

УДК 544.77.022

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА С КАТИОННЫМИ ИМИДАЗОЛИЕВЫМИ ПАВ, СОДЕРЖАЩИМИ МЕТОКСИФЕНИЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

© 2022 г. Д. А. Кузнецова^{a,*}, Д. М. Кузнецов^a, В. М. Захаров^b, Л. Я. Захарова^a

^a Институт органической и физической химии имени А. Е. Арбузова, Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», ул. Арбузова 8, Казань, 420088 Россия

^b Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, 420015 Россия
*e-mail: Dashyna111@mail.ru

Поступило в редакцию 31 марта 2022 г.

После доработки 5 мая 2022 г.

Принято к печати 10 мая 2022 г.

Физико-химическими методами анализа (тензиометрия, флуоресцентная спектроскопия, динамическое и электрофоретическое рассеяние света) изучена способность имидазолиевых ПАВ с метоксифенильным фрагментом к комплексообразованию с модельным белком – бычьим сывороточным альбумином. Добавление белка к ПАВ приводит к снижению порогов агрегации систем в 1.5–2 раза. Имидазолиевые ПАВ образуют с белком устойчивые комплексы. Связывание компонентов происходит преимущественно по тирозиновому аминокислотному фрагменту с участием водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Методом динамического и электрофоретического рассеяния света установлен дополнительный вклад электростатических сил и гидрофобного эффекта в системах ПАВ–альбумин.

Ключевые слова: катионные ПАВ, бычий сывороточный альбумин, комплексы ПАВ–белок

DOI: 10.31857/S0044460X22070149, **EDN:** CRNNRW

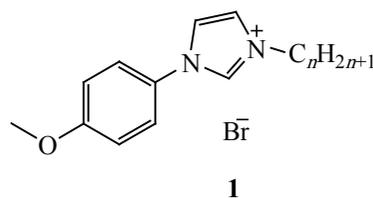
Поверхностно-активные вещества (ПАВ), благодаря амфифильной природе, находят широкое применение во многих высокоэффективных технологиях. В частности, их используют для увеличения растворимости гидрофобных соединений [1–3], для создания переносчиков нуклеиновых кислот [4–6], модификации липидных носителей [7], а также для формирования комплексов ПАВ–белок [8–9]. В связи с тем, что белки участвуют в большинстве важных биологических процессов, исследования взаимодействий катионных ПАВ с белками привлекают большое внимание исследователей [10]. Добавление белков к растворам ПАВ может значительно изменять свойства адсорбционного слоя на границе раздела фаз жидкость/газ.

В свою очередь, амфифильные соединения могут заметно влиять на конформационное поведение белков [11]. Одним из наиболее изученных и используемых на практике белков является бычий сывороточный альбумин (BSA). Его структура и физико-химические свойства хорошо охарактеризованы и известно, что он состоит из 583 аминокислотных остатков, имеет 17 дисульфидных связей и при нейтральном pH заряжен отрицательно (изоэлектрическая точка 4.7). Он водорастворимый и его структура очень похожа на человеческий сывороточный альбумин (HSA) [12,13]. Показано, что в зависимости от структуры амфифилов связывание ПАВ с BSA может проходить по нескольким механизмам: электростатическое связывание, гидро-

фобное взаимодействие, водородное связывание и π - π -стекинговое взаимодействие (с ароматическими фрагментами белка) [14–17]. Однако несмотря на то, что в литературе имеется значительный объем работ по взаимодействию белка с ПАВ, важно дальнейшее изучение этой области, поскольку нет четких закономерностей, контролирующих эффективность комплексообразования в таких системах.

В наших более ранних работах было показано, что мономерные амфифилы с имидазольной головной группой стабилизируют белковые структуры [18–20], в то время как аммонийные ПАВ могут приводить к денатурации белковых структур [21–22]. Подобное поведение объяснялось способностью имидазольных ПАВ вступать в дополнительные π - π -стекинговые взаимодействия с триптофановым фрагментом BSA, что повышало стабильность комплексов. В данной работе продолжены исследования по оценке взаимодействия имидазольных амфифилов с BSA, на примере имидазольных ПАВ с метоксифенильным фрагментом (**1**, $n = 10, 12, 14, 16$). Выбор этих амфифилов обусловлен тем, что биосовместимые ПАВ, содержащие в головной группе различные природные фрагменты (пиримидин, аминокислотные фрагменты, имидазолий), являются перспективными строительными блоками для формирования различных типов наноконтейнеров [23–25]. Данные ПАВ обеспечивают расширенный спектр межмолекулярных и комплементарных взаимодействий при самосборке, тем самым сочетая высокую эффективность с меньшей токсичностью. Имидазольные ПАВ привлекают большое внимание из-за наличия в структуре имидазольного кольца. Это кольцо присутствует в гистидине и может обеспечивать дополнительные π - π -стекинговые взаимодействия в системах. Поэтому наличие имидазольного кольца очень важно с биологической точки зрения [26]. Важным с биологической точки зрения является и наличие метоксифенильного фрагмента. Соединения с метоксифенильным фрагментом являются ингибиторами белка тубулина, которые обладают мощным цитотоксическим действием и препятствуют делению раковых клеток [27–29]. В работе [30] было показано, что введение метоксифенильного фрагмента в структуру имидазольных ПАВ усиливает антимикробную активность и цитотокси-

Схема 1.



$$n = 10, 12, 14, 16.$$

ческое действие амфифилов. Кроме того, наличие метоксифенильного фрагмента в головной группе ПАВ может изменить геометрию амфифильной платформы с точки зрения способа упаковки при агрегации, тем самым предсказывая появление необычных механизмов связывания при комплексообразовании ПАВ с BSA. Все исследования проводились при фиксированной концентрации белка (0.05 мас%) и варьируемой концентрации амфифилов. Выбор данной концентрации был обусловлен тем, что при ней наблюдается наибольший синергетический эффект при взаимодействии компонентов [19]. Структурная формула используемых ПАВ приведена на схеме 1.

