры, уже давно определяют положение максимума спектра флуоресценции белковых триптофанилов, характеризуемое релаксационными параметрами полярного окружения возбужденного хромофора [14, 15]. Сложнее обстоит ситуация с интерпретацией влияния состояния окружения на длительность флуоресценции белковых триптофанилов. Детальное выяснение природы локальных изменений окружения триптофановых остатков в структуре белка, влияющих на регистрируемые в эксперименте температурные зависимости длительности флуоресценции, требует тщательных комплексных исследований. Возможным подходом на этом пути является изучение температурных зависимостей времен жизни флуоресценции Trp в различных средах.

Исследование динамики окружения возбужденных биологических молекул, ее влияния на фотофизические и фотохимические переходы в таких системах, роли водородных связей в динамике этих переходов остается актуальной экспериментальной и теоретической задачей. В свое время академик В.И. Гольдманский в ряде пионерских работ уделил большое внимание объяснению нарушения зеркальной симметрии биологических молекул при их возбуждении в результате неравновесного фазового перехода окружающей среды [16]. Он отмечал, что эксперименты по моделированию процесса возникновения и нарушения асимметрии в хиральных системах до настоящего времени практически ограничивались лишь экспериментами с различными биомолекулами (и некоторыми исследованиями связи матричного синтеза олигонуклеотидов с хиральным составом среды), причем изучались в основном про-

цессы деструкции или каталитического синтеза. Однако экспериментальный поиск необходимо вести и в направлении реализации систем, в которых цепи физико-химических превращений создают положительные обратные связи по хиральной поляризации продуктов — систем со спонтанным нарушением зеркальной симметрии. В.И. Гольдманский отмечал, что интерес представляют и эксперименты по исследованию процесса стабилизации хиральности молекул изомеров в твердых телах и растворах при низких температурах, которые моделировали бы условия перехода фотоактивных молекул в несимметричную форму, фактически предлагая тем самым измерять температурные зависимости процессов переходов фотоактивных белков для таких систем.

В представленном обзоре наших работ в качестве модельной системы исследовались фотофизические переходы в возбужденных молекулах триптофана, находящихся в разном микроокружении (в водном растворе, в глицерине, в водном растворе трегалозы, в водно-белковой среде). Проводились исследования температурных зависимостей кинетики флуоресценции Trp. Для некоторых сред данные температурные зависимости носили аномальный характер. Для объяснения такого аномального характера использовалась концепция неравновесного фазового перехода в данных средах, приводящих к нелинейному взаимодействию возбужденных состояний Trp с окружением, вызывающему изменение их конформационного состояния. При этом в водных растворах существенное влияние на динамику таких переходов возбужденных молекул триптофана оказывают водородные связи.

ПЕРЕХОДЫ МЕЖДУ РОТАМЕРАМИ ТРИПТОФАНА В ВОЗБУЖДЕННОМ СОСТОЯНИИ

В литературе уже давно было отмечено, что кинетика флуоресценции триптофана в водном растворе состоит из двух-трех отчетливых компонент в зависимости от pH и трех компонент в присутствии органических растворителей типа метанола, этанола или диметилсульфоксида. Это объясняется наличием ротамеров вокруг связи α -C– β -C [17, 18]. При этом наблюдение двух, а не трех компонент может быть обусловлено близкими временами жизни двух компонент или незначительным квантовым выходом одного из них. Также понижение температуры, согласно работе [19], может приводить к “вымораживанию” определенных ротамеров. Данная точка зрения впоследствии подтверждалась во многих исследованиях [20–24].

Наши исследования температурных зависимостей длительности флуоресценции триптофана в 50%-ном водно-глицериновом растворе и в 1 М водном растворе трегалозы показали, что при

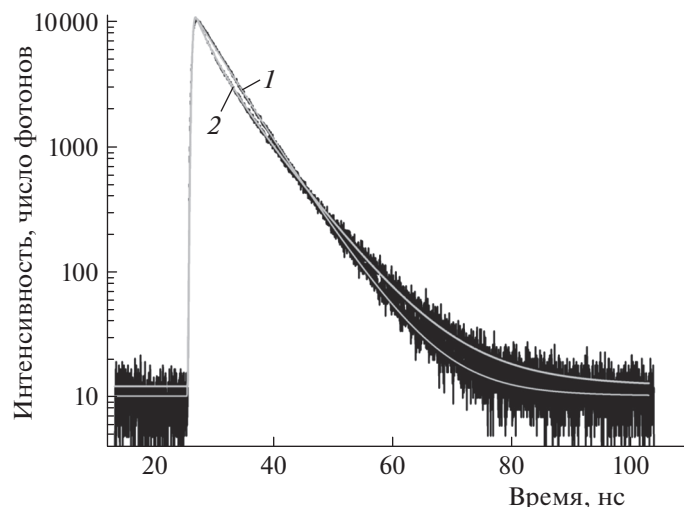


Рис. 1. Кинетические кривые затухания флуоресценции триптофана в водно-глицерином растворе при температуре -100 (1) и -30°C (2).

комнатной температуре кинетика флуоресценции в обоих случаях хорошо аппроксимируется тремя экспонентами со временами $\tau_1 \approx (4 \pm 0.05)$ нс, $\tau_2 \approx (6.5 \pm 0.08)$ нс и $\tau_3 \approx (12.5 \pm 0.2)$ нс. Согласно нашим результатам [25], сложный характер кинетики затухания флуоресценции молекул триптофана в растворе и в составе белков можно объяснить наличием трех возможных ротамеров индольных колец вокруг связи $\alpha\text{-C}-\beta\text{-C}$, возникающих в результате электростатических взаимодействий в молекуле Тгр. При этом заселенность одного из ротамеров обычно существенно выше, чем двух других. В свою очередь, из двух последних ротамеров один также преобладает по заселенности. В случае, когда молекулы триптофана находятся в составе белковой матрицы, в дополнение к явным ротамерам боковой цепи Тгр специфической причиной гетерогенности кинетики регистрируемого сигнала флуоресценции являются микроконформационные состояния белков в локальном окружении индольного кольца. Поэтому для белков правильнее говорить о конформерах вместо ротамеров [20]. Для описания кинетики затухания флуоресценции триптофанов в белке больше подходит непрерывное распределение времен жизни, чем описание с использованием дискретного набора экспонент. Физической основой для таких распределений являются взаимные переходы между различными конформациями, каждая из которых характеризуется квазиконтинуумом энергетических подсостояний для триптофанового остатка в различных окружениях [20]. Вместе с тем и описание дискретными экспонентами, очевидно, может дать адекватную качественную картину характера происходящих в исследуемых образцах изменений состояния флуоресцирующих хромофоров при широком варьировании

температуры среды. Мы смоделировали эту ситуацию для регистрируемой температурной зависимости кинетики флуоресценции водных растворов триптофана в глицерине и трегалозе.

На рис. 1 приведены экспериментальные кинетические кривые затухания флуоресценции триптофана и их аппроксимация при температурах -100 и -30°C . Видно, что трехэкспоненциальное приближение хорошо описывает кинетику затухания флуоресценции. Точность определения при данном трехэкспоненциальном приближении (95%-ный доверительный интервал) короткой компоненты времени затухания флуоресценции составляет примерно ± 50 пс, промежуточной компоненты — ± 80 пс и длинной компоненты — ± 200 пс. Пример полученного набора спектров DAS (decay associated spectra) разложения кинетик флуоресценции в трехэкспоненциальном приближении для триптофана в водно-глицериновой среде при температурах -100 и -30°C показан на рис. 2.

Результаты анализа спектрально-временных параметров флуоресценции (рис. 1) показали, что в исследуемых образцах при низких температурах триптофан присутствует главным образом в двух ротамерных формах, отвечающих коротковолновой (“голубой”, В) и длинноволновой (“красной”, R) областям спектра флуоресценции. При температуре жидкого азота В-форма характеризуется временем жизни $\tau_1 \approx 4.8$ нс и максимумом флуоресценции в спектре при $\lambda \approx 295$ нм; R-форма при этой температуре имеет время жизни флуоресценции $\tau_2 \approx 6.5$ нс с максимумом при $\lambda \approx 315$ нм. Вклад третьей формы с $\tau_3 = 12.5$ нс мал, и в последующем кинетическом анализе мы его не учитывали.

