

ПЕРЕНОС ЭНЕРГИИ ЭЛЕКТРОННОГО ВОЗБУЖДЕНИЯ МЕЖДУ ТИОФЛАВИНОМ T И ЕГО СТИРИЛОВЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ПРИ ИХ ВСТРАИВАНИИ В АМИЛОИДНЫЕ ФИБРИЛЛЫ

Е. И. Плигин¹, А. А. Луговский², Е. С. Воропай², А. А. Маскевич^{1*}

УДК 535.371/547.681:547.458.68

¹ Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь;
e-mail: amaskevich@grsu.by

² Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

(Поступила 18 января 2024)

Изучены спектрально-люминесцентные свойства стироловой производной тιοфлавина T (ThT) — тозилата 2-{(1E,3E)-4-[4-(диметиламино)-2,6-диметилфенил]бута-1,3-диен-1-ил}-3-этил-1,3-бензотиазолия-3 (Th-C23). Установлено, что кинетика затухания флуоресценции Th-C23 при встраивании в амилоидные фибриллы (АФ) неэкспоненциальная и может быть представлена в виде одномодального распределения флуорофоров по длительности $\alpha(\tau)$. Показано, что ThT и Th-C23 при встраивании в структуру АФ образуют эффективную донорно-акцепторную (Д-А) пару. Несмотря на перенос энергии, степень поляризации флуоресценции акцептора высокая (~ 0.4) в пределах всего спектра, что объяснено особой ориентацией Д-А пар: параллельной и антипараллельной. На основании данных измерения спектров флуоресценции донора (ThT) и поглощения акцептора (Th-C23) рассчитан критический радиус переноса энергии R_0 , который может принимать значения от 54 до 68 Å в зависимости от взаимной ориентации и квантового выхода донора и акцептора.

Ключевые слова: тιοфлавин T, стироловые производные тιοфлавина T, кинетика затухания флуоресценции, амилоидные фибриллы, фёрстеровский резонансный перенос энергии, метод максимума энтропии.

The spectral and luminescent properties of the styryl derivative of thioflavin T (ThT) – 2-{(1E,3E)-4-[4-(dimethylamino)-2,6-dimethylphenyl]buta-1,3-dien-1-yl}-3-ethyl-1,3-benzothiazolium-3 tosylate – have been studied (Th-C23). It has been established that the kinetics of fluorescence decay of Th-C23 when incorporated into amyloid fibrils (AF) is not exponential and can be represented in the form of a unimodal distribution of fluorophores over duration $\alpha(\tau)$. It has been shown that ThT and Th-C23, when incorporated into AF structure, form an effective donor-acceptor (D-A) pair. Despite the energy transfer, the polarization degree of the acceptor fluorescence has high values (~ 0.4) within the entire spectrum, which is explained by the special orientation of D-A pairs: parallel and antiparallel. Based on measurements of the fluorescence spectrum of the donor (ThT) and the absorption spectrum of the acceptor (Th-C23), the critical energy transfer radius R_0 has been calculated, which can take values from 54 to 68 Å depending on the mutual orientation and quantum yield of the donor and acceptor.

Keywords: thioflavin T, styryl derivatives of thioflavin T, fluorescence decay kinetics, time-resolved fluorescence, amyloid fibrils, Forster resonance energy transfer, maximum entropy method.

Введение. Особенностью спектральных свойств флуоресцентных молекулярных роторов (МР) является сильная зависимость квантового выхода и длительности затухания флуоресценции от вязкости микроокружения [1—4]. Эти свойства МР определяют их широкое применение в качестве сенсоров микровязкости и температуры в локально малых объемах [5, 6]. Одно из важнейших применений МР — их использование для детекции и исследования механизма образования амилоидных фибрилл (АФ)

TRANSFER OF ELECTRONIC EXCITATION ENERGY BETWEEN THIOFLAVIN T AND ITS STYRYL DERIVATIVES WHEN INCORPORATED INTO AMYLOID FIBRILS

E. I. Pligin¹, A. A. Lugovski², E. S. Voropay², A. A. Maskevich^{1*} (¹ Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Belarus; e-mail: amaskevich@grsu.by; ² Belarusian State University, Minsk, Belarus)

[7—10]. Для исследования АФ традиционно используется бензтиазоловый краситель тиофлавин Т (ThT), также проявляющий свойства МР [3]. Работы по развитию применения МР для исследований АФ направлены на улучшение их оптических свойств, в частности, на создание красителей, имеющих поглощение и флуоресценцию в красной или ближней ИК-области спектра, и повышение их специфичности. С этой целью в последнее время синтезирован ряд стироловых производных бензтиазола, многие из которых обладают свойствами МР [11—15]. Одним из таких соединений является стироловая производная тиофлавина Т — тозилат 2-{(1E,3E)-4-[4-(диметиламино)-2,6-диметилфенил]бута-1,3-диен-1-ил}-3-этил-1,3-бензтиазолия-3 (Th-C23). Ранее было установлено [15], что данный краситель имеет длинноволновое положение спектров поглощения и флуоресценции (520 и 600 нм). На основании квантово-химических расчетов и экспериментальных исследований показано, что Th-C23 является молекулярным ротором. Вследствие этого квантовый выход его флуоресценции в маловязких растворителях имеет малое значение ($\sim 10^{-4}$), которое увеличивается более чем на три порядка при встраивании в АФ.