Агрегационные характеристики систем ПАВ–BSA оценивали методом тензиометрии (рис. 1). Для бинарных систем ПАВ–белок поверхностное натяжение ниже, чем для индивидуальных систем ПАВ, что, вероятно, обусловлено поверхностной активностью самого BSA [31]. Для индивидуальных ПАВ на зависимостях поверхностного натяжения от концентрации амфифилов наблюдалось наличие только одного перегиба. Удлинение алкильного радикала на два углеродных атома приводило к уменьшению критической концентрации мицеллообразования (ККМ) примерно в 2.5–3.5 раза. Величины ККМ для индивидуальных ПАВ **1** составляли: 6.8 ($n = 10$), 2.6 ($n = 12$), 0.95 ($n = 14$) и 0.35 мМ. ($n = 16$) [30]. Для бинарных систем ПАВ **1**–BSA на соответствующих изотермах поверхностного натяжения наблюдали наличие двух перегибов. Первый перегиб в области низких концентраций ПАВ ($ККА_1$) соответствует насыщению межфазной поверхности молекулами амфифила, которые прикреплены к полимерной цепи белковой макромолекулы, и при этой же кон-

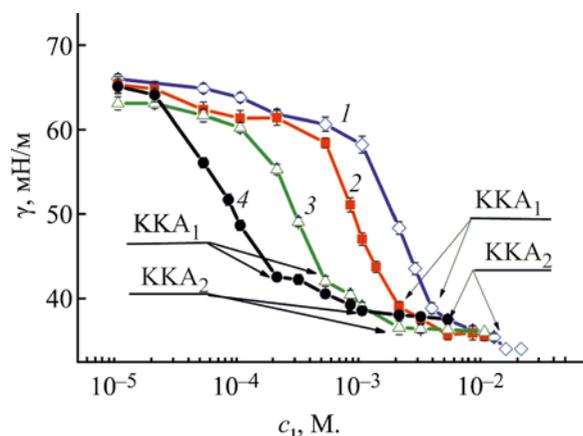


Рис. 1. Изотермы поверхностного натяжения для бинарных систем ПАВ 1–BSA, $n = 10$ (1), 12 (2), 14 (3), 16 (4), при фиксированной концентрации BSA (0.05 мас%) при 25°C.

центрации начинается формирование комплексов ПАВ–белок. Второй перегиб в области высоких концентраций ПАВ, вероятно, как и в случае классических полимер-коллоидных комплексов, отвечает насыщению макромолекул белка молекулами ПАВ и соответствует началу формирования свободных мицелл ПАВ (ККА₂) [6, 32]. Данные по значениям порога агрегации для систем ПАВ 1 и ПАВ 1–BSA объединены в табл. S1 (см. Дополнительные материалы). Видно, что формирование смешанных агрегатов ПАВ–BSA начинается при концентрации в 1.5–2 раза ниже, чем формирование индивидуальных агрегатов ПАВ.

Методом динамического рассеяния света определены размеры комплексов, образующихся в бинарных системах ПАВ 1–BSA (рис. 2, S1). Показано, что размер индивидуальных агрегатов BSA составляет примерно 6–7 нм. Добавка ПАВ в различных концентрациях не оказывает значительного влияния на размер полипептида, и размеры комплексов ПАВ 1–BSA находятся в диапазоне 6–9 нм. Незначительное увеличение размеров комплексов наблюдается только для системы ПАВ 1 ($n = 10$)–BSA при высокой концентрации ПАВ (10 мМ.). Размеры смешанных агрегатов при этом составляют около 10–12 нм. Это, вероятно, может отражать частичную денатурацию белковой молекулы. Стоит отметить, что для индивидуальных систем ПАВ во всем диапазоне концентраций после ККА

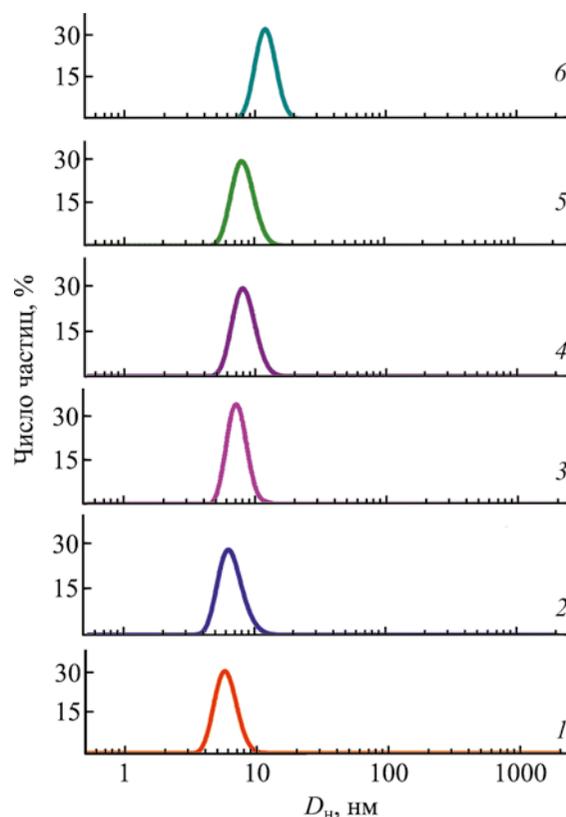


Рис. 2. Распределение агрегатов по размерам, усредненное по числу частиц, для водных растворов ПАВ 1 ($n = 10$)–BSA при 25°C при концентрации ПАВ: 0 (1, содержание BSA – 0.05 мас%), 0.01 (2), 0.1 (3), 1 (4), 5 (5), 10 мМ. (6).