Из приведенных данных следует, что длительности компонент кинетики затухания флуорес-

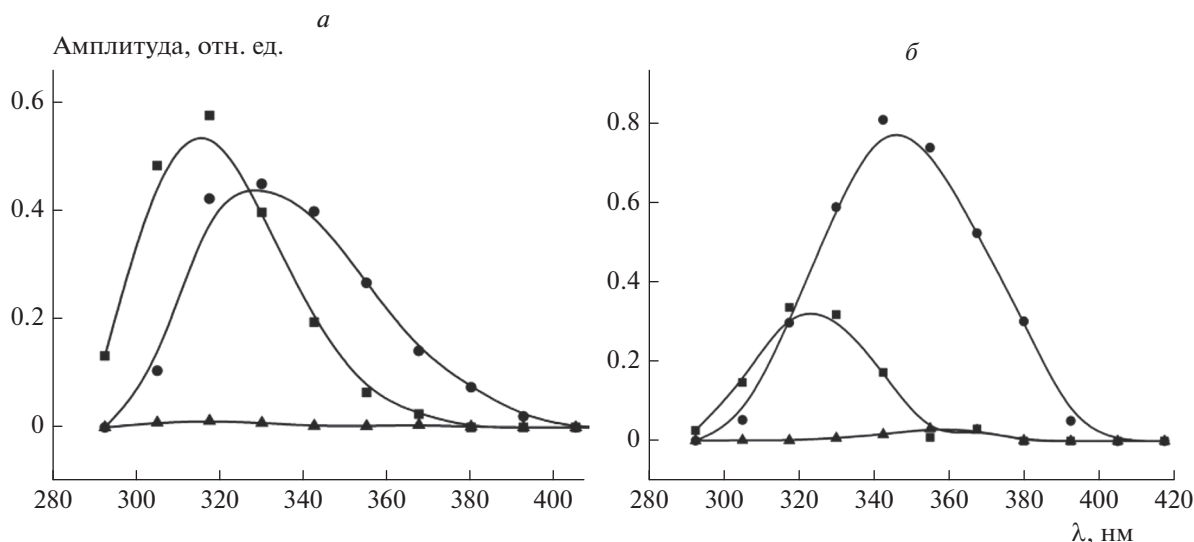


Рис. 2. Спектральное распределение амплитуд при трехэкспоненциальном разложении кинетики затухания флуоресценции триптофана при температурах -100 (а) и -30 °С (б); ■, ●, ▲ – спектры быстрого, промежуточного и медленного компонентов кинетики флуоресценции.

ценции (рис. 3) и их спектральные амплитуды (данные не приводятся) существенным образом зависят от температуры. Наиболее характерным для триптофанов как в водных растворах глицерина и трегалозы является существование температурной области, в которой времена жизни флуоресценции В- и R-форм изменяются антибатно. Длительность третьей компоненты во всей области температур была практически постоянной (данные не приводятся), при этом ее спектральная амплитуда оставалась незначительной (рис. 2). Как видно из рис. 3, переход части В-формы ротамеров в R-форму, попадает в область температур выше -50 °С. Это та область, в которой происходит разморозивание исследованных нами застеклованных растворов. Так, по данным дифференциальной сканирующей калориметрии для $\sim 30\%$ -ного (по весу) раствора трегалозы в воде точка стеклования (T_g) составляет около -42 °С [26]. Согласно данным из работы [26], раствор трегалозы при этой концентрации частично кристаллизуется в ходе нагревания в интервале между температурами стеклования и плавления (около -10 °С). Иными словами, в ходе нагревания застеклованного раствора в этой области происходят существенные изменения внутримолекулярной динамики системы, которые и приводят к наблюдаемому переходу между ротамерами триптофана. Сходные процессы, очевидно, протекают и в ходе нагревания замороженного 50%-ного раствора глицерина. Очевидно, что состав растворителя, определяющий механизм его взаимодействия с индольным ядром и аланильной боковой цепью молекулы Trp, явным образом влияет на величину конкретных соотношений популяций разных

ротамеров, фиксируемых при самой низкой температуре (-170 °С).

Из табл. 1 видно, что по сравнению с чисто водным раствором точка, соответствующая температуре половинного сдвига λ_{max} первой компоненты τ_1 , смещается к ≈ -30 и ≈ -40 °С в растворах, содержащих по 50% глицерина и ДМСО соответственно. При увеличении содержания глицерина и ДМСО до 75% эта точка снова смещается к более высоким температурам: к -12 и -22 °С соответственно. Этот факт является дополнительным подтверждением связи температурной области регистрируемых нами переходов между ротамерами Trp с молекулярной динамикой окружающего растворителя. Действительно, температуры затвердевания водных растворов как глицерина, так и диметилсульфоксида (ДМСО) немономонно зависят от соотношения глицерин/ H_2O и ДМСО/ H_2O . При смешивании двух чистых компонентов растворителя – глицерина и H_2O температура затвердевания (замерзания) раствора понижается по мере увеличения массовой доли глицерина вплоть до -38 °С при 70%-ном содержании глицерина. При дальнейшем же увеличении концентрации глицерина температура замерзания резко повышается. Аналогичная картина наблюдается и с водными растворами ДМСО с тем уточнением, что минимальные температуры затвердевания смеси ДМСО/ H_2O еще более низкие, чем у смесей глицерина с водой [27–29]. Что касается раствора трегалозы, то на основании второго закона Рауля [30] можно оценить, на какую величину должна понизиться температура замерзания чистой воды в присутствии 1 М трегала-

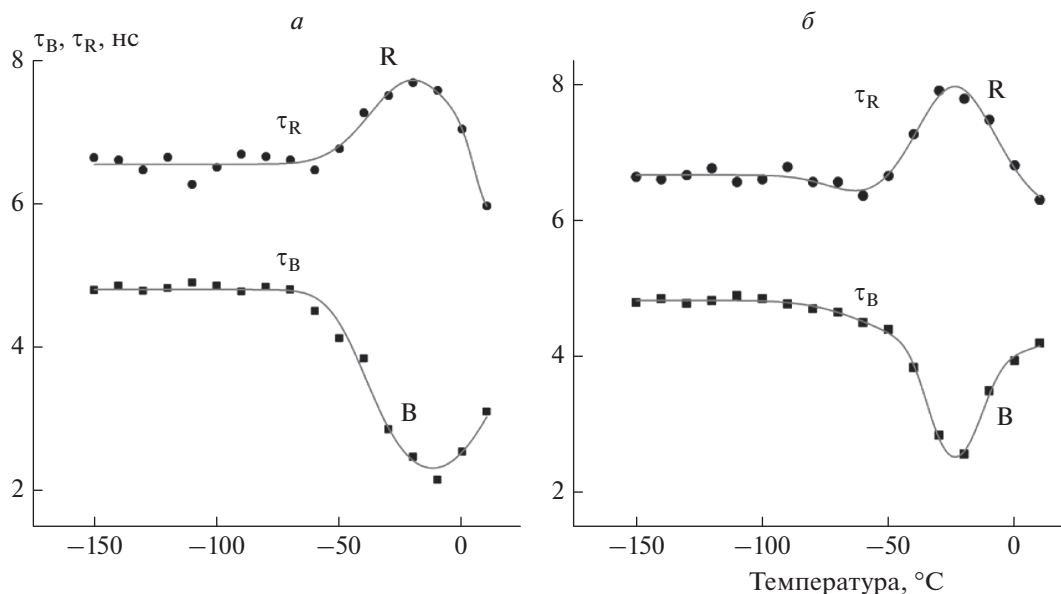


Рис. 3. *а* – Температурная зависимость длительности флуоресценции В- и R-форм триптофана в водно-глицериновом растворе; *б* – температурная зависимость длительности флуоресценции В- и R-форм триптофана в трегалозе.

