

УДК 577.352

ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИЕ ПОТЕНЦИАЛЫ ПРИ АДсорбЦИИ И ФОТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ ПИРАНИНА НА БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ

© 2025 г. В. С. Соколов^{а, *}, В. Ю. Ташкин^а, Д. Д. Зыкова^{а, b}, Л. Е. Поздеева^с

^аИнститут физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, 119071 Россия

^bМосковский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Московская обл., г. Долгопрудный, 141700 Россия

^сМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: sokolov.valerij@gmail.com

Поступила в редакцию 20.06.2024

После доработки 16.09.2024

Принята к публикации 18.09.2024

Изучены адсорбция и фотохимические реакции пиранина на бислойной липидной мембране (БЛМ) с помощью измерения электростатических потенциалов на границе мембраны с водой. Зависимость электростатических потенциалов, возникающих из-за адсорбции пиранина, от его концентрации в растворе описывается теорией Гуи–Чепмена в предположении, что на мембране адсорбируются анионы с тремя заряженными группами. При освещении БЛМ с адсорбированным на ней пиранином существенных изменений граничного потенциала не обнаружено. Значительные изменения потенциала наблюдались, если на БЛМ помимо пиранина были адсорбированы молекулы стироловых красителей di-4-ANEPPS или RH-421. Знак и величина этих изменений соответствуют исчезновению дипольного потенциала, создаваемого молекулами стироловых красителей на БЛМ. Скорость исчезновения потенциала была пропорциональна концентрации пиранина и интенсивности освещения. Исчезновение потенциала может быть вызвано как связыванием протонов, освободившихся из молекулы пиранина, с молекулами красителей с их последующей десорбцией с БЛМ, так и их разрушением. Молекулы пиранина и стироловых красителей могут образовывать комплексы на границе БЛМ. Об этом говорят эксперименты, в которых сумма изменений потенциала, вызванных их адсорбцией по отдельности, значительно отличалась от изменения граничного потенциала при их одновременной адсорбции. Кинетика исчезновения дипольного потенциала БЛМ со стироловыми красителями при возбуждении пиранина оказалась аналогичной наблюдавшейся ранее с другим соединением — 2-метокси-5-нитрофенилсульфатом натрия, освобождающим протоны на границе мембраны при освещении. Это позволяет предположить, что она связана с десорбцией с мембраны молекул красителя, из-за связывания с ними протонов, освободившихся из возбужденных молекул пиранина.

Ключевые слова: пиранин, стироловые красители, протоны на границе мембраны, адсорбция, поверхностный потенциал, липидная мембрана

DOI: 10.31857/S0233475525010047, EDN: utzija

ВВЕДЕНИЕ

Для изучения кинетики функционирования белков, осуществляющих транспорт протонов через мембрану, используют соединения, выделяющие протоны на поверхности мембраны при поглощении ими света (caged- H^+). Адсорбцию и фотохимические реакции таких соединений можно изучать на бислойных липидных мембранах (БЛМ) с помощью методов, позволяющих

измерять скачок электростатического потенциала на границе мембраны с раствором [1, 2]. Существуют два типа таких соединений. В соединениях первого типа освобождение протона при поглощении света происходит в результате необратимой реакции, в ходе которой от молекулы отрывается кислотный остаток [3–6]. Соединение этого типа — 2-метокси-5-нитрофенилсульфат натрия (MNPS), молекула которого при возбуждении необратимо высвобождает сульфат