В настоящей работе исследованы спектральные свойства Th-C23 в растворе, а также его комплекса с АФ. Показано, что данный краситель совместно с тиофлавином Т может быть использован в качестве донорно-акцепторной пары для исследования структуры и свойств АФ.

Эксперимент. Спектры поглощения растворов измерены с помощью спектрофотометра Specord 200 PC (Carl Zeiss, Германия), спектры флуоресценции — спектрофлуориметра CM2203 (“Солар”, Беларусь). Измерения длительности затухания флуоресценции выполнены на лабораторной установке собственного изготовления, работающей в режиме времякоррелированного счета одиночных фотонов [16]. Для анализа кривых затухания флуоресценции использовано программное обеспечение, созданное в Гродненском государственном университете [17, 18]. При анализе экспериментальных кривых затухания флуоресценции Th-C23 использованы модели дискретного и непрерывного распределения флуорофоров по длительности свечения. В первом случае функция затухания флуоресценции $F(t)$ представлена суммой нескольких экспонент:

$$F(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i \exp(-t / \tau_i),$$

где α_i и τ_i — амплитуда и длительность затухания i -й компоненты; n — число экспонент.

Вклад отдельной компоненты в затухание флуоресценции определен по формуле $S_i = \tau_i / \sum \alpha_i \tau_i$.

При моделировании непрерывным распределением по длительностям затухания свечения функция $F(t)$ представлена в виде

$$F(t) = \int_0^{\infty} \alpha(\tau) \exp[-t / \tau] dt,$$

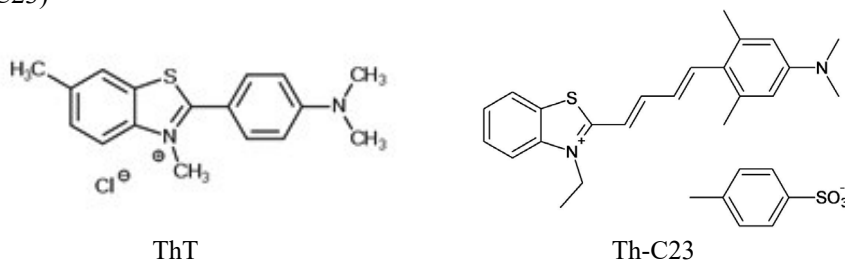
где $\alpha(\tau)$ — некоторая непрерывная функция. Распределение $\alpha(\tau)$ определяли с использованием метода максимума энтропии (МЭМ) [18, 19].

Критерием качества аппроксимации служила величина χ^2 ($\chi^2 \leq 1$), а также случайное распределение взвешенных остатков относительно оси времени:

$$\chi^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N W_i [I_e(t_i) - I(t_i)]^2, \quad R(t_i) = [I_e(t_i) - I(t_i)],$$

где W_i — весовой множитель; N — общее число экспериментальных точек. Расчетная функция $I(t)$ — результат свертки истинной функции затухания $F(t)$ образца с инструментальной функцией $L(t)$ установки.

Тозилат 2-{(1E,3E)-4-[4-(диметиламино)-2,6-диметилфенил]бута-1,3-диен-1-ил}-3-этил-1,3-бензтиазолия-3 (Th-C23)



синтезирован на кафедре лазерной физики и спектроскопии БГУ доц. А. А. Луговским. Структура синтезированного соединения подтверждена с помощью ЯМР- и масс-спектроскопии. Спектры

^1H ЯМР зарегистрированы в растворе CD_3CN на спектрометре Bruker AC 500 с рабочей частотой 500 МГц. Масс-спектры зарегистрированы с помощью жидкостного хроматографа Agilent 1200 Rapid Resolution LC и масс-детектора Agilent 6410 Triple Quad. В качестве образца, вводимого в анализатор, использован раствор 1 мг красителя в 1 мл ацетонитрила.

АФ готовили из инсулина быка (Sigma, США) по стандартной методике [20].