лозы. Оказывается, что эта температура составляет $\sim -3^\circ\text{C}$, что практически совпадает с величиной половинного сдвига λ_{max} первой компоненты кинетики флуоресценции Тгр в растворе трегалозы: -5°C (см. табл. 1).

Таким образом, при определенной температуре в среде возникают условия для перехода части В-формы ротамеров в R-форму. Как будет показано ниже, это происходит в результате попадания точки пересечения электронных поверхностей возбужденных состояний двух форм ротамеров в область перекрывания спектров локальных колебаний этих ротамеров в данной области энергии. Как следствие, происходит увеличение скорости затухания флуоресценции В-формы ротамеров (уменьшение времени жизни) и замедление скорости затухания флуоресценции R-ротамеров (увеличение времени жизни). Условия для перехода $\text{B}^* \rightarrow \text{R}^*$ носят резонансный характер типа гауссовой зависимости, аналогичный характеру перекрытия спектров локальных колебаний.

Отвечающие длительностям флуоресценции τ_1 , τ_2 и τ_3 типы ротамеров триптофана 1, 2, 3 определяются смещением индольного кольца вокруг связи $\alpha\text{-C}-\beta\text{-C}$ на различные углы: 0° , 60° и 120° соответственно. Переход от ротамера 1* к ротамеру 2* (звездочка обозначает возбужденные состояния ротамеров) сопряжен с преодолением потенциального барьера ~ 4.4 ккал/М ($E_a \approx 1550$ см $^{-1}$) [31]. Предлагаемая схема динамики потенциальных поверхностей для акцептирующих мод ротамеров Тгр в возбужденном состоянии показана на рис. 4.

Принцип работы этой схемы (рис. 4) состоит в следующем. При таком расположении потенциальных поверхностей вследствие большой величины энергии активации E_a надбарьерный переход из B^* в R^* -форму затруднен. Однако если предположить, что при повышении температуры взаимное положение индольных колец триптофана изменяется, потенциальная поверхность B^* -формы может сблизиться с потенциальной поверхностью R^* -формы, при этом условия для перехода $\text{B}^* \rightarrow \text{R}^*$ существенно облегчаются. Можно отметить, что переходы между различны-

Таблица 1. Зависимость отношения спектральных вкладов A_1/A_2 и температуры половинного сдвига λ_{max} спектра первой компоненты кинетики флуоресценции Тгр от растворителя

Растворитель	A_1/A_2 (-170°C)	Температура половинного сдвига λ_{max} первой компоненты флуоресценции, $^\circ\text{C}$
H_2O	1.54	-20
Глицерин – 50%	1.86	-30
Глицерин – 75%	2.3	-12
ДМСО – 50%	≈ 1	-40
ДМСО – 75%	≈ 1	-22
Трегалоза – 1 М	1.27	-5

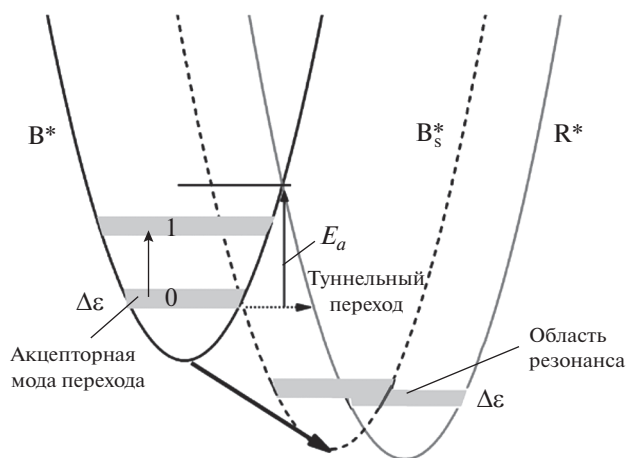


Рис. 4. Схема динамики потенциальных поверхностей возбужденных состояний ротамерных форм триптофана V^* и R^* при повышении температуры. Жирной стрелкой показано движение потенциальной поверхности V^* к потенциальной поверхности R^* при изменении температуры; E_a — энергия активации перехода $V^* \rightarrow R^*$; 0, 1 — нулевой и первый колебательный уровни энергии V -ротамера; $\Delta\epsilon$ — ширина спектра акцепторной моды.

ми ротамерными формами Тгр в некотором приближении аналогичны переходам в возбужденных фотоактивных биологических молекулах, сопровождающимся изменением их симметрии [16].

Для описания безызлучательных переходов в ароматических молекулах типа бензола справедливо приближение локальных мод, когда в качестве акцепторных мод рассматриваются различные колебания валентных связей [32]. Для ароматических циклических соединений акцепторные моды перехода связаны с колебаниями C—H-групп, при этом расстояния между колебательными уровнями достаточно велики (рис. 4). Мы считаем, что для перехода $V^* \rightarrow R^*$ активными являются деформационные колебания вне плоскости индольного макроцикла, частота которых составляет $\sim 1300 \text{ см}^{-1}$ [33].

При низких и комнатных температурах акцептирующая мода перехода $V^* \rightarrow R^*$ с подавляющей вероятностью находится в основном состоянии (рис. 4), при этом расстояние между нулевым и первым колебательными уровнями составляет для деформационных колебаний $\sim 1300 \text{ см}^{-1}$. При достаточно высокой энергии реорганизации среды активационный барьер перехода является большим (рис. 4, E_a). В результате при обычных условиях переход V^* -формы ротамера в R^* -форму происходит по туннельному механизму с низкой скоростью.

В области температуры стеклования среды в ближайшем окружении молекулы триптофана могут происходить значительные флуктуации

структуры, в том числе микроконформационные переходы, связанные с перестройкой водородных связей и зарядовых групп. Такой процесс может вызывать поворот индольного кольца ротамера в V^* -форме на некоторый угол в направлении к его положению в R^* -форме, что приводит к смещению потенциальной поверхности V^* -состояния в сторону потенциальной энергии R^* -состояния и, как следствие, к уменьшению энергии реорганизации и снижению активационного барьера перехода $V^* \rightarrow R^*$ (рис. 4). Более того, при определенной температуре может произойти совпадение колебательных спектров акцепторной моды для разных потенциальных поверхностей, в результате чего деформационная колебательная мода становится активной для перехода $V^* \rightarrow R^*$.

На рис. 4 этот момент изображен промежуточным положением потенциальной поверхности V^* . Таким образом, при изменении температуры может происходить совмещение (резонанс) спектров локальных колебаний молекулы ротамера триптофана в возбужденном состоянии для V^* - и R^* -форм.

При дальнейшем увеличении температуры происходит нарушение этого резонанса. При этом время затухания τ_b начинает возвращаться к первоначальному значению, составляющему 4.8 нс. Однако время затухания τ_R не возвращается к величине в 6.5 нс, а продолжает уменьшаться и при $T > 0^\circ \text{C}$ падает ниже 6 нс, так как для R -формы, вероятно, открывается свой канал дополнительного тушения флуоресценции, например канал перехода данного ротамера в третью форму.

Отметим, что правильное описание антибатного характера температурной зависимости компонентов кинетики затухания флуоресценции триптофана возможно только в предположении, что переход $V \rightarrow R$ происходит в возбужденном состоянии молекулы Тгр.