для высших гомологов формировались мелкие мицеллоподобные агрегаты с гидродинамическим диаметром 2–4 нм. В случае ПАВ 1 ($n = 10$) происходило образование более крупных агрегатов с гидродинамическим диаметром примерно 40–100 нм [30]. На рис. 2 для примера приведено распределение агрегатов, усредненное по числу частиц, для водных растворов ПАВ 1 ($n = 10$)–BSA.

Для оценки зарядовых характеристик в системах ПАВ 1–BSA применяли метод электрофоретического рассеяния света (рис. 3). Макромолекула BSA заряжена отрицательно, поэтому добавление в систему катионного ПАВ позволяет ожидать связывания компонентов по электростатическому механизму. Это подтверждают экспериментальные данные, согласно которым при увеличении концентрации ПАВ в системе во всех случаях наблюдается увеличение дзета-потенциала, сопрово-

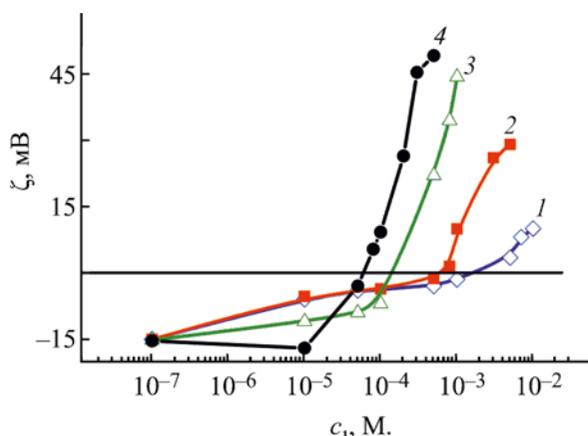


Рис. 3. Зависимость электрокинетического потенциала бинарных систем ПАВ 1–BSA, $n = 10$ (1), 12 (2), 14 (3), 16 (4), от концентрации ПАВ при 25 °С.

ждающееся переходом значений из отрицательной области в положительную. При этом наблюдается закономерность: чем больше длина углеводородного радикала, тем при более низкой концентрации достигается изоэлектрическая точка. Это, вероятно свидетельствует о значительном вкладе гидрофобных взаимодействий при формировании комплексов.

Далее оценку эффективности взаимодействия ПАВ 1 с BSA проводили с использованием различных флуоресцентных методик. BSA содержит три ароматические аминокислоты, которые могут вносить вклад в флуоресценцию белка, а именно тирозин (Tyr), триптофан (Trp) и фенилаланин (Phe). Поскольку излучение Phe имеет низкий квантовый выход, его вкладом обычно пренебрегают [33]. Поэтому можно считать, что флуоресцентные свойства белка обусловлены остатками тирозина и триптофана. Индивидуальный раствор BSA демонстрирует сильный пик флуоресценции при 340 нм. Регистрация спектров флуоресценции комплексов показала, что во всех случаях введение ПАВ к BSA приводит к тушению флуоресценции, и bathochromному сдвигу, т. е. смещению максимума полосы флуоресценции в длинноволновую область (рис. 4, S2). Тушение флуоресценции, как правило, обусловлено связыванием компонентов. Однако, bathochromный сдвиг явление не типичное при взаимодействии катионных ПАВ с BSA.

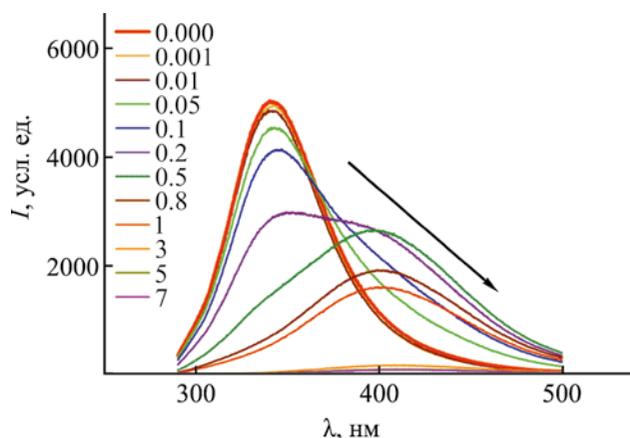


Рис. 4. Эмиссионные спектры флуоресценции бинарной системы ПАВ 1 ($n = 10$)–BSA при варьировании концентрации ПАВ (мМ.), содержание BSA – 0.05 мас%.

Обычно при формировании смешанных комплексов наблюдается гипсохромный сдвиг [18–20, 31]. Тем не менее, авторы работы [34], показали, что bathochromное смещение эмиссионного максимума вместе с уменьшением интенсивности флуоресценции BSA указывает на изменение микроокружения вокруг остатков триптофана, которое может быть обусловлено увеличением микрополярности среды. Кроме того, для всех систем в различном концентрационном диапазоне наблюдается наличие изобестических точек, которые могут указывать на существование связанного и несвязанного ПАВ в равновесии [35–36]. Для ПАВ 1 ($n = 10$)/BSA изобестическая точка достигается при 376 нм, для ПАВ 1 ($n = 12$)–BSA при 374 нм, для ПАВ 1 ($n = 14$)–BSA при 367 нм, для ПАВ 1 ($n = 16$)–BSA при 364 нм. Следует отметить, что чем короче длина углеводородного радикала амфифила, тем при более высокой концентрации ПАВ наступает состояние равновесия. Данное явление также может косвенно свидетельствовать о вкладе гидрофобных взаимодействий при формировании комплексов. На рис. 4 для примера приведены эмиссионные спектры флуоресценции для бинарной системы ПАВ 1 ($n = 10$)–BSA.