Результаты и их обсуждение. Кинетика затухания флуоресценции Th-C23 в присутствии АФ в растворе. Особенностью флуоресценции МР является неэкспоненциальность кинетики ее затухания [21, 22]. Причиной этого служит неравновесный характер излучающего состояния вследствие торсионной и сопутствующей ей сольватной релаксации. В результате анализа кинетики затухания флуоресценции Th-C23 ($\lambda_{\text{возб}} = 467$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 600$ нм) при представлении функции затухания суммой экспонент получены следующие параметры: $\alpha_1 = 0.750$, $\tau_1 = 0.07 \pm 0.01$ нс, $S_1 = 36.6\%$, $\alpha_2 = 0.237$, $\tau_2 = 0.33 \pm 0.01$ нс, $S_2 = 52.0\%$, $\alpha_3 = 0.013$, $\tau_3 = 1.30 \pm 0.04$ нс, $S_3 = 11.4\%$, $\langle \tau \rangle = 0.35 \pm 0.04$ нс, $\chi^2 = 1.16$. Несмотря на ограничение релаксационных процессов при встраивании в АФ, кинетика является неэкспоненциальной и с хорошим качеством аппроксимации ($\chi^2 \approx 1$) может быть представлена суммой трех экспоненциальных слагаемых. Полагаем, что сложный характер кинетики затухания флуоресценции вызван гетерогенностью микроокружения молекул Th-C23, т. е. молекулы красителя, которые находятся в жестком микроокружении и торсионная релаксация которых является ограниченной, имеют большую длительность затухания флуоресценции.

Для гетерогенных систем, каковыми являются АФ, представление функции затухания суммой нескольких экспонент является формальным, поскольку придать определенный смысл отдельным компонентам часто затруднительно. В этом случае адекватно моделирование функции затухания непрерывным распределением флуорофоров по длительности затухания свечения [18]. Результаты такого моделирования представлены на рис. 1. Видно, что представление функции $\alpha(\tau)$ одномодальным распределением с максимумом $\tau_0 \sim 1$ нс является адекватным, подтверждением чему служит случайный характер распределения относительных разностей $R(t)$.

Ранее было показано [18, 11], что каждой моде распределения $\alpha(\tau)$ соответствует определенный способ встраивания молекул красителя в АФ. Можно предположить, что в нашем случае одной обнаруженной моде распределения $\alpha(\tau)$ соответствует один способ встраивания красителя Th-C23 в структуру АФ, для которого характерна определенная ориентация молекул относительно бороздок фибрилл. Для проверки данного предположения и уточнения геометрии комплекса АФ—краситель измерена степень поляризации флуоресценции.

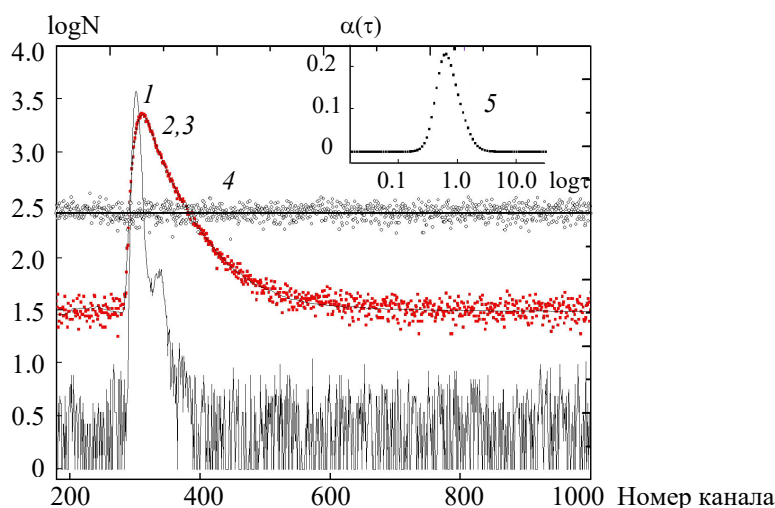


Рис. 1. Результаты измерения и анализа кинетики затухания флуоресценции водного раствора Th-C23 в присутствии 0.05 мг/мл АФ ($\lambda_{\text{фл}} = 600$ нм): 1 — временной профиль возбуждающего импульса ($\lambda_{\text{возб}} = 467$ нм), время на канал 0.036 нс; 2 и 3 — кривые затухания флуоресценции (точки — эксперимент, сплошная линия — результат аппроксимации функции затухания непрерывным распределением $\alpha(\tau)$, представленным на вставке кривой 5); 4 — распределение относительных разностей, соответствующих распределению $\alpha(\tau)$