и протон, изучалось нами ранее на БЛМ методом компенсации внутримембранного поля [1, 2]. Было показано, что его молекулы адсорбируются на БЛМ как анионы, а при их возбуждении возникает скачок потенциала, вызванный частично разрушением на БЛМ этих анионов, частично — связыванием на БЛМ протонов, освободившихся в результате этой реакции. Вызванные связыванием протонов изменения потенциала определялись зависимостью поверхностного заряда БЛМ от pH, вызванной наличием титруемых групп фосфолипидов [2]. Это ограничивало чувствительность данного метода и область pH, в которой можно было проводить измерения. Более чувствительные методы используют флуоресцентные зонды, позволяющие оценить изменение концентрации протонов на поверхности мембраны с помощью оптических измерений [7–12]. Возможен также альтернативный метод оценки изменения концентрации протонов на поверхности мембраны по изменению электростатических потенциалов, вызванных стироловыми красителями — di-4-ANEPPS или RH-421. Их молекулы обладают значительным дипольным моментом, образованным отрицательно заряженной сульфогруппой на одном конце молекулы и положительно заряженным атомом азота — на другом. Из-за этого дипольного момента молекулы красителя, адсорбируясь на поверхности мембраны, создают на ней скачок потенциала [13]. Эти красители изначально использовались для регистрации электрического поля в мембране [14, 15]. Молекулы этих красителей также могут окисляться синглетным кислородом, что позволило найти им еще одно применение — для изучения фотосенсибилизаторов, причем кинетику их окисления в мембране можно регистрировать, измеряя скачок потенциала на границе мембраны с раствором [16]. Адсорбция молекул красителей на мембране зависит от pH, поэтому их можно использовать и как зонды для регистрации протонов, связанных на поверхности БЛМ. Это было продемонстрировано в экспериментах с MNPS: при фотоиндуцированном освобождении протонов из молекул MNPS происходило уменьшение потенциала, вызванного адсорбцией di-4-ANEPPS на поверхности БЛМ [17].

В фотоактивируемых соединениях другого типа освобождение протона происходит из-за диссоциации молекулы, рК которой в возбужденном состоянии оказывается значительно ниже рК в основном состоянии [18, 19]. Наиболее изученным соединением такого класса является пиранин. При возбуждении молекулы

пиранина происходит диссоциация протона, который затем может присоединяться к акцептору, прежде всего к молекуле воды. Пиранин применялся и как флуоресцентный индикатор изменения pH в растворе, и как индикатор степени гидратации среды [20], и как фоточувствительный источник протонов при изучении кинетики протонного транспорта через мембраны [21]. В настоящей работе показано, что пиранин способен адсорбироваться на БЛМ и вызывать при освещении десорбцию с мембраны молекул стироловых красителей аналогично изученному нами ранее MNPS.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бислойную липидную мембрану формировали из дифитаноилфосфатидилхолина (Avanti Polar Lipids, США), растворенного в *n*-декане в концентрации 15 мг/мл, по методу Мюллера–Рудина [22] на отверстии диаметром 0.8 мм в перегородке тефлоновой ячейки.

Водные растворы, применявшиеся в экспериментах, содержали KCl («Рехим», Россия), лимонную кислоту («Рехим», Россия), HEPES (Sigma, США), Tris (Sigma) и были приготовлены на дважды дистиллированной воде. В экспериментах были использованы стироловые красители di-4-ANEPPS и RH-421, а также 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid (пиранин) (Sigma-Aldrich, США).

Стироловые красители и пиранин добавляли в дальний (по отношению к источнику света) отсек ячейки. Растворы в обоих отсеках ячейки непрерывно перемешивались с помощью магнитной мешалки. При освещении БЛМ постоянным светом использовали ультрафиолетовый светодиод с длиной волны 375 нм и максимальной электрической мощностью 3 Вт. Мощность освещения регулировали, варьируя величину подаваемого на светодиод напряжения.

В электрических измерениях использовали хлорсеребряные электроды, контакт которых с растворами в ячейке осуществлялся через агаровые мостики, изготовленные из пластиковых носиков. Нижняя часть носика была заполнена агаром (использовался 3% агар, приготовленный в растворе 100 мМ KCl), верхняя — тем же раствором, который находился в ячейке. Электростатические потенциалы на границе мембраны с раствором измеряли методом компенсации внутримембранного поля [23, 24]. Установка для электрических измерений емкости мембраны и разности граничных потенциалов