На основании флуоресцентных данных можно получить ряд количественных параметров взаимодействия систем ПАВ 1–BSA. В частности, используя уравнение Штерна–Фольмера (1), гра-

Таблица 1. Значения констант Штерна–Фольмера K_{SV} , констант связывания компонентов K_a , бимолекулярных констант скорости тушения k_q и количество участков связывания BSA и ПАВ N , изменения энтальпии ΔH° , энтропии ΔS° и свободной энергии Гиббса ΔG° для исследуемых систем при варьировании температуры

ПАВ 1–BSA	T, K	$K_{SV} \times 10^3,$ л/моль	$K_a \times 10^3,$ л/моль	$K_q \times 10^{10},$ л/(моль·с)	N	$\Delta H^\circ,$ кДж/моль	$\Delta S^\circ,$ Дж/(моль·К)	$\Delta G^\circ,$ кДж/моль
$n = 10$	298	9.8	8.70	98	1	-141.38	-397.41	-22.95
	303	5.7	6.30	57.4	1			-20.97
	308	4.3	1.10	43.1	0.8			-18.99
	313	3.8	0.76	37.8	0.76			-16.99
$n = 12$	298	6.3	15.85	62.6	1	-80.95	-191.22	-23.97
	303	6.4	7.94	63.8	1			-23.01
	308	6.5	5.49	64.6	1			-22.05
	313	6.4	5.01	63.8	1			-21.10
$n = 14$	298	13.5	15.85	135.3	1	-41.8	-59.3	-24.1
	303	12.0	15.14	119.2	1			-23.8
	308	11.9	8.13	119.0	1			-23.5
	313	10.8	7.94	108.2	1			-23.2
$n = 16$	298	15.5	1023.29	155.3	1.2	-51.43	-56.2	-34.6
	303	14.9	870.96	149.2	1.4			-34.3
	308	13.9	794.33	139.9	1.4			-34.0
	313	11.7	346.74	117.5	1.6			-33.7

фическим способом рассчитывали коэффициенты Штерна–Фольмера для различных температур [37]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (1)$$

где F_0 – интенсивность флуоресценции в отсутствие тушителя, F – интенсивность флуоресценции в присутствии тушителя при заданной его концентрации, K_{SV} – константа Штерна–Фольмера, $[Q]$ – концентрация тушителя (ПАВ), k_q – бимолекулярная константа скорости тушения, τ_0 – среднее время жизни флуорофора (BSA) в возбужденном состоянии, равное 10^{-8} с [37].

Константа Штерна–Фольмера позволяет определить бимолекулярную константу скорости тушения (k_q), которая, в свою очередь, позволяет сделать вывод о преимущественном механизме тушения в данных системах. Тушение флуоресценции может происходить по разным механизмам и обычно классифицируется как динамическое и статическое тушение. Бимолекулярную константу скорости тушения можно вычислить из уравнения (2) [37]:

$$k_q = K_{SV} / \tau_0. \quad (2)$$

Так, если значение k_q меньше 2×10^{10} л/(моль·с), то преобладает динамический механизм тушения, если больше 2×10^{10} л/(моль·с), то преобладает статический механизм тушения. Данные при различных температурах приведены в табл. 1. Видно, что значения K_{SV} для всех систем уменьшаются с повышением температуры. Более того, вычисленные значения k_q на один или два порядка превышают максимальную константу скорости тушения при столкновениях при динамическом тушении [2×10^{10} л/(моль·с)]. Это указывает на то, что при формировании комплексов ПАВ 1–BSA имеет место статический механизм тушения флуоресценции, вероятней всего предполагающий, что ПАВ и BSA образуют нековалентно связанный комплекс за счет адсорбции молекул ПАВ на гидрофобных доменах белка [17].

Для расчета констант связывания ПАВ с BSA (K_a), количества участков связывания компонентов (N) и термодинамических характеристик исследуемых систем на основании первичных флуоресцентных данных применяли уравнения (3)–(5) [38]:

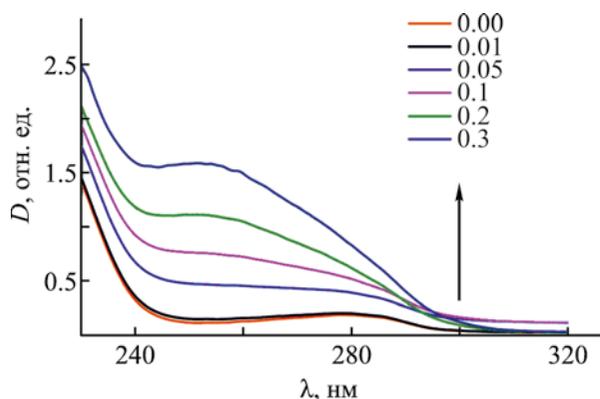


Рис. 5. Спектры поглощения BSA в отсутствие и в присутствии ПАВ 1 ($n = 16$) при 25°C, содержание BSA – 0.05 мас%. Концентрация ПАВ указана в мМ.

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_a + N \lg [Q], \quad (3)$$

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}, \quad (4)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ, \quad (5)$$

где ΔH° – изменение энтальпии системы, ΔS° – изменение энтропии системы, R – универсальная газовая постоянная, равная 8.314 Дж/(моль·К), T – температура проведения эксперимента, ΔG° – свободная энергия Гиббса системы. Все данные представлены в табл. 1. Полученные результаты свидетельствуют о том, что с повышением температуры во всех системах константы связывания уменьшаются, что обусловлено снижением устойчивости комплексов [12]. Однако следует отметить, что между компонентами достигается достаточно сильное связывание, которое усиливается с увеличением длины углеводородного радикала ПАВ. Значения N для комплексов ПАВ 1–BSA, находятся в основном в пределах единицы, что указывает на наличие одного сайта связывания в BSA для ПАВ при их взаимодействии. С использованием значений констант связывания компонентов K_a были получены значения изменений энтальпии ΔH° , энтропии ΔS° и свободной энергии Гиббса ΔG° при формировании комплексов ПАВ–BSA для исследуемых систем [уравнения (3–5), табл. 1]. Известно, что в зависимости от характера изменения термодинамических функций ΔH° и ΔS° в об-

разовании комплексов ПАВ–BSA доминируют те или иные межмолекулярные взаимодействия [38]: (1) $\Delta H^\circ < 0$ и $\Delta S^\circ < 0$ – преобладает водородное связывание и ван-дер-ваальсовы взаимодействия; (2) $\Delta H^\circ > 0$ и $\Delta S^\circ > 0$ – преобладают гидрофобные взаимодействия; (3) $\Delta H^\circ < 0$ и $\Delta S^\circ > 0$ – преобладают электростатические взаимодействия.