Степень поляризации флуоресценции Th-C23. В работах [23, 24] отмечалось, что степень поляризации флуоресценции ThT и других бензтиазоловых красителей не является информативным параметром, поскольку она практически не зависит от вязкости и жесткости микроокружения флуорофоров. Это происходит потому, что время вращательной релаксации молекулы, как правило, намного больше времени торсионной релаксации ее фрагментов относительно друг друга, приводящей к безызлучательной дезактивации, т. е. за время нахождения в возбужденном состоянии молекулы не успевают существенно изменить свою ориентацию [23]. Это приводит к тому, что степень поляризации флуоресценции большинства МР, том числе ThT и его производных, имеет предельно высокое значение в растворителях высокой и низкой вязкости и при встраивании в структуру биополимеров [23—26]. Представленные на рис. 2 результаты измерения степени поляризации флуоресценции комплекса Th-C23 (5 мкмоль/л) + АФ (0.05 мг/мл) + 6 мкмоль/л ThT, подтверждают, что степень поляризации красителя в растворе в составе комплекса высокая в пределах всего спектра флуоресценции.

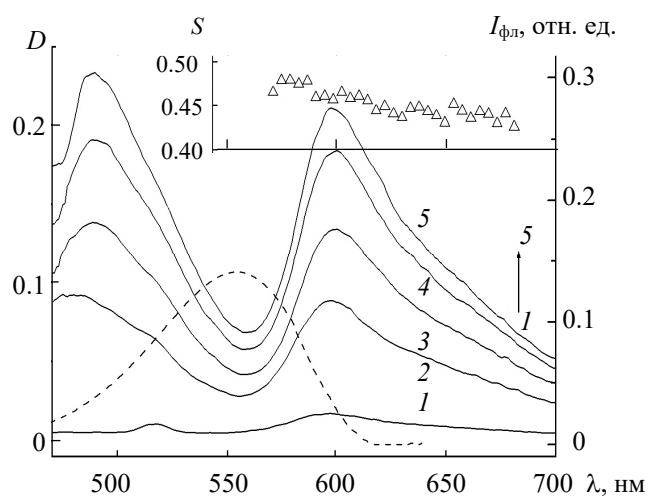


Рис. 2. Спектры флуоресценции водного раствора комплекса Th-C23 (5 мкмоль/л) + АФ (0.05 мг/мл) + ThT ([ThT] = 0 (1), 1 (2), 2 (3), 4 (4) и 6 мкмоль/л (5)); на вставке точки — зависимость степени поляризации S флуоресценции от длины волны комплекса в присутствии 6 мкмоль/л ThT, $\lambda_{\text{возб}} = 440$ нм; штриховая — спектр поглощения водного раствора Th-C23 (4 мкмоль/л) в присутствии АФ (0.05 мг/мл) после вычитания рэлеевского рассеяния раствора

Спектр флуоресценции ThT, встроенного в АФ, и спектр поглощения Th-C23 имеют значительное перекрытие (рис. 1, штриховая), поэтому эти красители являются удобной донорно-акцепторной парой для исследования процесса переноса энергии при их связывании с АФ. Оба красителя эффективно встраиваются в АФ, образуя интенсивно флуоресцирующий комплекс. Для определения возможности образования комплекса между свободными молекулами красителей и эффективности переноса энергии между ними в водном растворе исследованы спектры поглощения и флуоресценции водных растворов Th-C23 при добавлении различных концентраций ThT. При увеличении концентрации ThT в спектре поглощения (рис. 3) появляется коротковолновая полоса с максимумом при 415 нм, что полностью соответствует поглощению водного раствора свободного ThT, т. е. спектр поглощения представляет собой суперпозицию индивидуальных спектров красителей. Как показано в [15], квантовый выход флуоресценции Th-C23 чрезвычайно низок (~ 0.001). Добавление ThT не приводит к заметному изменению интенсивности флуоресценции раствора Th-C23 как при $\lambda_{\text{возб}} = 420$ нм (вблизи максимума поглощения ThT), так и при $\lambda = 550$ нм (что соответствует полосе поглощения Th-C23). Показано, что оба красителя при исследуемых концентрациях (1—10 мкмоль/л) в водном растворе флуоресцирующий комплекс не образуют и переноса энергии между молекулами не происходит.