ДИНАМИКА ПЕРЕХОДОВ МЕЖДУ ВОЗБУЖДЕННЫМИ СОСТОЯНИЯМИ ТРИПТОФАНА С УЧАСТИЕМ СОСТОЯНИЯ С ПЕРЕНОСОМ ЗАРЯДА

Для объяснения антибатного характера наблюдаемых температурных зависимостей можно также использовать модель, описывающую переход молекулы Тгр из возбужденного состояния (Trp^*) в состояние с разделенными зарядами ($\text{Trp}^* \rightarrow \text{CTS}$, где CTS — состояние с переносом заряда (Charge Transfer State)), обратный переход $\text{CTS} \rightarrow \text{Trp}^*$, а также излучательный и безызлучательный переходы CTS в основное состояние. Физический смысл процессов перехода в данной модели иной, чем в ротамерной модели, использованной нами в работе [34]. Суть отличий состоит в том, что в ротамерной модели трехкомпо-

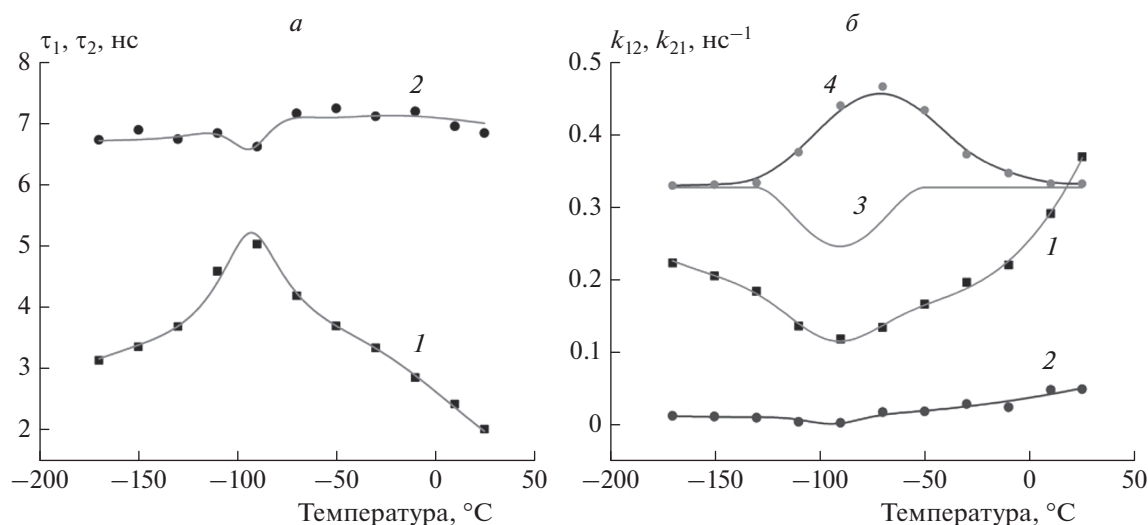


Рис. 5. *a* — Температурная зависимость τ_1 (1) и τ_2 (2) — быстрой и медленной компонент времен кинетики затухания флуоресценции триптофана в водном растворе; *б* — температурная зависимость констант скорости k_{12} образования состояния с переносом заряда $\text{Trp}^* \rightarrow \text{Trp}^+\text{R}^-$ (1) и k_{21} обратного перехода $\text{Trp}^+\text{R}^- \rightarrow \text{Trp}^*$ в возбужденное состояние триптофана (2); 3 — вид температурной зависимости $\Delta G(T)$ для триптофана в водном растворе; 4 — вид температурной зависимости скорости сольватационного сдвига $\Delta\lambda_m(T)/\Delta T$ спектра флуоресценции триптофана в водном растворе; кривые 3 и 4 приведены для наглядности.

нентное свечение Тгр объясняется присутствием трех разных центров свечения, тогда как в новой модели три компоненты в кинетике затухания флуоресценции являются следствием других физических процессов, описывающих дезактивацию Trp^* с участием промежуточного состояния с переносом заряда.

В последнее время в ряде работ появились сведения, что кинетика флуоресценции собственно ротамерных форм Тгр моноэкспоненциальна, причем длительности флуоресценции разных ротамеров различаются незначительно [35]. При этом тушение флуоресценции какой-либо ротамерной формы триптофана и связанный с этим многокомпонентный характер кинетики затухания флуоресценции Тгр в белках объясняются возникновением дополнительного канала дезактивации возбужденного состояния Тгр — переноса электрона с возбужденного индольного кольца на амидные группы основного скелета триптофана либо на его электрон-акцепторные боковые связи. В белке также возможен перенос протона с ближайших аминокислот, например с тирозина на индольное кольцо [36].

Для объяснения природы многокомпонентного свечения триптофана в водном растворе, а также механизмов тушения флуоресценции Тгр в работе [37] выдвинуто предположение, что при возбуждении его молекул происходит делокализация электронной плотности между индольным кольцом и соседними молекулами воды. При этом происходит напряжение сети водородных связей,

приводящее к сильному сдвигу спектра флуоресценции Тгр в водном растворе в длинноволновую область. Как следует из наших экспериментальных данных, это предположение справедливо только в определенном температурном диапазоне ($-50 \div 10^\circ\text{C}$), в котором регистрируются широкие полосы с длинным крылом как в спектре поглощения, так и в спектре флуоресценции, а также происходит сдвиг спектра флуоресценции быстрой компоненты на ~ 20 нм. В остальной области температур перенос электрона может происходить на амидные группы основного скелета молекулы Тгр, либо на обладающие электрон-акцепторными свойствами боковые пептидные связи. Кроме того, мы предположили, что состояние с переносом заряда может переходить обратно в возбужденное состояние триптофана, а также в основное состояние за счет излучательного и безызлучательного процессов. В этом случае моноэкспоненциальная кинетика затухания флуоресценции Тгр приобретает двухкомпонентный характер. Для исследования данных процессов были измерены температурные зависимости времени и скоростей затухания флуоресценции триптофана в водной среде (рис. 5).

Процессы, происходящие при возбуждении триптофана в водном окружении, можно представить в виде модельной схемы, показанной на рис. 6. Эта схема использовалась для проведения целевого анализа (“Target analysis”) кинетики затухания флуоресценции Тгр и определения параметров, характеризующих динамику процессов

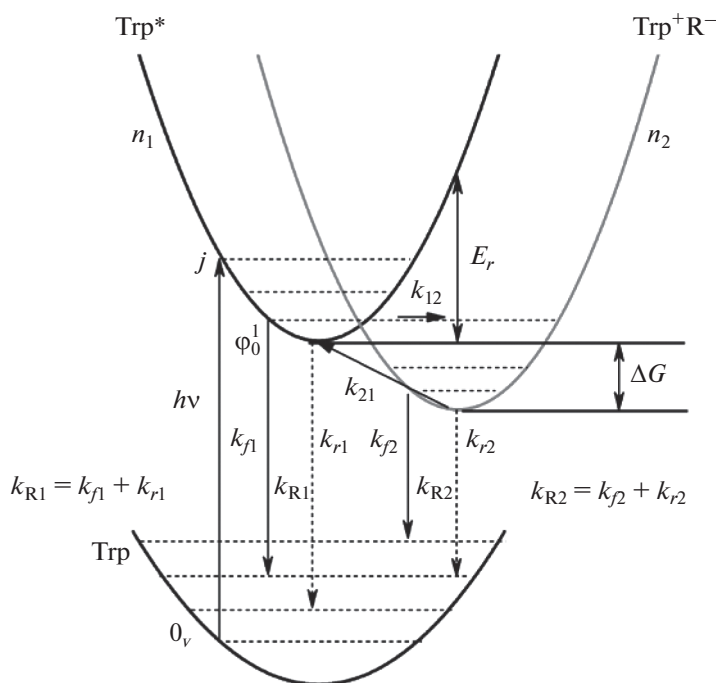


Рис. 6. Модельная схема кинетических переходов в триптофане. Обозначения: n_1 , n_2 — населенности возбужденного состояния молекул Tnp и состояния с переносом заряда; Tnp^+R^- — состояние с переносом заряда (CTS), где R может обозначать как систему водородных связей в окружении молекулы Tnp, так и амидные группы пептидных связей с электрон-акцепторными свойствами, связанные с Tnp; k_{R1} — константа скорости затухания возбужденного состояния Tnp, включающая флуоресценцию (k_{f1}) и безызлучательную релаксацию (k_{r1}): $\text{Tnp}^* \xrightarrow{k_{R1}} \text{S}_0$ ($k_{R1} = k_{f1} + k_{r1}$); k_{R2} — константа скорости затухания CTS, включающая флуоресценцию (k_{f2}) и безызлучательную релаксацию (k_{r2}): $\text{Tnp}^+\text{R}^- \xrightarrow{k_{R2}} \text{S}_0$; k_{12} — скорость перехода $\text{Tnp}^* \rightarrow \text{CTS}$; k_{21} — скорость рекомбинации зарядов CTS с образованием Tnp^* .