была идентична описанной нами ранее [2, 17]. Измеренное значение разности граничных потенциалов непрерывно записывалось на диск компьютера. Кинетику изменения граничного потенциала при освещении аппроксимировали экспоненциальными функциями с помощью программы, написанной авторами. Это позволило определить скорость изменения потенциала в момент начала освещения как производную соответствующей экспоненты.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При добавлении пиранина в раствор с одной стороны БЛМ наблюдалось изменение разности граничных потенциалов $\Delta\phi_b$, знак которой соответствовал адсорбции на мембране отрицательно заряженных молекул. Зависимость $\Delta\phi_b$ от концентрации пиранина в растворе изображена на рис. 1. Если предположить, что скачок потенциала удовлетворяет теории Гуи–Чепмена, то наклон этой зависимости от логарифма концентрации C адсорбирующихся ионов в растворе определяется количеством их заряженных групп z [23–25]. Величина предельного наклона при увеличении концентрации ионов определяется простой формулой

$$\phi = \frac{2}{2z+1} \frac{RT}{F} \ln(C) + \phi_0, \quad (1)$$

где R – газовая постоянная, T – абсолютная температура, F – число Фарадея, ϕ_0 – постоянная. Экспериментальная зависимость потенциала от логарифма концентрации хорошо аппроксимируется прямой, построенной при $z = 3$. Это свидетельствует об адсорбции на БЛМ молекул с тремя отрицательными зарядами, что согласуется со структурой пиранина, молекула которого имеет три отрицательно заряженные сульфогруппы.

Освещение БЛМ с адсорбированными на ней молекулами пиранина не приводило к изменению $\Delta\phi_b$. Это можно объяснить тем, что в возбужденное состояние переходит лишь небольшая часть молекул пиранина, и поэтому количество освободившихся из них протонов мало по сравнению с общим количеством анионов пиранина, адсорбированных на мембране, которые и создают скачок потенциала на ее границе. Если измеренное нами изменение потенциала при адсорбции пиранина составляло десятки милливольт, то его изменение при освещении должно быть на порядки меньше и составлять микровольты. Измеренное в работе [26] изменение потенциалов при возбуждении пиранина

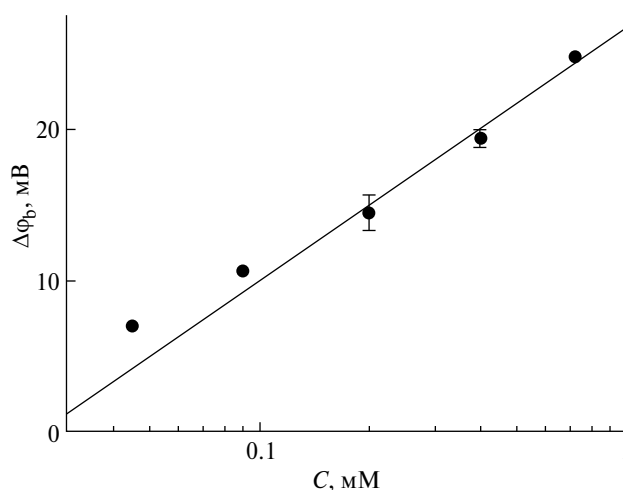


Рис. 1. Зависимость разности граничных потенциалов БЛМ $\Delta\phi_b$ от концентрации пиранина C в растворе с одной стороны от мембраны. БЛМ сформирована в растворе 20 мМ KCl, 2 мМ Tris, HEPES и цитрат, pH 6.0. Прямая проведена по уравнению (1) при $z = 3$.

мощной короткой вспышкой лазера было порядка 100 мкВ. В экспериментах с MNPS изменение потенциала было значительно больше из-за того, что при освещении происходило необратимое разрушение этих молекул на БЛМ [1, 2]. Поэтому продукты этой реакции накапливались, и количество выделившихся протонов было значительно больше.

Если в ячейку, помимо пиранина, добавляли di-4-ANEPPS, то освещение БЛМ приводило к изменению потенциала противоположного знака по отношению к потенциалу, вызванному адсорбцией di-4-ANEPPS (рис. 2). При прекращении освещения происходило восстановление потенциала. Если освещение происходило в течение короткого времени, менее 1 мин, восстановление было почти полным. При более длительном освещении восстановление потенциала было неполным.