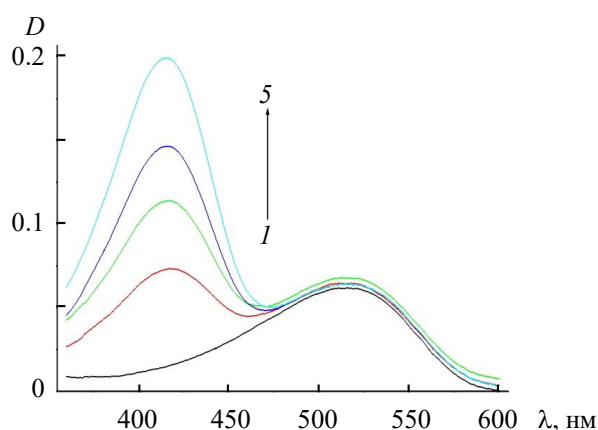


Рис. 3. Спектры поглощения водного раствора 5 мкмоль/л Th-C23 при добавлении ThT 0 (1), 1 (2), 2 (3), 4 (4) и 6 мкмоль/л (5)

Рассмотрим результаты измерения спектров флуоресценции комплекса (Th-C23–ThT) в присутствии в растворе молекул АФ при $\lambda_{\text{возб}} = 440$ нм, соответствующей максимуму спектра поглощения ThT. На этой длине волны поглощение красителя Th-C23, связанного с АФ, незначительно (рис. 2). В отсутствие ThT интенсивность флуоресценции на $\lambda = 600$ нм, соответствующей максимуму свечения комплекса (Th-C23–АФ), невысокая (рис. 2). Внесение в раствор 1.0 мкмоль/л ThT вызывает появление полосы испускания этого красителя (480 нм) и пятикратное увеличение интенсивности свечения Th-C23 (600 нм). Увеличение концентрации ThT приводит к дальнейшему росту флуоресценции Th-C23. Характерно, что положение спектра флуоресценции при этом не изменяется. Поскольку спектр флуоресценции ThT, встроенного в АФ, перекрывается со спектром поглощения комплекса Th-C23–АФ, считаем, что причиной увеличения интенсивности свечения является индуктивно-резонансный перенос энергии возбуждения от ThT, являющегося донором, к Th-C23 (акцептору). Эффективному переносу энергии способствует то, что при встраивании данных красителей в АФ их квантовый выход флуоресценции значительно увеличивается. Перенос энергии приводит к уменьшению средней длительности флуоресценции донора, что подтверждается экспериментально — средняя длительность флуоресценции ThT уменьшается с 1.28 до 0.87 нс.

Характерно, что при $\lambda_{\text{возб}} = 550$ нм, соответствующей максимуму поглощения комплекса Th-C23–АФ, изменение концентрации ThT приводит лишь к незначительному уменьшению интенсивности флуоресценции (рис. 4). По нашему мнению, это является следствием некоторой конкуренции молекул красителей за места встраивания в структуру АФ.

Флуоресценция акцептора при переносе энергии в растворе, как правило, сильно деполаризована [27]. Однако в нашем случае ситуация иная. Как отмечалось, степень поляризации флуоресценции Th-C23 в составе комплекса при $\lambda_{\text{возб}} = 440$ нм высокая в пределах всего спектра флуоресценции: 0.47 на коротковолновом крае и 0.42 на длинноволновом (рис. 2). Поскольку при концентрации ThT 5.0 мкмоль/л при $\lambda_{\text{возб}} = 440$ нм основная интенсивность флуоресценции Th-C23 создается благодаря переносу энергии, следует признать, что этот процесс в нашем случае не приводит к деполаризации флуоресценции. Это возможно только при выполнении двух условий: 1) молекулы донора и акцептора находятся в жестких условиях; 2) моменты переходов донора и акцептора либо параллельны, либо антипараллельны.

Константа скорости индуктивно-резонансного переноса энергии электронного возбуждения может быть определена из соотношения:

$$k = 1/\tau_D(R/R_0)^6,$$

где τ_D — длительность затухания флуоресценции донора в отсутствие акцептора; R — расстояние от донора до акцептора; R_0 — фёрстеровский радиус переноса, при котором константа скорости переноса равна константе скорости излучательного процесса. Фёрстеровский радиус, выраженный в ангстремах, определяется из соотношения

$$R_0 = 8.8 \cdot 10^{-25} \kappa^2 q_D n^{-4} J$$

Здесь κ^2 — фактор, учитывающий взаимную ориентацию молекул донора и акцептора; q_D — квантовый выход донора в отсутствие акцептора; n — показатель преломления среды; J — интеграл пере-

кривания, учитывающий перекрытие спектра флуоресценции донора и спектра поглощения акцептора энергии:

$$J = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda,$$

где $F_D(\lambda)$ — нормированный к единице спектр флуоресценции донора; $\varepsilon_A(\lambda)$ — коэффициент экстинкции акцептора, соответствующий длине волны λ .