при возбуждении Tnp в водной среде. При аппроксимации кинетики флуоресценции на основе схемы рис. 6 определенные параметры приходилось задавать априори из известных спектроскопических данных: например, константа скорости затухания флуоресценции Tnp полагалась равной обратному времени затухания флуоресценции компонента τ_3 , составлявшему 14.5 нс; константа скорости излучательного перехода CTS в основное состояние молекулы триптофана оценивалась по ширине полосы минорной формы (S2) спектра флуоресценции Tnp (рис. 7) и принималась равной 8 нс⁻¹.

Остальные параметры кинетической схемы (рис. 6) определялись в процессе аппроксимации кинетики затухания флуоресценции. При этом предполагалось, что состояние с делокализованным электроном в системе водородных связей существует только в области температур $-50 \div 10^\circ\text{C}$. По нашему мнению, в области температур $-170 \div -50^\circ\text{C}$ тушение флуоресценции Tnp и немонотонноэкспоненциальный характер кинетики затухания флуоресценции обусловлены переносом электрона с возбужденного индольного кольца молекулы Tnp на амидные группы основного скелета либо на об-

ладающие электрон-акцепторными свойствами боковые пептидные связи. Этот процесс сопровождается образованием состояния с переносом заряда и обратным переходом в возбужденное состояние индольного кольца, а также возможной релаксацией CTS в основное состояние.

Описываемая схема кинетических процессов (рис. 6) применима также и для описания переходов между ротамерными формами Tnp, приводящих к антибатной температурной зависимости времени жизни компонент в кинетике флуоресценции [34]. В математическом плане использованная нами в работе [34] модель перехода одной ротамерной формы в другую сходна с моделью, описывающей переходы каждой ротамерной формы в состояние с переносом заряда с учетом обратного перехода. Для ответа на вопрос, какая модель физически более адекватно описывает переходы в возбужденном состоянии молекулы Tnp, необходимы дополнительные экспериментальные измерения изменения во времени оптической плотности в области поглощения триптофана.

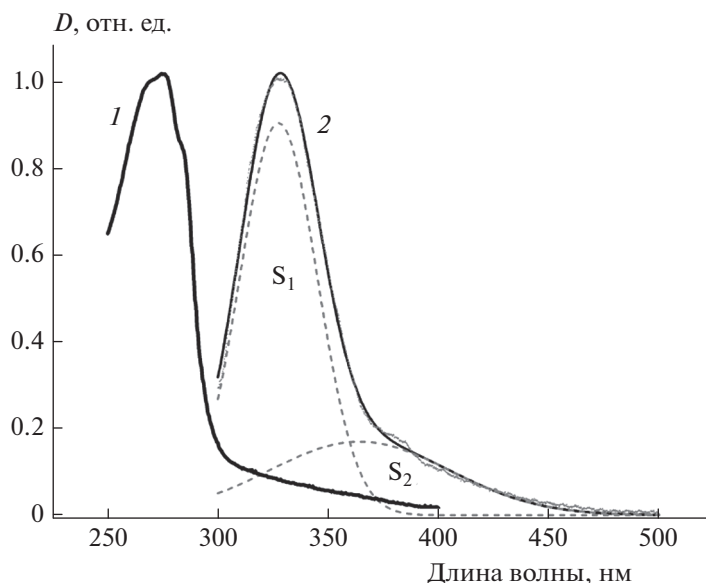


Рис. 7. Спектры поглощения (1) и флуоресценции (2) триптофана в водном растворе при комнатной температуре. Приведено разложение спектра флуоресценции Тгр на две гауссовы компоненты (формы) — S1 и S2.

РОЛЬ ДИНАМИКИ ВОДОРОДНЫХ СВЯЗЕЙ В ДЕЗАКТИВАЦИИ ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ ТРИПТОФАНА

Остановимся теперь на возможной роли динамики водородных связей в дезактивации возбужденных состояний триптофана. В работе [38] методом квазиупругого рассеяния нейтронов были определены три основных температурных области, определяющие динамику протонов водородных связей в водно-белковой среде. В области I ($T < -150^\circ\text{C}$) происходят чисто гармонические колебания протонов около равновесных положений, в области II ($-150 \leq T < -30^\circ\text{C}$) динамика водно-белковой среды характеризуется скачкообразной диффузией протонов вдоль Н-связей в пикосекундном временном диапазоне. В температурной области III ($T > -30^\circ\text{C}$) происходят более медленные масштабные движения крупных молекулярных фрагментов [38].

В водном растворе триптофана в температурной области III формируется стабильный цвиттерионный комплекс Н-связей молекулы Тгр с водным окружением [37]. В результате вокруг образовавшегося цвиттерионного комплекса образуется водная оболочка с частично упорядоченными Н-связями за счет их взаимодействия с полярными группами пептидных связей Тгр [37, 38]. Кроме того, в электронно-возбужденном состоянии молекулы Тгр может происходить дополнительное упорядочивание Н-связей за счет увеличения их жесткости [37]. В результате в достаточно упорядоченной системе Н-связей может образоваться квазизона проводимости, в которой электрон, находящийся на индольном кольце возбужден-

ной молекулы Тгр, делокализуется и затем может перейти на N—Н-группы пептидных связей с образованием CTS [37].

Данный эффект возможен при достаточно низких температурах, причем скорость переноса электрона от индольного кольца Тгр* в систему водородных связей должна увеличиваться при понижении температуры. При высоких температурах за счет тепловых колебаний молекул квазизона проводимости разрушается, а перенос электрона с индольных колец на амидные группы будет проходить по термоактивационному механизму. В температурной области II возможно также дополнительное упорядочивание Н-связей аналогично структурному фазовому переходу в сегнетоэлектрических кристаллах с Н-связями типа сегнетовой соли [39]. Этот процесс реализуется при таких низких температурах, когда взаимодействие диполей Н-связей молекул воды уже достаточно велико для их взаимного упорядочивания, но энергия теплового движения еще слишком мала, чтобы вызвать их разупорядочивание. Вследствие этого происходит диффузионный перескок протонов по Н-связям [38], что приводит к образованию суммарного дипольного момента в окружении молекулы Тгр*, электрическое поле которого вызывает эффект дополнительной сольватации возбужденной молекулы Тгр. В результате за счет кулоновского взаимодействия Тгр* с диполями Н-связей происходит сильный сдвиг спектра флуоресценции в водном растворе в длинноволновую область.

Итак, мы проанализировали температурную зависимость кинетики затухания флуоресценции

триптофана в разных растворителях, рассмотрели возможность использования состояния с переносом заряда для описания процессов дезактивации возбужденного состояния молекулы триптофана [40] и предложили адекватную физическую модель переходов молекулы Трп между возбужденным и основным состояниями с привлечением состояния с переносом заряда. Именно включение CTS в процесс дезактивации приводит к возникновению нелинейной динамики этих переходов. При этом особый акцент был сделан на выяснение роли динамики водородных связей ближайшего окружения триптофана, а также на изучение особенностей спектральных и кинетических характеристик его флуоресценции в широком диапазоне изменений температуры. Согласно схеме электронных переходов в молекуле Трп, показанной на рис. 6, кинетика затухания флуоресценции Трп имеет двухкомпонентный характер.

Дезактивация возбужденного состояния триптофана происходит по двум каналам — с испусканием флуоресценции (k_f) и безызлучательной релаксацией (k_r) в основное состояние ($k_{R1} = k_f + k_r$), а также с переходом в промежуточное состояние — состояние с переносом заряда, (Trp^+R^-) со скоростью k_{12} , рекомбинирующее затем со скоростью k_{21} обратно в состояние Трп*. Согласно изложенному в работе [37], помимо обратного перехода в S^* -состояние распад CTS также может происходить с испусканием флуоресценции и безызлучательной релаксацией в основное состояние. Двухкомпонентное свечение Трп* характеризуется двумя спектральными формами, S_1 и S_2 , присутствующими в разложении спектра флуоресценции с различными временами жизни. Мы предполагаем, что форма S_1 в спектре флуоресценции Трп соответствует излучательному переходу S^* -состояния в основное состояние, тогда как компонента S_2 соответствует излучательному переходу CTS в основное состояние.