Изменение потенциала при освещении происходило только тогда, когда и di-4-ANEPPS, и пиранин были добавлены в раствор с одной стороны БЛМ. В случае, когда эти соединения добавляли по разные стороны БЛМ, изменения потенциала при освещении не происходило. Аналогичная кинетика изменения потенциала при освещении с пиридином наблюдалась и с другим красителем – RH-421.

Для количественной оценки скорости реакции в работе [17] определяли наклон относительного изменения потенциала в момент начала освещения. Аналогичный параметр был использован и в

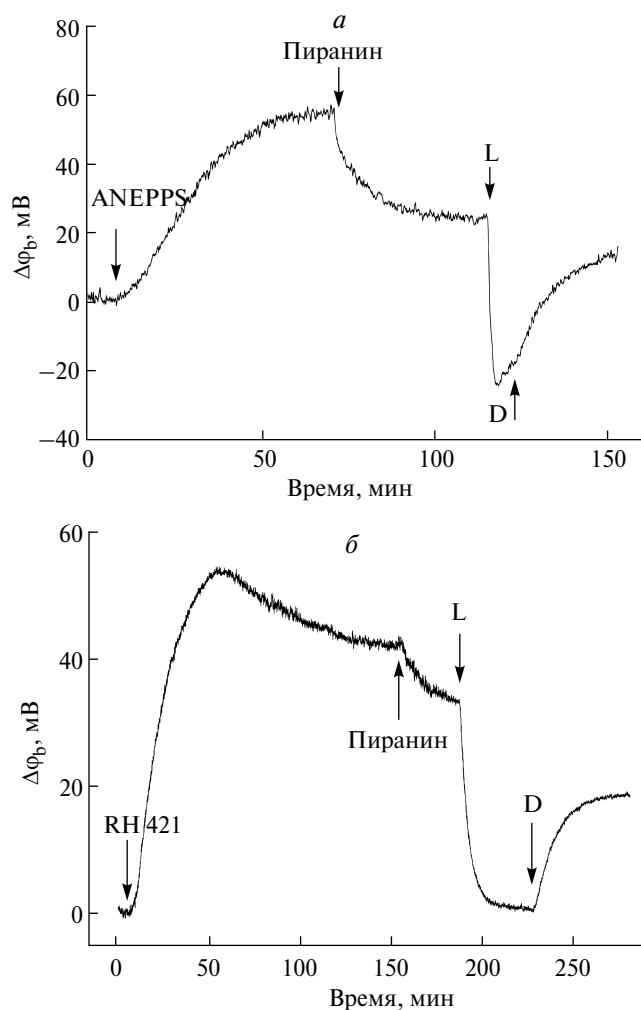


Рис. 2. Кинетика изменения разности граничных потенциалов БЛМ при добавлении в в раствор с одной стороны от мембраны di-4-ANEPPS в концентрации 6 мкМ (а) или RH-421 в концентрации 7.5 мкМ (б) и пиранина в концентрации 100 мкМ, а также при последующем включении (L) и выключении света (D). БЛМ сформирована в растворе 20 мМ KCl, 0.2 мМ Tris, HEPES и цитрат, pH 7. Моменты добавления di-4-ANEPPS, RH-421 и пиранина, а также включения и выключения света показаны стрелками.

настоящей работе. Он определялся как наклон зависимости от времени изменения потенциала в момент начала освещения, нормированный на величину потенциала, возникающего при адсорбции этих красителей. Этот параметр оказался пропорционален концентрации пиранина в растворе и интенсивности освещения (рис. 3).