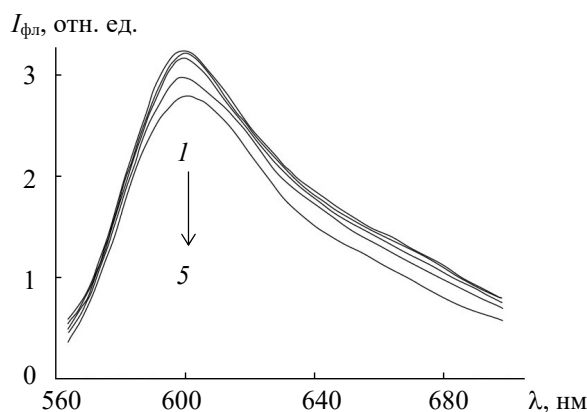


Рис. 4. Спектр флуоресценции комплекса Th-C23 (5 мкмоль/л)+АФ (0.05 мг/мл)+ThT ([ThT] = 0 (1), 1 (2), 2 (3), 4 (4) и 6 мкмоль/л (5)); $\lambda_{\text{возб}} = 550$ нм

В работах [28—30] с использованием различных методов показано, что при встраивании в АФ молекулы ThT имеют плоскую структуру и расположены вдоль бороздок фибрилл. На основании анализа кинетики затухания флуоресценции ThT, характеризующейся двухмодальным распределением, уточнена модель Кребса [28]. В соответствии с нашими результатами, основная часть молекул ThT встраивается в бороздки фибрилл вдоль их длинной оси. Встроенные таким образом молекулы ThT имеют очень ограниченную свободу внутреннего вращения и характеризуются более высоким квантовым выходом, большей длительностью флуоресценции, что подтверждается измерениями степени поляризации флуоресценции ThT в растянутых пленках ПВХ, а также в АФ [28]. Другая часть молекул зонда встраивается в АФ перпендикулярно их длинной оси. Фрагменты молекул зонда имеют в этом случае большую свободу торсионных движений, что приводит к значительному уменьшению квантового выхода и длительности затухания флуоресценции [18].

На эффективность процесса переноса энергии существенное влияние оказывает ориентационный фактор κ^2 , который в зависимости от взаимной ориентации донора и акцептора может изменяться от 0 до 4. Поскольку степень поляризации флуоресценции акцептора имеет высокое, близкое к предельному, значение, полагаем, что в нашем случае $\kappa^2 = 4$ (параллельная ориентация донора и акцептора) либо $\kappa^2 = 1$ (антипараллельная ориентация). С учетом этого рассчитаны значения $R_0 = 54$ и 68 Å. При расчетах учтено, что для ThT имеется две моды встраивания в АФ, для которых квантовый выход флуоресценции равен 0.83 и 0.30 [31]. Однако, поскольку для второй моды встраивания молекулы красителя ориентированы перпендикулярно бороздкам, рассматривались только молекулы первой моды, расположенные вдоль бороздок. Для Th-C23, как показано ранее, имеется только одна мода встраивания; квантовый выход флуоресценции красителя 0.15. Также рассмотрены два случая ориентации донора и акцептора: параллельная и антипараллельная (два возможных значения R_0). Фёрстеровский радиус диполь-дипольного переноса энергии для системы (ThT+АФ)+Th-C23 может изменяться в пределах 54—68 Å. Приведенные значения являются усредненными. Уточнение можно сделать с использованием измерения кинетики затухания флуоресценции донора при наличии акцептора и в его отсутствие.

В результате переноса энергии изменяется также кинетика затухания флуоресценции ThT. На рис. 5 показаны распределения $\alpha(\tau)$, полученные в результате анализа кривых затухания свечения с использованием метода максимума энтропии. Видно, что в отсутствие в растворе акцептора мода затухания, характеризующаяся большей длительностью, имеет большую амплитуду. При наличии акцептора (Th-C23) относительная амплитуда долгоживущей моды уменьшается, короткоживущей —

увеличивается. Это показывает, что перенос энергии в большей степени характерен для флуорофоров с большой длительностью. Перенос энергии эффективен, поскольку дипольные моменты донора и акцептора параллельны друг другу.

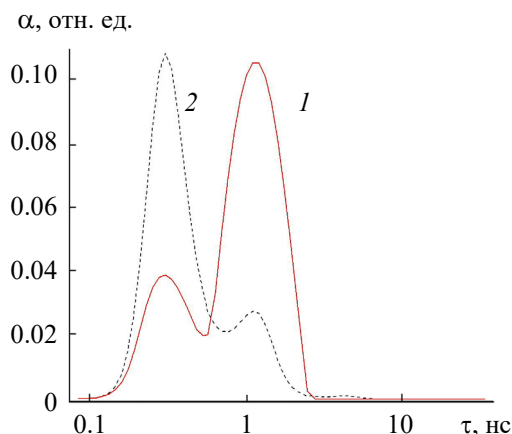


Рис. 5. Распределение $\alpha(\tau)$, полученное в результате анализа кривых затухания флуоресценции растворов ThT (5.0 мкмоль/л)+АФ (0.05 мг/мл) (1) и ThT (5.0 мкмоль/л)+АФ (0.05 мг/мл)+Th-C23 (2) (5.0 мкмоль/л); $\lambda_{\text{возб}} = 407$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 490$ нм

Заключение. Кинетика затухания флуоресценции стироловой производной Th-C23, интеркалированной в амилоидные фибриллы, является неэкспоненциальной и может быть представлена в виде одномодального распределения флуорофоров по длительности затухания $\alpha(\tau)$, что указывает на наличие одной моды встраивания Th-C23 в амилоидные фибриллы.