В последние годы исследованию динамики водородных связей в окружении возбужденных молекул Трп и их влиянию на фотофизические и фотохимические переходы в этих системах уделяется большое внимание [40–44]. В частности, в работе [37] было показано, что в водном растворе образуется стабильный цвиттерионный комплекс Н-связей с молекулой Трп. Вокруг этого комплекса формируется водная оболочка с частично упорядоченными Н-связями за счет их взаимодействия с полярными группами Трп [37, 44].

В ближайшем окружении возбужденной молекулы Трп может происходить укорочение длин и, как следствие, усиление Н-связей молекул воды, взаимодействующих с электрическим полем индольной части молекул Трп. В результате увеличивается жесткость этих связей и происходит их дополнительная упорядоченность [37]. В свою оче-

редь, в упорядоченной системе Н-связей может формироваться квазизона проводимости, на которую электрон переходит от индольной части возбужденной молекулы Трп и делокализуется. Затем делокализованный электрон может перейти на амидные группы и образовать состояние с переносом заряда [37]. Такой процесс наиболее вероятен в области достаточно низких температур (область I). При этом при дальнейшем понижении температуры скорость переноса электрона от индольной части Трп* в систему водородных связей должна увеличиваться.

В области более высоких температур (области II и III) за счет тепловых флуктуаций молекул растворителя квазизона проводимости вырождается. Таким образом, перенос электрона с индольной части на амидные группы будет идти уже по термоактивационному механизму. В окрестности возбужденной молекулы триптофана в системе водородных связей возможен также конформационный (фазовый) переход, приводящий к возникновению в этой системе электрического дипольного момента [39]. Этот процесс может происходить в определенном интервале температур: $T_1 < T < T_2$, когда энергия теплового движения протонов достаточно велика для их перескоков вдоль водородной связи ($T > T_1$), однако все еще остается меньше энергии взаимодействия диполей Н-связей молекул, что позволяет сохранить упорядоченность ($T < T_2$) [39]. В результате происходит перестройка системы водородных связей за счет диффузионного перескока протонов по Н-связям [38], что приводит к образованию суммарного дипольного момента, электрическое поле которого вызывает эффект дополнительной сольватации возбужденной молекулы Трп. При этом изменение состояния системы водородных связей в окрестности Трп* играет роль мягкой моды, т.е. критической подсистемы, испытывающей фазовый переход в результате взаимодействия дипольных моментов водородных связей в области температур $T_1 < T < T_2$ [39]. Кулоновское взаимодействие Трп* с суммарным дипольным моментом системы водородных связей будет вызывать значительный сдвиг спектра флуоресценции триптофана в водно-белковой среде в длинноволновую область.

Детально исследованы температурные зависимости быстрого и медленного компонентов кинетики затухания флуоресценции и динамику спектров флуоресценции водного раствора триптофана в температурном диапазоне от -170 до 20°C . Нелинейный характер зависимостей τ_1 и τ_2 от температуры был объяснен возникновением дополнительного канала дезактивации Трп* — переноса электрона от индольной части молекулы триптофана на Н-связи водного окружения и затем — на ее амидные группы. В результате образу-

ется состояние с переносом заряда — комплекс Trp^+R^- . Деактивация этого CTS происходит как в результате обратного перехода из данного состояния в возбужденное состояние Trp , так и за счет флуоресценции, либо в процессе релаксации в основное состояние.

Проведенный количественный анализ модели прямых и обратных электронных переходов в молекуле триптофана из возбужденного состояния в основное и в состояние с переносом заряда для образцов, замороженных в темноте и на свету, показал, что микроконформационные изменения для образцов, замороженных на свету, сохраняются с понижением температуры главным образом в системе водородных связей в окружении Trp^* и CTS. Было экспериментально обнаружено возникновение конформационных (фазовых) переходов в системе водородных связей в окружении Trp^* и CTS в температурном диапазоне от -80 до 20°C . В этом температурном диапазоне наблюдается нелинейное поведение таких параметров, как τ_1 , τ_2 , энергии активации E_a , а также скорости сольватационного сдвига спектров флуоресценции. Важно отметить, что в диапазоне температур $-110 \div -80^\circ\text{C}$ молекула Trp^* сольватируется быстрее, чем Trp^+R^- , тогда как при более высоких температурах ($T > -80^\circ\text{C}$) скорость сольватации этого комплекса становится больше, чем скорость сольватации Trp^* . Этот факт объяснен нами тем, что в температурном диапазоне $-80 \div 20^\circ\text{C}$ в окружении CTS структурный (фазовый) переход захватывает большее число Н-связей, чем в окружении Trp^* . Именно в температурном диапазоне $-80 \div 20^\circ\text{C}$ происходит отклонение температурной динамики переходов возбужденной молекулы триптофана от стандартного аррениусовского поведения с постоянным значением E_a . Таким образом динамика системы Н-связей играет определяющую роль в возникновении нелинейного характера изменения параметров, описывающих деактивацию Trp^* и CTS.

Анализ полученных в ходе исследований экспериментальных и теоретических кривых позволил выделить три области в спектре флуоресценции Trp : коротковолновую (В) при $300 < \lambda < 386$ нм, промежуточную (М) при $386 < \lambda < 400$ нм и длинноволновую (R) при $400 < \lambda < 470$ нм области, для которых температурная зависимость скорости образования CTS имеет различный характер. Оказалось, что в области В при изменении температуры от -80 до 20°C наблюдается отклонение температурной зависимости константы скорости k_{12} фазового перехода (рис. 8) от стандартного аррениусовского поведения с постоянной энергией активации. В температурной области $-80 < T < -20^\circ\text{C}$ константа скорости перехода k_{12} увеличивается до максимума при $T = -20^\circ\text{C}$. При дальнейшем росте температуры до 20°C происходит уменьшение k_{12} .

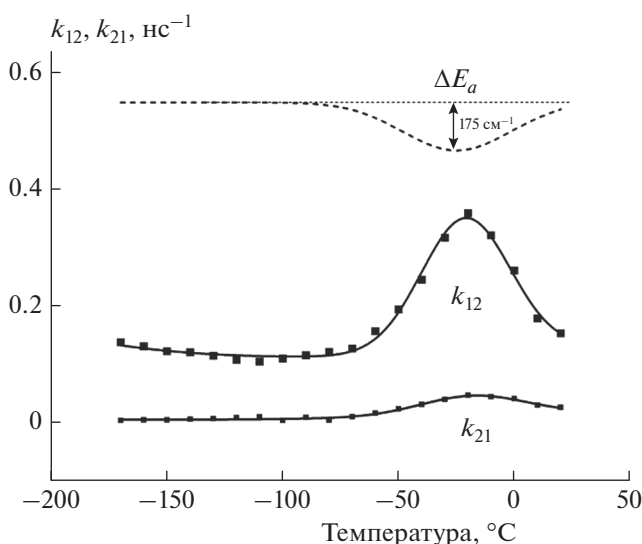


Рис. 8. Температурные зависимости констант скорости k_{12} образования состояния с переносом заряда $\text{Trp}^* \rightarrow \text{Trp}^+\text{R}^-$ и k_{21} обратной реакции $\text{Trp}^+\text{R}^- \rightarrow \text{Trp}^*$, а также энергии активации реакции ΔE_a образцов в коротковолновой спектральной области (В). Для наглядности здесь и ниже на рис. 9 и 10 приведен вид температурной зависимости ΔE_a .