Согласно полученным данным, при формировании комплексов ПАВ 1–BSA преобладают водородное связывание компонентов и ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Со стороны ПАВ в образовании водородной связи могут принимать участие атомы кислорода и азота, имеющие неподеленную электронную пару, тогда как донорами протонов являются карбоксильные и в меньшей степени гидроксильные группы аминокислотных остатков. Учитывая тот факт, что триптофан содержит только одну карбоксильную группу, а тирозин гидроксильную и карбоксильную, можно предположить, что связывание по тирозину будет сильнее. Отрицательные значения энергии Гиббса свидетельствуют о термодинамической выгоды формирования комплексов ПАВ–BSA и самопроизвольности процесса.

УФ видимая спектроскопия представляет собой простой и широко доступный метод исследования образования комплексов ПАВ–белок. В отличие от флуоресцентной спектроскопии, которая отражает переходы электронов из возбужденного состояния в основное, УФ видимая спектроскопия регистрирует переходы электронов из основного состояния в возбужденное. Для изучения белков, содержащих остатки тирозина (Tyr) или триптофана (Trp) используется измерение УФ поглощения при 280 нм. Поглощение УФ света в этой области происходит за счет $n-\pi^*$ -переходов в аминокислотах Tyr и Trp [39]. Поэтому влияние различных количеств ПАВ на структурные изменения BSA изучали на примере одной системы ПАВ 1 ($n = 16$)–BSA по спектрам поглощения (рис. 5). Видно, что добавление ПАВ 1 ($n = 16$) к BSA и возрастание концентрации ПАВ в системе приводит к увеличению интенсивности поглощения и значительному гипсохромному сдвигу. Наблюдаемое изменение оптической плотности свидетельствует в пользу механизма статического тушения флуоресценции BSA в присутствии ПАВ [40], поскольку известно, что динамический процесс влияет исключительно

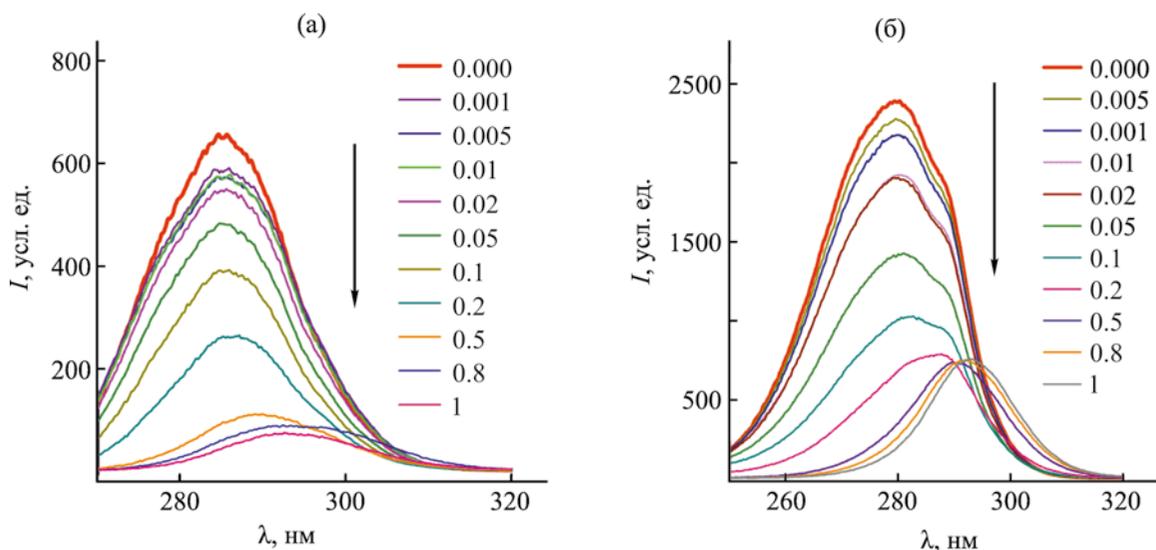


Рис. 6. Синхронные спектры флуоресценции BSA в присутствии различных концентраций ПАВ (мМ.) для бинарной системы ПАВ 1 ($n = 14$)–BSA при 25°C. $\Delta\lambda = 20$ (а), 60 нм (б).

на возбужденное состояние молекулы, не вызывая при этом никаких изменений в спектрах поглощения [41]. Полученные результаты соответствуют опубликованным данным о формировании комплекса между компонентами в рамках механизма статического тушения флуоресценции. Смещение максимума поглощения в данном случае также вызвано изменением микроокружения вокруг остатков тирозина и триптофана [40].

Для получения информации о том, какой из аминокислотных фрагментов (тирозин или триптофан) принимает участие во взаимодействии с молекулами ПАВ, используется техника синхронной флуоресцентной съемки с заданными значениями разницы длин волн $\Delta\lambda$: $\Delta\lambda = 20$ нм, характеризующая связывание по тирозиновому фрагменту, и $\Delta\lambda = 60$ нм, определяющая связывание по триптофановому фрагменту (рис. 6, S3).