Кинетика изменения потенциала при освещении напоминает наблюдавшуюся ранее при разрушении молекул di-4-ANEPPS синглетным кислородом, образующимся при освещении в присутствии фотосенсибилизаторов [16], а также

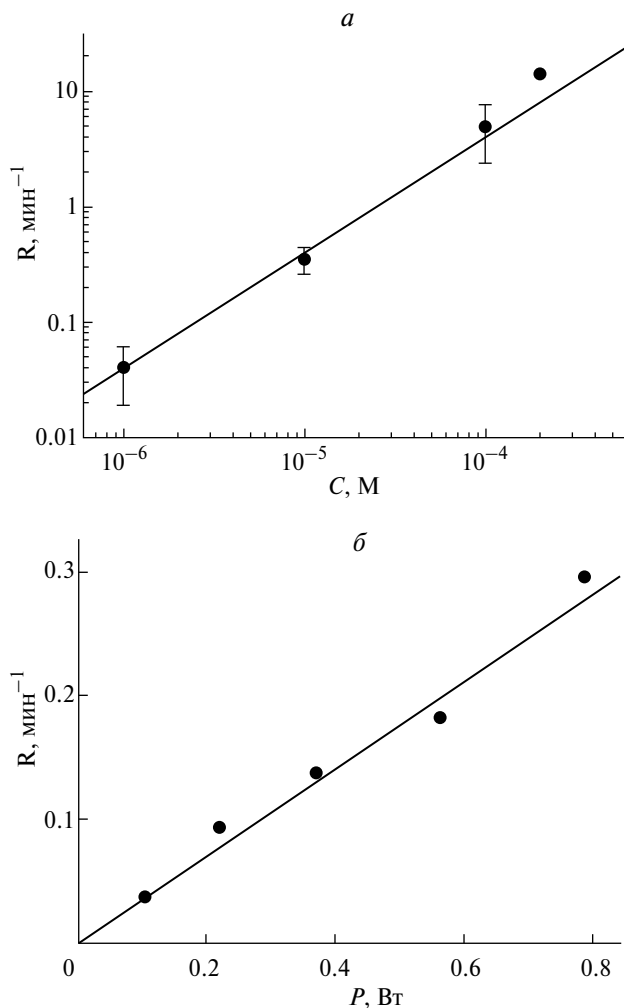


Рис. 3. Зависимость скорости уменьшения дипольного потенциала, вызванного адсорбцией di-4-ANEPPS, от концентрации пиранина C (а, мощность освещения 0.4 Вт), и от мощности освещения P (б, концентрация пиранина 10 мкМ). БЛМ сформирована в растворе 20 мМ KCl, 0.2 мМ Tris, HEPES и цитрат, pH 7.0.

с другим соединением, освобождающим протоны на поверхности мембраны, — MNPS [17].

Уменьшение потенциала при освещении объясняется десорбцией молекул ANEPPS с мембраны, что может быть вызвано их взаимодействием с возбужденными молекулами пиранина. Возможно, с этим связана необратимость фотоэффекта. Для того чтобы проверить, не происходит ли окисление молекул ANEPPS активными формами кислорода, были проведены эксперименты в атмосфере аргона. Они показали, что в отсутствие кислорода фотоэффект на БЛМ остается таким же, каким он был в атмосфере воздуха. Дополнительным свидетельством,

позволяющим исключить участие в реакции синглетного кислорода, служит отсутствие эффекта освещения, если пиранин и di-4-ANEPPS находились в растворах по разные стороны мембраны. В случае реакций с синглетным кислородом фотоэффект наблюдался, когда di-4-ANEPPS и фотосенсилизатор были с разных сторон мембраны, поскольку синглетный кислород, образующийся на противоположной стороне мембраны, способен проникать через нее [16]. Поэтому исчезновение молекул ANEPPS на поверхности мембраны не может быть связано с их окислением активными формами кислорода. Разрушение молекул ANEPPS, если и происходит, может быть вызвано прямым взаимодействием этих молекул с возбужденными молекулами пиранина.