Новое производное тиофлавина Т Th-C23, эффективно встраивающееся в структуру амилоидных фибрилл и имеющее длинноволновое положение спектра поглощения, совместно с ThT образуют удобную донорно-акцепторную пару, где ThT выступает в качестве донора, а Th-C23 — в качестве акцептора энергии электронного возбуждения. Несмотря на перенос энергии, степень поляризации флуоресценции акцептора имеет высокое значение, близкое к предельному. Это позволяет сделать вывод, что молекулы донора и акцептора имеют параллельную либо антипараллельную взаимную ориентацию. На основании теории индуктивно-резонансного переноса энергии Фёрстера определен критический радиус переноса, который может изменяться от 54 до 68 Å в зависимости от взаимной ориентации и квантового выхода донора и акцептора.

Выполненные исследования подтверждают сделанное ранее предположение о том, что стироловые производные тиофлавина Т встраиваются в бороздки амилоидных фибрилл главным образом вдоль их длинной оси и открывают возможности использования индуктивно-резонансного переноса энергии для изучения структуры и механизма образования фибрилл.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования РБ, ГПНИ “Фотоника и электроника для инноваций”, задание 1.5.

- [1] M. A. Haidekker, T. P. Brady, D. Lichlyter, E. A. Theodorakis. *Bioorg. Chem.*, **33**, N 6 (2005) 415—425, doi: 10.1016/j.bioorg.2005.07.005
- [2] W. L. Goh, M. Y. Lee, Th. L. Joseph, S. T. Quah, Ch. J. Brown, Ch. Verma, S. Brenner, F. J. Ghadessy, Y. N. Teo. *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, N 17 (2014) 6159—6162, doi: 10.1021/ja413031h
- [3] V. I. Stsiapura, A. A. Maskevich, V. A. Kuzmitsky, V. N. Uversky, I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov. *J. Phys. Chem. B*, **112**, N 49 (2008) 15893—15902, doi: 10.1021/jp805822c
- [4] N. Amdursky, R. Gepshtein Y. Erez, D. Huppert. *J. Phys. Chem. A*, **115**, N 12 (2011) 2540—2548, doi: 10.1021/jp1121195
- [5] M. A. Haidekker, Th. P. Brady, D. Lichlyter, E. A. Theodorakis. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, N 2 (2006) 398—399, doi: 10.1021/ja056370a
- [6] M. K. Kuimova, G. Yahiolglu, J. A. Levitt, K. Suhling. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, N 21 (2008) 6672—6673, doi: 10.1021/ja800570d