На рис. 6 и S3 видно, что добавление ПАВ к BSA во всех случаях приводит к тушению флуоресценции тирозина и триптофана. При этом для обоих фрагментов наблюдается bathochromный сдвиг максимума полосы эмиссии. Отсюда можно сделать вывод, что присутствие ПАВ в растворе приводит к увеличению полярности вокруг остатков и тирозина и триптофана, причем ПАВ, вероятно, связывается с обоими фрагментами до-

статочно эффективно. Но чтобы оценить с каким фрагментом ПАВ 1 взаимодействует сильнее, можно проанализировать снижение степени интенсивности флуоресценции при добавлении ПАВ [16]. Снижение степени интенсивности флуоресценции для $\Delta\lambda = 20$ сильнее, чем для $\Delta\lambda = 60$ для всего гомологического ряда ПАВ. Это указывает на то, что молекулы амфифилов в большей степени взаимодействуют с остатками тирозина, чем с остатками триптофана. Интересно отметить, что в случае нефункционализированных имидазолиевых ПАВ, связывание ПАВ с белком происходило преимущественно по триптофану [18, 19].

Таким образом, комплексом физико-химических методов изучена способность амфифилов с имидазолиевой головной группой с метоксифенильным фрагментом и различной длиной углеводородного радикала к взаимодействию с бычьим сывороточным альбумином. Показано формирование устойчивых комплексов с гидродинамическим диаметром 6–9 нм. Методом флуоресцентной спектроскопии выявлено, что связывание компонентов происходит по триптофановому и по тирозиновому аминокислотным фрагментам, но преобладает связывание по тирозину. Интересно отметить, что в случае незамещенных имидазолиевых ПАВ связывание амфифилов с белком происходило по триптофану, а связывания по тирозину

не наблюдалось. Установлено, что доминирующими механизмами при формировании комплексов ПАВ–BSA являются водородное связывание компонентов и ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Однако, методом динамического и электрофоретического рассеяния света доказано наличие электростатических и гидрофобных взаимодействий, которые выражены в меньшей степени. Следует отметить, что не наблюдается существенной разницы при формировании комплексов ПАВ–BSA при варьировании длины углеводородного радикала. Вероятно, ключевым фактором, отвечающим за механизмы формирования комплексов в данном случае, является природа головной группы ПАВ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Имидазолиевые ПАВ с метоксифенильным фрагментом и различной длиной углеводородного радикала получали по реакции 1-(4-метоксифенил)-имидазола с соответствующим алкилбромидом в ацетонитриле с последующей очисткой целевых продуктов реакции в диэтиловом эфире [30]. В работе использовали бычий сывороточный альбумин (99%, Sigma-Aldrich). В качестве растворителя для приготовления растворов ПАВ и белка использовали воду, очищенную с помощью системы Milli-Q.

Поверхностное натяжение растворов определяли с помощью тензиометра Krüss K06 (Германия), методом отрыва кольца. Регистрацию спектров флуоресценции бинарных смесей ПАВ–BSA проводили с помощью спектрофлуориметра Hitachi F-7100 (Hitachi High-Tech Corporation, Япония) при температуре 25, 30, 35 и 40°C. Длина волны возбуждения составляла 280 нм. Спектры испускания регистрировали в диапазоне 290–450 нм со скоростью сканирования 1200 нм/мин. Для измерений использовали кювету толщиной 1 см. Спектры синхронной флуоресценции регистрировали в диапазоне 200–500 нм со скоростью сканирования 1200 нм/мин с двумя фиксированными разностями длин волн излучения и возбуждения $\Delta\lambda = 20$ и 60 нм [42]. Измерение размера и дзета-потенциала комплексов ПАВ–BSA проводили на характеристизаторе наночастиц ZetaSizer Nano (Malvern, Великобритания). Измерения выполняли при угле рассеяния 173°. Обработку полученных сигналов проводили на основе частотно-фазового анализа

рассеянного света на основе уравнения Стокса–Эйнштейна (6) для сферических частиц:

$$D = kT/6\pi\eta R, \quad (6)$$

где k – константа Больцмана, T – абсолютная температура, η – вязкость растворителя, R – гидродинамический радиус. Электрофоретическая подвижность в каждом образце была преобразована в значение дзета-потенциала с использованием соотношения Смолуховского (7):

$$\zeta = \mu\eta/\epsilon, \quad (7)$$

где ζ – дзета-потенциал, η – динамическая вязкость жидкости, μ – электрофоретическая подвижность частиц и ϵ – диэлектрическая проницаемость среды.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Кузнецова Дарья Александровна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6981-4868>

Кузнецов Денис Михайлович, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9572-3708>

Захаров Валерий Михайлович, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3982-2277>

Захарова Люция Ярулловна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2981-445X>

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-73-00033).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Дополнительные материалы для этой статьи доступны по doi 10.31857/S0044460X22070149 для авторизованных пользователей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гайнанова Г.А., Валеева Ф.Г., Кушназарова Р.А., Бекмухаметова А.М., Захаров С.В., Миргородская А.Б., Захарова Л.Я. // ЖФХ. 2018. Т. 92. № 7. С. 1158; Gaynanova G.A., Valeeva F.G., Kushnazarova