О взаимодействии пиранина и стироловых красителей говорят эксперименты, в которых сравнивали изменения граничного потенциала БЛМ, вызванные адсорбцией этих соединений на мембране по отдельности, с изменениями потенциала, вызванными их адсорбцией вместе. После того, как в раствор с одной стороны мембраны добавляли di-4-ANEPPS и вызванное его адсорбцией изменение граничного потенциала достигало стационарной величины, в растворы с разных сторон БЛМ поочередно добавляли пиранин. В этом случае изменения потенциала, вызванные адсорбцией пиранина на разных сторонах мембраны, заметно различались. Зависимость изменения $\Delta\phi_b$ от суммарной концентрации пиранина, добавленного в раствор с двух сторон БЛМ, показана на рис. 4. Как можно видеть на рисунке, изменение потенциала, вызванного адсорбцией пиранина с той стороны БЛМ (цис), где находится di-4-ANEPPS, значительно выше, чем с противоположной стороны (транс), где его нет. Зависимость изменения потенциала от концентрации пиранина с транс-стороны близка к зависимости, полученной в эксперименте, где пиранин добавлялся в ячейку в отсутствие di-4-ANEPPS (рис. 1). Это означает, что адсорбция пиранина на БЛМ не зависит от того, присутствует ли di-4-ANEPPS в противоположном от мембраны растворе. Однако, если пиранин и di-4-ANEPPS находятся в растворе вместе, то изменение потенциала, вызванное увеличением концентрации пиранина в этом растворе, оказывается существенно больше изменения, вызванного адсорбцией пиранина в растворе с противоположной стороны, где нет di-4-ANEPPS. Иначе говоря, измерение потенциала при одновременной адсорбции di-4-ANEPPS и пиранина не равно сумме изменений потенциала при их адсорбции

по отдельности. Это можно объяснить либо тем, что пиранин подавляет адсорбцию di-4-ANEPPS, либо, наоборот, di-4-ANEPPS усиливает адсорбцию пиранина, либо на БЛМ адсорбируется комплекс di-4-ANEPPS с пиранином, вызывая изменение потенциала, отличное от суммарного изменения, вызванного этими соединениями по отдельности. Аналогичное влияние на изменение потенциала при адсорбции пиранина оказывал и другой стироловый краситель — RH-421.

Изменение потенциала при освещении БЛМ с адсорбированными на ней молекулами di-4-ANEPPS и пиранина по знаку соответствует уходу из мембраны молекул красителей. При этом максимальное по величине изменение потенциала при освещении совпадало с потенциалом, вызванным адсорбцией di-4-ANEPPS в отсутствие пиранина. Это свидетельствует в пользу того, что дипольный потенциал, создаваемый молекулами di-4-ANEPPS на мембране, не зависит от присутствия на ней пиранина. Тогда описанные выше эксперименты с совместной адсорбцией di-4-ANEPPS и пиранина (рис. 4), скорее всего, указывают на влияние первого соединения на адсорбцию второго, а не наоборот.

Другой механизм изменения потенциала при освещении БЛМ предполагает, что уход молекул красителя из мембраны вызван связыванием с молекулами красителя протонов, вызволившихся при возбуждении молекул пиранина. Аналогичный механизм предполагался ранее при

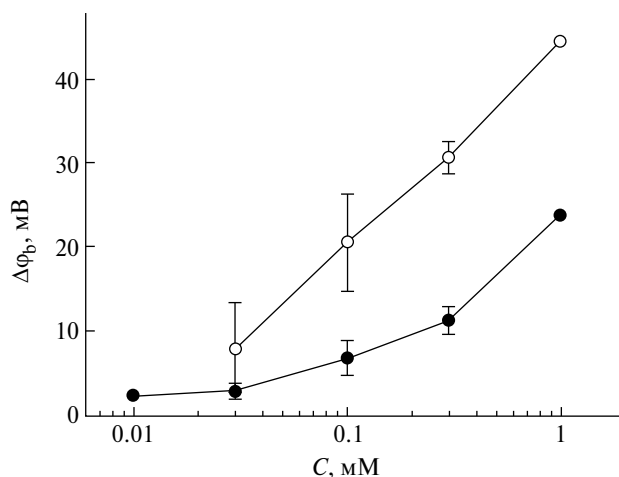


Рис. 4. Зависимость изменения граничного потенциала БЛМ, вызванного адсорбцией пиранина, от его концентрации в растворе, в котором также присутствует 5 мкМ di-4-ANEPPS (белые кружки), и в отсутствие di-4-ANEPPS (черные кружки). БЛМ сформирована в растворе 20 мМ KCl, 2 мМ Tris, HEPES и цитрат, pH 7.0.