Такую нелинейную колоколообразную зависимость скорости перехода возбужденного состояния Trp в состояние с переносом заряда по сравнению со стандартной реакцией с постоянной энергией активации E_a можно связать с возможным структурным фазовым переходом системы водородных связей в окружении Trp^* в области температур $-80 < T < 20^\circ\text{C}$. Действительно, система водородных связей в окрестности возбужденной молекулы триптофана при фазовом переходе в температурной области $T_1 < T < T_2$ перестраивается и описывается критической, мягкой модой [39], при которой протоны водородных связей переходят в новое положение равновесия. Возникающее электрическое поле индольной части возбужденной молекулы Trp способствует процессу фазового перехода в системе окружающих водородных связей, при этом важную роль играет их взаимное взаимодействие.

Сам коротковолновый (В) участок спектра флуоресценции при $300 < \lambda < 386$ нм соответствует излучению той части возбужденных молекул Trp , в окрестности которой система водородных связей находится в начале перестройки и испытывает флуктуации положений протонов вдоль водородных связей. Известно, что потенциальная энергия движения протонов вдоль водородных связей имеет вид двухъямного потенциала [39]. Под воздействием электрического поля индольной части возбужденной молекулы Trp энергия движения протонов становится выше потенци-

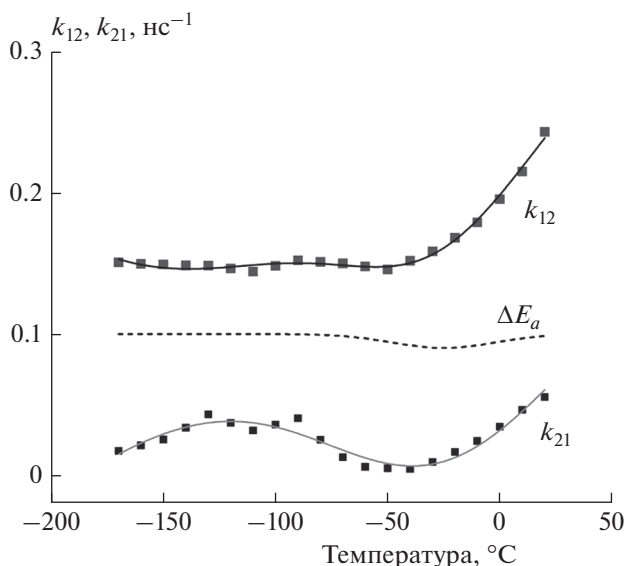


Рис. 9. То же, что и на рис. 8, но для образцов в спектральной области М.

альных барьеров потенциальных ям, в результате чего они могут определенное время двигаться вдоль водородных связей практически свободно. Также возможен переход протона вдоль водородной связи из одной потенциальной ямы в более близкую к индольной части потенциальную яму возбужденной молекулы Тгр по туннельному механизму. Данный механизм рассмотрен в работах [45, 46]. На этом участке спектра аномальный характер температурной зависимости константы скорости k_{12} перехода Тгр* в CTS можно объяснить уменьшением энергии реорганизации данной реакции за счет уменьшения коэффициента упругости (жесткости) части водородных связей при их перестройке в данной температурной области. При уменьшении энергии реорганизации процесса переноса электрона уменьшается и энергия активации этого перехода, так как при этом величина свободной энергии перехода, ΔG , остается еще практически постоянной. С ростом температуры количество взаимодействующих критических водородных связей, теряющих часть жесткости в начале фазового перехода, растет за счет увеличения числа эффективно взаимодействующих протонов, в результате чего продолжает уменьшаться энергия реорганизации перехода. Это приводит к уменьшению энергии активации перехода для В-участка спектра с ростом температуры, которая достигает минимума при температуре $T_m = -20^\circ\text{C}$. При этом значение константы скорости перехода k_{12} возбужденного состояния триптофана в CTS увеличивается и достигает максимума при этой же температуре (рис. 8).

При дальнейшем росте температуры от T_m до $T_2 = 20^\circ\text{C}$ растет тепловая энергия движения протонов, уменьшается количество взаимодействующих водородных связей мягкой моды, участвующих в фазовом переходе, что приводит к увеличению энергии реорганизации и соответствующему увеличению энергии активации. В результате при достижении максимальной температуры фазового перехода T_2 энергия активации возвращается к постоянной для стандартного термоактивационного перехода величине. При этом скорость перехода Тгр* $\rightarrow$ CTS уменьшается до величины, наблюдаемой при стандартном переходе с постоянной энергией активации (рис. 8). Это подтверждает высказанное ранее предположение, что в начале перестройки водородных связей в результате их взаимодействия, а также под воздействием электрического поля индольной части возбужденной молекулы Тгр образуется виртуальная (временная) зона проводимости системы водородных связей, которая приводит к увеличенной скорости перехода возбужденного состояния Тгр в состояние с переносом заряда CTS в коротковолновой области спектра (В).

Средний (М) участок спектра флуоресценции триптофана при $386 < \lambda < 400$ нм соответствует излучению той части возбужденных молекул триптофана, в окружении которых уже произошел фазовый переход некоторого числа водородных связей, сопряженный с возникновением дипольного момента системы водородных связей и восстановлением их жесткости. Такой фазовый переход приводит к увеличению энергии реорганизации перехода E_r и уменьшению ΔG , что вызывает соответствующий рост E_a . В то же время для оставшейся части возбужденных молекул система водородных связей все еще находится в состоянии перестройки и вносит вклад в уменьшение E_r и E_a . В результате в спектральной области М увеличение энергии активации за счет фазового перехода и соответствующего уменьшения ΔG компенсируется снижением величины E_a за счет уменьшения E_r для той части молекул, в окрестности которых перестройка системы водородных связей еще не завершена. При этом в спектральной области М энергия активации слабо зависит от температуры (рис. 9).

Для молекул Тгр*, флуоресцирующих на длинноволновом (R) участке спектра при $400 < \lambda < 470$ нм, фазовый переход водородных связей в окрестности возбужденных молекул триптофана в основном завершен. В этом случае водородные связи находятся в новом устойчивом положении за счет затухания флуктуаций движения протонов вдоль водородных связей. В результате увеличивается их жесткость, что вызывает соответствующее увеличение энергии реорганизации перехода. При этом в данной температурной области в окрест-

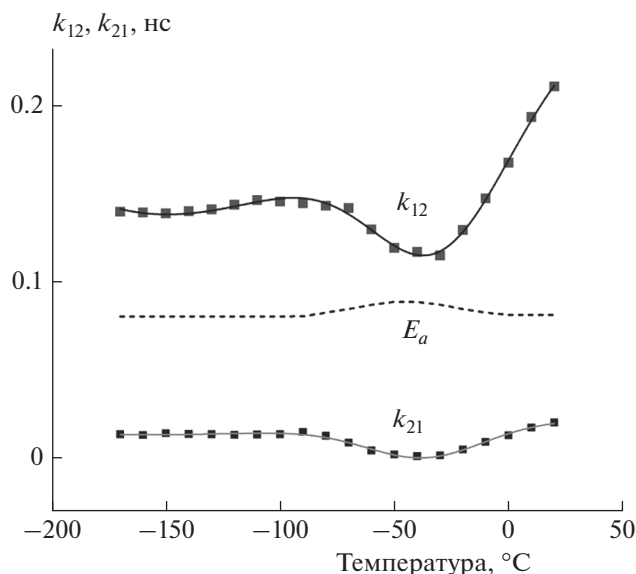


Рис. 10. То же, что и на рис. 8, но для образцов в спектральной области R.