- va R.A., Bekmukhametova A.M., Zakharov S.V., Mirgorodskaya A.B., Zakharova L.Ya // Russ. J. Phys. Chem. (A). 2018. Vol. 92. N 7. P. 1400. doi 10.1134/S0036024418070129
- Lalthlengliani J., Gurung J., Pulikkal A.K. // J. Mol. Liq. 2022. Vol. 354. 118823. doi 10.1016/j.molliq.2022.118823
 - Gabdrakhmanov D.R., Samarkina D.A., Krylova E.S., Kapitanov I.V., Karpichev Y., Latypov Sh.K., Semenov V.E., Nizameev I.R., Kadirov M.K., Zakharova L.Ya. // J. Surfact. Deterg. 2019. Vol. 22. N 4. P. 865. doi 10.1002/jsde.12257
 - St. John P.M., Westervelt K., Rimawi A., Kawakita T. // Biophys. Chem. 2022. Vol. 281. 106734. doi 10.1016/j.bpc.2021.106734
 - Gabdrakhmanov D., Samarkina D., Semenov V., Syakaev V., Giniyatullin R., Gogoleva N., Zakharova L. // Colloids Surf. (A). 2015. Vol. 480. P. 113. doi 10.1016/j.colsurfa.2014.10.036
 - Kuznetsova D.A., Gabdrakhmanov D.R., Kuznetsov D.M., Lukashenko S.S., Zakharov V.M., Sapunova A.S., Amerhanova S.K., Lyubina A.P., Voloshina A.D., Salakhieva D.V., Zakharova // Molecules. 2021. Vol. 26. P. 2363. doi 10.3390/molecules26082363
 - Kuznetsova D.A., Vasileva L.A., Gaynanova G.A., Pavlov R.V., Sapunova A.S., Voloshina A.D., Sibgatullina G.V., Samigullin D.V., Petrov K.A., Zakharova L.Ya., Sinyashin O.G. // J. Mol. Liq. 2021. Vol. 330. 115703. doi 10.1016/j.molliq.2021.115703
 - Ud din Parray M., Maurya N., Ahmad Wani F., Borse M.S., Arfin N., Malik M.A., Patel R. // J. Mol. Struct. 2019. Vol. 1175. P. 49. doi 10.1016/j.molstruc.2018.07.078
 - Власова И.М., Власов А.А., Гранендаал Г.Р., Салецкий А.М. // ЖФХ. 2018. Т. 92. № 4. С. 604; Vlasova I.M., Vlasov A.A., Grapendaal G.R., Saletskii A.M. // Russ. J. Phys. Chem. (A). 2018. Vol. 92. N 4. P. 714. doi 10.1134/s0036024418040325
 - Fatma I., Sharma V., Thakur R.C., Kumar A. // J. Mol. Liq. 2021. Vol. 341. 117344. doi 10.1016/j.molliq.2021.117344
 - Kuznetsov D.M., Kuznetsova D.A., Gabdrakhmanov D.R., Lukashenko S.S., Nikitin Y.N., Zakharova L.Ya. // Surf. Innovations. Article 2100044. doi 10.1680/jsuin.21.00044
 - Shalaeva Y.V., Morozova J.E., Shumatbaeva A.M., Nizameev I.R., Kadirov M.K., Antipin I.S. // J. Mol. Liq. 2019. Vol. 286. 110879. doi 10.1016/j.molliq.2019.110879
 - Karush F. // J. Am. Chem. Soc. 1950. Vol. 72. P. 2705. doi 10.1021/ja01162a099
 - Patel R., Mir M.U.H., Maurya J.K., Singh U.K., Maurya N., Parray M. ud din, Khan A.B., Ali A. // Luminescence. 2015. Vol. 3. P. 1233. doi 10.1002/bio.2886
 - Hoque M.A., Ahmed F., Halim M.A., Molla M.R., Rana S., Rahman M.A., Rub M.A. // J. Mol. Liq. 2018. Vol. 260. N 15. P. 121. doi 10.1016/j.molliq.2018.03.069
 - Zhou T., Ao M., Xu G., Liu T., Zhang J. // J. Colloid Interface Sci. 2013. Vol. 389. P. 175. doi 10.1016/j.jcis.2012.08.067
 - Kuznetsova D.A., Gabdrakhmanov D.R., Lukashenko S.S., Faizullin D.A., Zuev Y.F., Nizameev I.R., Kadirov M.K., Kuznetsov D.M., Zakharova L.Ya. // J. Mol. Liq. 2020. Vol. 307. 113001. doi 10.1016/j.molliq.2020.113001
 - Samarkina D.A., Gabdrakhmanov D.R., Lukashenko S.S., Nizameev I.R., Kadirov M.K., Zakharova L.Ya. // J. Mol. Liq. 2019. Vol. 275. P. 232. doi 10.1016/j.molliq.2018.11.082
 - Самаркина Д.А., Габдрахманов Д.Р., Лукашенко С.С., Хаматгалимов А.Р., Захарова Л.Я. // ЖОХ. 2017. Т. 87. № 12. С. 2009; Samarkina D.A., Gabdrakhmanov D.R., Lukashenko S.S., Khamatgalimov A.R., Zakharova L. Ya // Russ. J. Gen. Chem. 2017. Vol. 87. N 12. P. 2826. doi 10.1134/S1070363217120118
 - Kuznetsova D.A., Gabdrakhmanov D.R., Lukashenko S.S., Voloshina A.D., Sapunova A.S., Kashapov R.R., Zakharova L.Ya. // Chem. Phys Lipids. 2019. Vol. 223. 104791. doi 10.1016/j.chemphyslip.2019.104791
 - Misra P.K., Dash Um., Maharan S. // Colloids Surf., A. 2015. Vol. 483. P. 36. doi 10.1016/j.colsurfa.2015.06.052
 - Gabdrakhmanov D.R., Valeeva F.G., Samarkina D.A., Lukashenko S.S., Mirgorodskaya A.B., Zakharova L.Ya. // Colloids Surf. (A). 2018. Vol. 558. P. 463. doi 10.1016/j.colsurfa.2018.09.008
 - Joondan N., Jhaumeer Laulloo S., Caumul P. // J. Dispers. Sci. Technol. 2018. Vol. 39. P. 1550. doi 10.1080/01932691.2017.1421085
 - Kashapov R., Gaynanova G., Gabdrakhmanov D., Kuznetsov D., Pavlov R., Petrov K., Zakharova L., Sinyashin O. // Int. J. Mol. Sci. 2020. Vol. 21. P. 6961. doi 10.3390/ijms21186961
 - Gabdrakhmanov D.R., Kuznetsova D.A., Saifina L.F., Shulaeva M.M., Semenov V.E., Zakharova L.Ya. // Colloids Surf. (A). 2020. Vol. 599. P. 124853. doi 10.1016/j.colsurfa.2020.124853
 - Kumar H., Kaur G. // Front. Chem. 2021. Vol. 9. P. 667941. doi 10.3389/fchem.2021.667941
 - Álvarez R., Álvarez C., Mollinedo F., Sierra B.G., Medarde M., Peláez R. // Bioorg. Med. Chem. 2009. Vol. 17. P. 6422. doi 10.1016/j.bmc.2009.07.012
 - Magalhães H.I.F., Bezerra D.P., Cavalcanti B.C., Wilke D.V., Rotta R., Lima D.P., Beatriz A., Alves A.P.N.N., Bitencourt F. S., Figueiredo I.S.T., Alencar N.M.N., Costa-Lotufu L.V., Moraes M.O.,