изучении MNPS. Десорбция молекул красителя вызвана тем, что их протонирование приводит к образованию заряженной формы, которая обладает низким сродством к липидной мембране. Из-за образования заряженной формы красителя в растворе, потенциал, вызванный его адсорбцией на БЛМ, зависит от pH раствора [17]. Скорости процесса, определенные количественно как скорости относительного изменения потенциала в момент начала освещения, в случае с пиранином оказались значительно выше, чем с MNPS. Кроме того, в случае с MNPS освещение приводило к существенному изменению потенциала и в отсутствие красителей, поэтому кинетика изменения потенциала с красителями оказывалась многофазной [17]. В случае с пиранином освещение мембраны без красителей не приводило к заметному изменению потенциала. Поэтому кинетика изменения потенциала с красителями оказалась более простой (рис. 2).

Для того чтобы проверить возможность участия протонов в уходе молекул красителя из мембраны, были проведены эксперименты по влиянию концентрации буфера на этот процесс. Известно, что буфер подавляет реакцию выделения протонов из возбужденных молекул пиранина на поверхности мембраны. В экспериментах с прямым измерением переноса протонов на БЛМ при возбуждении пиранина лазерной вспышкой буфер подавлял амплитуду сигнала, но почти не влиял на кинетику восстановления его равновесия после вспышки [26]. Можно было ожидать, что при увеличении концентрации буфера уменьшится количество протонов, освобождаемых на поверхности мембраны, что приведет к уменьшению скорости ухода с нее молекул красителей. Однако эффект буфера оказался противоположным: скорость изменения потенциала при увеличении концентрации буфера в растворе незначительно возрастала (рис. 5). Это можно объяснить либо тем, что перенос протонов от молекулы пиранина к молекуле красителя происходит внутри комплекса этих молекул и поэтому от буфера не зависит, либо тем, что в данном случае самой медленной, лимитирующей процесс, является стадия диффузии протонов в перемешиваемом слое воды около мембраны. Похожий по знаку эффект буфера наблюдался нами и с другим фоточувствительным соединением — MNPS: при увеличении концентрации буфера происходило ускорение изменения поверхностного заряда мембраны при связывании на ней протонов, выделившихся при освещении. Это объяснялось влиянием буфера на диффузию в перемешиваемом слое [2].

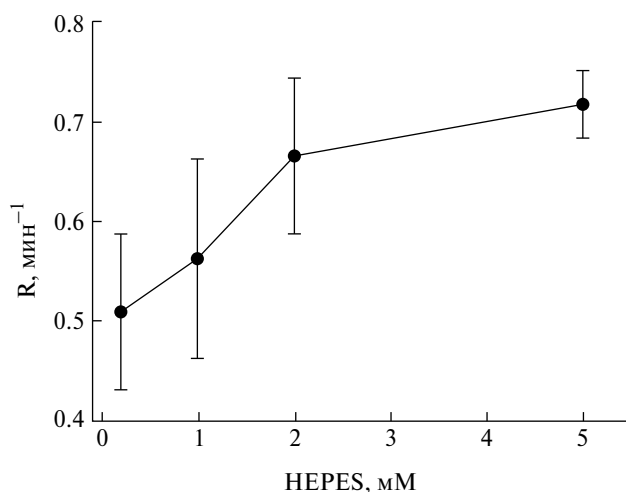


Рис. 5. Зависимость скорости исчезновения потенциала при освещении от концентрации HEPES в растворе. БЛМ сформирована в растворе 20 мМ KCl, 0.2 мМ Tris, HEPES и цитрат, pH 7.0. Концентрация пиранина 10 мкМ, мощность освещения 0.2 Вт.