- [7] **T. Ban, D. Hamada, K. Hasegawa, H. Naiki, Y. Goto.** *J. Biol. Chem.*, **278**, N 19 (2003) 16462—16465, doi: 10.1074/jbc.C300049200
- [8] **S. A. Hudson, H. Ecroyd, T. W. Kee, J. A. Carver.** *FEBS J.*, **276**, N 20 (2009) 5960—5972, doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07307.x
- [9] **H. Naiki, K. Higuchi, M. Hosokawa, T. Takeda.** *Anal. Biochem.*, **177**, N 2 (1989) 244—249, doi: 10.1016/0003-2697(89)90046-8
- [10] **N. Yue, H. Fu, Y. Chen, X. Gao, J. Dai, M. Cui.** *Eur. J. Med. Chem.*, **243** (2022) 114715, doi: 10.1016/j.ejmech.2022.114715
- [11] **G. Gorbenko, V. Trusova, E. Kirilova, G. Kirilov, I. Kalnina, A. Vasilev, S. Kaloyanova, T. Deligeorgiev.** *Chem. Phys. Lett.*, **495** (2010) 4—6, doi: 10.1016/j.cplett.2010.07.005
- [12] **А. В. Лавыш, А. И. Сулацкая, А. А. Луговский, Е. С. Воропай, И. М. Кузнецова, К. К. Туроверов, А. А. Маскевич.** *Журн. прикл. спектр.*, **81**, № 2 (2014) 209—218 [A. V. Lavysh, A. I. Sulatskaya, A. A. Lugovskii, E. S. Voropay, I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov, A. A. Maskevich. *J. Appl. Spectr.*, **81**, N 2 (2014) 205—213]
- [13] **А. А. Маскевич.** *Журн. Бел. гос. ун-та. Физика*, № 2 (2021) 4—14
- [14] **А. А. Маскевич.** *Журн. прикл. спектр.*, **88**, № 6 (2021) 852—857 [A. A. Maskevich. *J. Appl. Spectr.*, **88** (2021) 1125—1130]
- [15] **Е. И. Плигин, А. В. Лавыш, А. А. Луговский, Е. С. Воропай, Э. Е. Копишев, А. А. Маскевич.** *Журн. прикл. спектр.*, **89**, № 6 (2022) 762—769 [E. I. Pligin, A. V. Lavysh, A. A. Lugovskii, E. S. Voropay, É. E. Kopishev, A. A. Maskevich. *J. Appl. Spectr.*, **89**, N 6 (2022) 205—213]
- [16] **А. А. Маскевич, В. И. Степура, С. А. Кургузенков, А. В. Лавыш.** *Веснік ГрДзУ імя Янкі Купалы. Сер. 2, Матэматыка. Фізіка. Інфарматыка, вылічальная тэхніка і кіраванне*, **159**, № 3 (2013) 107—119
- [17] **В. И. Степура.** *Веснік ГрДзУ імя Янкі Купалы. Сер. 2*, **5**, N 1 (2001) 52—61
- [18] **А. А. Маскевич, В. И. Степура, П. Т. Балинский.** *Журн. прикл. спектр.*, **77**, № 2 (2010) 209—217 [A. A. Maskevich, V. I. Stsiapura, P. T. Balinski. *J. Appl. Spectr.*, **77**, N 2 (2010) 194—201]
- [19] **A. K. Livesey, J.-C. Brochon.** *Biophysical J.*, **52**, N 5 (1987) 693—706, doi: 10.1016/S0006-3495(87)83264-2
- [20] **A. A. Maskevich, V. I. Stsiapura, V. A. Kuzmitsky, I. M. Kuznetsova, O. I. Povarova, V. N. Uversky, K. K. Turoverov.** *J. Proteome Res.*, **6**, N 4 (2007) 1392—1401, doi: 10.1021/pr0605567
- [21] **P. K. Singh, M. Kumbhakar, H. Pal, S. Nath.** *J. Phys. Chem. B*, **114**, N 17 (2010) 5920—5927, doi: 10.1021/jp100371s
- [22] **Y. Erez, Y.-H. Liu, N. Amdursky, D. Huppert.** *J. Phys. Chem. A*, **115**, N 30 (2011) 8479—8487, doi: 10.1021/jp204520r
- [23] **I. M. Kuznetsova, A. I. Sulatskaya, A. A. Maskevich, V. N. Uversky, K. K. Turoverov.** *Anal. Chem.*, **88**, N 1 (2016) 718—724, doi: 10.1021/acs.analchem.5b02747
- [24] **M. Groenning.** *J. Chem. Biol.*, **3**, N 49 (2010) 1—18, doi: 10.1007/s12154-009-0027-5
- [25] **А. А. Маскевич.** *Веснік ГрДзУ імя Янкі Купалы. Сер. 2, Матэматыка. Фізіка. Інфарматыка, вылічальная тэхніка і кіраванне*, **10**, N 1 (2021) 83—92
- [26] **R. Sabate, S. Saupe.** *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **360** (2007) 135—138, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.06.063
- [27] **Л. В. Левшин, А. М. Салецкий.** *Люминесценция и ее измерения: Молекулярная люминесценция*, Москва, МГУ (1989) 159—165
- [28] **M. R. Krebs, E. H. Bromley, A. M. Donald.** *J. Struct. Biol.*, **149**, N 1 (2005) 30—37, doi: 10.1016/j.jsb.2004.08.002
- [29] **А. А. Маскевич, С. А. Кургузенков, А. В. Лавыш, Л. Н. Кивач, С. А. Маскевич.** *Журн. прикл. спектр.*, **82**, № 4 (2015) 497—504 [A. A. Maskevich, S. A. Kurhuzenkau, A. V. Lavysh, L. N. Kivach, S. A. Maskevich. *J. Appl. Spectr.*, **82**, N 4 (2015) 532—539]
- [30] **Ch. Wu, Zh. Wang, H. Lei, Y. Duan, M. T. Bowers, J.-E. Shea.** *J. Mol. Biol.*, **384**, N 3 (2008) 718—729, doi: 10.1016/j.jmb.2008.09.062
- [31] **A. I. Sulatskaya, A. A. Maskevich, I. M. Kuznetsova, V. N. Uversky, K. K. Turoverov.** *PLoS One*, **5**, N 10 (2010) e15385, doi: 10.1371/journal.pone.0015385