ности возбужденных молекул Trp за счет смещения протонов возникает дополнительный дипольный момент в системе водородных связей. В результате взаимодействия электрического поля возникающего дипольного момента системы элементарных ячеек Н-связей с возбужденным электронным состоянием молекулы Trp происходит ее дополнительная сольватация, которая достигает максимума при $T_s = -40^\circ\text{C}$. Как следствие, в данной области температур происходит уменьшение свободной энергии перехода $\Delta G(T)$ и увеличение энергии активации перехода E_a (рис. 10). В результате в температурной области $-80 < T < -40^\circ\text{C}$ наблюдается уменьшение скорости перехода (рис. 10) и соответствующее увеличение времени жизни возбужденного состояния Trp* относительно стандартной аррениусовской зависимости данных величин с постоянной энергией активации (рис. 10). При росте температуры выше -40°C увеличивается тепловая энергия протонов водородных связей, нарушающая их взаимное взаимодействие, и происходит уменьшение $\Delta G(T)$. В следствие этого происходит уменьшение энергии активации E_a до значения стандартного аррениусовского перехода и, соответственно, увеличивается константа скорости k_{12} .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, экспериментально обнаружено возникновение конформационных (фазовых) переходов в системе водородных связей в окружении Trp* и CTS в температурном диапазоне от -80 до 20°C . В этом температурном диапазоне наблю-

дается нелинейное поведение таких параметров, как τ_1 , τ_2 , энергии активации E_a , а также скорости сольватационного сдвига спектров флуоресценции. Важно отметить, что в диапазоне температур $-110 \div -80^\circ\text{C}$ молекула Trp* сольватируется быстрее, чем комплекс Trp⁺R⁻, тогда как при более высоких температурах ($T > -80^\circ\text{C}$) скорость сольватации этого комплекса становится больше, чем скорость сольватации Trp*. Этот факт объяснен тем, что в температурном диапазоне $-80 \div 20^\circ\text{C}$ в окрестности CTS структурный (фазовый) переход захватывает большее число Н-связей, чем в окрестности Trp*. Именно в температурном диапазоне $-80 \div 20^\circ\text{C}$ происходит отклонение температурной динамики переходов возбужденной молекулы триптофана от стандартного аррениусовского поведения с постоянным значением E_a . Таким образом, динамика системы Н-связей играет определяющую роль в возникновении нелинейного характера изменения параметров, описывающих дезактивацию Trp* и CTS.

Отметим, что основные выводы из проведенных нами исследований температурной зависимости динамики фотофизических переходов возбужденных молекул триптофана очень сходны с результатами работ В.И. Гольданского, где обсуждается неравновесный фазовый переход в окружении возбужденных молекул для объяснения нарушения их симметрии.

Частичное финансирование работы осуществлялось в рамках госпрограммы № 121032500058-7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frauenfelder H., McMahon B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 4795.
2. Fitter J., Lechner R.E., Buldt G., Dencher N.A. // Ibid. 1996. V. 93. P. 7600.
3. Frauenfelder H., Sligar S.G., Wolynes P.G. // Science. 1991. V. 254. P. 1598.
4. Jackson T.A., Lim M., Anfinrud P.A. // Chem. Phys. 1994. V. 180. P. 131.
5. Johnson J.B., Lamb D.C., Frauenfelder H. et al. // Biophys. J. 1996. V. 71. P. 1563.
6. Paciarony A., Cinelli S., Onori G. // Biophys. J. 2002. V. 83. P. 1157.
7. Palazzo G., Mallardi A., Hochkoeppler A. et al. // Biophys. J. 2002. V. 82. P. 558.
8. Kriegl J.M., Forster F.K., Nienhaus G.U. // Biophys. J. 2003. V. 85. P. 1851.
9. Mei G., Di Venere A., Agro A.F., De Matteis F., Rosato N. // J. Fluorescence. 2003. V. 13. P. 467.
10. Malferrari M., Savitsky A., Mamedov M.D. et al. // Biophys. Acta. 2016. V. 1857. P. 1440.
11. Schlammadinger D.E., Gable J.E., Kim J.E. // J. Phys. Chem. B. 2009. V. 113. P. 14769.
12. Dashnau J.L., Zelent B., Vanderkooi J.M. // Biophys. Chem. 2005. V. 114. P. 71.

13. *Chen Y., Barkley M.D.* // *Biochemistry*. 1998. V. 3. P. 9976.
14. *Бурштейн Э.А.* // *Молекуляр. биология*. 1983. Т. 17. С. 455.
15. *Нокс П.П., Корватовский Б.Н., Красильников П.М. и др.* // *ДАН*. 2016. V. 467. P. 350.
16. *Гольданский В.И., Кузьмин В.В.* // *УФН*. 1989. Т. 157. С. 3.
17. *Szabo A.G., Rayner D.M.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1980. V. 102. P. 554.
18. *Gudgin E., Lopez-Deigado R., Ware W.R.* // *Phys. Chem.* 1983. V. 87. P. 1559.
19. *Petrich J.W., Chang M.C., McDonald D.B., Fleming G.R.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1983. V. 105. P. 3824.
20. *Ross J.A., Jameson D.M.* // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2008. V. 7. P. 1301.
21. *Hellings M., De Maeyer M., Verheyden S.* // *Biophys. J.* 2003. V. 85. P. 1894.
22. *Liu T., Callis P.R., Hesp B.H., de Groot M.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 4104.
23. *Pan C.-P., Muino P.L., Barkley M.D., Callis P.R.* // *J. Phys. Chem. B*. 2011. V. 115. P. 3245.
24. *Kadyan A., Juneja S., Pandey S.J.* // *Phys. Chem. B*. 2019. V. 123. P. 7578.
25. *Нокс П.П., Лукашев Е.П., Корватовский Б.Н. и др.* // *Биофизика*. 2016. Т. 61. С. 1118.
26. *Olsson C., Jansson H., Swenson J.* // *J. Phys. Chem. B*. 2016. V. 120. P. 4723.
27. *Physical properties of glycerine and its solutions*. N.Y.: GlycerineProducers' Association, 1963.
28. *Havemeyer R.N.* // *J. Pharmaceutic. Sci.* 1966. V. 55. P. 851.
29. *Towey J.J., Soper A.K., Dougan L.* // *J. Phys.Chem. B*. 2016. V. 120. P. 4439.
30. *Краснов К.С.* *Физическая химия*. Т. 1. М.: Высш. шк., 2001.
31. *Adams P.D., Chen Y., Ma K., Zagorski M.G et al.* // *JACS*. 2002. V. 124. P. 9278.
32. *Hayward B.J., Henry B.B.* // *Chem. Phys.* 1976. V. 12. P. 387.
33. *Тарасевич Б.Н.* *ИК спектры основных классов органических соединений*. Справочные материалы. М.: Хим. факультет МГУ, 2012.
34. *Горохов В.В., Нокс П.П., Корватовский Б.Н. и др.* // *Биохимия*. 2017. Т. 82. С. 1615.
35. *Hilairea M.R., Ahmed I.A., Lina C.-W. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. V. 114. P. 6005.
36. *Callis P.R.* // *J. Mol. Struct.* 2014. V. 1077. P. 22.
37. *Liu H., Zhang H., Jin B.* // *Spectrochim. Acta, Part A*. 2013. V. 106. P. 54.
38. *Doster W., Settles M.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2005. V. 1749. P. 173.
39. *Блинц Р., Жеки Б.* *Сегнетоэлектрики и антисегнетоэлектрики. Динамика решетки*. М.: Мир, 1975.
40. *Knox P.P., Gorokhov V.V., Korvatovsky B.N. et al.* // *J. Photochem. Photobiol., A*. 2020. V. 393. P. 112435.
41. *Knox P.P., Lukashev E.P., Gorokhov V.V. et al.* // *J. Photochem. Photobiol. B*. 2018. V. 189. P. 145.
42. *Горохов В.В., Корватовский Б.Н., Нокс П.П. и др.* // *Докл. РАН. Науки о жизни*. 2021. Т. 498. С. 19.
43. *Пашенко В.З., Горохов В.В., Корватовский Б.Н. и др.* // *Биофизика*. 2021. Т. 66. С. 454.
44. *Han K.L., Zhao G.J.* *Hydrogen Bonding and Transfer in the Excited State*. Chichester, UK: John Wiley&Sons Ltd., 2011.
45. *Krasilnikov P.M., Knox P.P., Rubin A.B.* // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2009. V. 8. P. 181.
46. *Рубин А.Б.* *Биофизика*. Т. 3. М.: Высш. шк., 2013.