- Pessoa C.* // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2011. Vol. 68. P. 45. doi 10.1007/s00280-010-1446-2
29. *Magalhães H.I.F., Cavalcanti B.C., Bezerra D.P., Wilke D.V., Paiva J.C.G., Rotta R., Lima D.P., Beatriz A., Burbano R.R., Costa-Lotufio L.V., Moraes M.O., Pessoa C.* // *Toxicol. In Vitro.* 2011. Vol. 25. P. 2048. doi 10.1016/j.tiv.2011.08.007
30. *Kuznetsova D.A., Kuznetsov D.M., Amerhanova S.K., Buzmakova E.V., Lyubina A.P., Syakaev V.V., Nizamev I.R., Kadirov M.K., Voloshina A.D., Zakharova L.Ya.* // *Langmuir.* 2022. doi 10.1021/acs.langmuir.2c00299
31. *Mir M.A., Khan J.M., Khan R.H., Rather G.M., Dar A.A.* // *Colloids Surf. (B).* 2010. Vol. 77. P. 54. doi 10.1016/j.colsurfb.2010.01.005
32. *Кузнецова Д.А., Габдрахманов Д.Р., Кузнецов Д.М., Лукашенко С.С., Захарова Л.Я.* // *ЖФХ.* 2020. Т. 94. № 11. С. 1692; *Kuznetsova D.A., Gabdrakhmanov D.R., Kuznetsov D.M., Lukashenko S.S., Zakharova L.Ya.* // *Russ. J. Phys. Chem. (A).* 2020. Vol. 94. N 11. P. 2337. doi 10.1134/S0036024420110199
33. *Yin T., Qin M., Shen W.* // *Colloids Surf. (A).* 2014. Vol. 461. P. 22. doi 10.1016/j.colsurfa.2014.07.012
34. *Ojha B., Das G.* // *J. Phys. Chem. (B).* 2010. Vol. 114. P. 3979. doi 10.1021/jp907576r
35. *He W., Li Y., Xue C., Hu Z., Chen X., Sheng F.* // *Bioorg. Med. Chem.* 2005. Vol. 13. P. 1837. doi 10.1016/j.bmc.2004.11.038
36. *Joondan N., Laulloo S.J., Caumul P.* // *J. Dispers. Sci. Technol.* 2018. Vol. 39. P. 1550. doi 10.1016/j.jphotochem.2006.06.015
37. *Wang Y., Jiang X., Zhou L.* // *Colloids Surf. (A).* 2013. Vol. 436. P. 1159. doi 10.1016/j.colsurfa.2013.08.045
38. *Suryawanshi V.D., Walekar L.S., Gore A.H., Anbhule P.V., Kolekar G.B.* // *J. Pharm. Anal.* 2016. Vol. 6. P. 56. doi 10.1016/j.jpha.2015.07.001
39. *Li Y., Lee J.S.* // *Anal. Chim. Acta.* 2019. Vol. 1063. P. 18. doi 10.1016/j.aca.2019.02.024
40. *Kaur N., Kaur G., Kaur H., Chaudhary G.R.* // *J. Mol. Liq.* 2022. Vol. 345. P. 117818. doi 10.1016/j.molliq.2021.117818
41. *Lala H., Akrama M., Kabir-ud-Din* // *Colloids Surf. (A).* 2022. Vol. 646. P. 128944. doi 10.1016/j.colsurfa.2022.128944
42. *Singh I., Luxami V., Paul K.* // *Spectrochim. Acta (A).* 2020. Vol. 235. N 5. 118289. doi 10.1016/j.saa.2020.118289

Interaction of Bovine Serum Albumin with Cationic Imidazolium Surfactants Containing a Methoxyphenyl Fragment

D. A. Kuznetsova^{a,*}, D. M. Kuznetsov^a, V. M. Zakharov^b, and L. Ya. Zakharova^a

^a*Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, Federal Research Center
"Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences", Kazan, 420088 Russia*

^b*Kazan National Research Technological University, Kazan, 420015 Russia*

**e-mail: Dashyna111@mail.ru*

Received March 31, 2022; revised May 5, 2022; accepted May 10, 2022

Complexation ability of the imidazolium surfactants with a methoxyphenyl fragment with bovine serum albumin (BSA) was investigated by various physico-chemical methods (tensiometry, fluorescence spectroscopy, dynamic and electrophoretic light scattering). The addition of BSA leads to a decrease in the aggregation thresholds of surfactants by 1.5–2 times. It was established that the surfactants with the protein forms stable complexes, which is confirmed by the static character of the quenching of BSA fluorescence. The mechanism of interaction between BSA and surfactants in an aqueous solution was studied, the quantitative parameters of the binding of the components were calculated. It was revealed that the binding of the components occurs mainly at the tyrosine amino acid fragment with the participation of hydrogen bonds and van der Waals interactions. The method of dynamic and electrophoretic light scattering established an additional contribution of electrostatic forces and the hydrophobic effect in surfactant–BSA systems, which is expressed to a lesser extent.

Keywords: cationic surfactants, bovine serum albumin, surfactant–protein complexes