Таким образом, исчезновение дипольного потенциала БЛМ со стирильными красителями наблюдалось при активации двух видов Caged-H⁺ с разным механизмом освобождения протонов: MNPS, у которого при возбуждении происходит необратимый отрыв сульфогруппы с одновременным освобождением протона, и пиранина, у которого протон обратимо освобождается из-за изменения рК при возбуждении молекулы. Это позволяет предположить, что вызванный освещением уход молекул красителя связан с переносом протонов в мембране от доноров — молекул Caged-H⁺ к акцепторам — молекулам красителей. Возможно, это происходит по поверхности мембраны. Свойства протонов на поверхности мембраны и возможность их переноса вдоль нее имеют важное значение в функционировании белков, участвующих в трансмембранном транспорте протонов [12, 27, 28]. Обнаруженный в работе перенос протонов в мембране от пиранина к стирильным красителям может быть использован для разработки новых подходов к изучению данного процесса с помощью электрических измерений.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 23-24-00571.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ташкин В.Ю., Вишнякова В.Е., Щербаков А.А., Финогонова О.А., Ермаков Ю.А., Соколов В.С. 2019. Изменение емкости и граничного потенциала бислойной липидной мембраны при быстром освобождении протонов на ее поверхности. *Биол. мембраны*. **36** (2), 101–108. doi 10.1134/S0233475519020075
2. Sokolov V.S., Tashkin V.Yu., Zykova D.F., Kharitonova Yu.V., Galimzyanov T.R., Batishchev O.V. 2023. Electrostatic Potentials Caused by the Release of Protons from Photoactivated Compound Sodium 2-Methoxy-5-nitrophenyl Sulfate at the Surface of Bilayer Lipid Membrane. *Membranes*. **13**, 722. doi 10.3390/membranes13080722
3. Geissler D., Antonenko Y.N., Schmidt R., Keller S., Krylova O.O., Wiesner B., Bendig J., Pohl P., Hagen V. 2005. (Coumarin-4-yl)methyl esters as highly efficient, ultrafast phototriggers for protons and their application to acidifying membrane surfaces. *Angew.Chem.Int.Ed Engl.* **44**(8), 1195–1198. doi 10.1002/anie.200461567
4. Abbruzzetti S., Sottini S., Viappiani C., Corrie J.E. 2006. Acid-induced unfolding of myoglobin triggered by a laser pH jump method. *Photochem.Photobiol.Sci.* **5**(6), 621–628. doi 10.1039/b516533d
5. Fibich A., Apell H.J. 2011. Kinetics of luminal proton binding to the SR Ca-ATPase. *Biophys.J.* **101**(8), 1896–1904. doi 10.1016/j.bpj.2011.09.014
6. Ташкин В.Ю., Щербаков А.А., Апелъ Х.-Ю., Соколов В.С. 2013. Конкурентный транспорт ионов натрия и протонов в цитоплазматическом канале Na^+ , K^+ -АТФ-азы. *Биол. мембраны*. **30** (2), 105–114.
7. Serowy S., Saparov S.M., Antonenko Y.N., Kozlovsky W., Hagen V., Pohl P. 2003. Structural proton diffusion along lipid bilayers. *Biophys.J.* **84** (2 Pt 1), 1031–1037. doi 10.1016/S0006-3495(03)74919-4
8. Springer A., Hagen V., Cherepanov D.A., Antonenko Y.N., Pohl P. 2011. Protons migrate along interfacial water without significant contributions from jumps between ionizable groups on the membrane surface. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **108** (35), 14461–14466. doi 10.1073/pnas.1107476108
9. Weichselbaum E., Osterbauer M., Knyazev D.G., Batishchev O.V., Akimov S.A., Hai N.T., Zhang C., Knor G., Agmon N., Carloni P., Pohl P. 2017. Origin of proton affinity to membrane/water interfaces. *Sci.Rep.* **7**, 4553. doi 10.1038/s41598-017-04675-9
10. Weichselbaum E., Galimzyanov T., Batishchev O.V., Akimov S.A., Pohl P. 2023. Proton Migration on Top of Charged Membranes. *Biomolecules*. **13** (2), 352. doi 10.3390/biom13020352
11. Zhang C., Knyazev D.G., Vereshaga Y.A., Ippoliti E., Nguyen T.H., Carloni P., Pohl P. 2012. Water at hydrophobic interfaces delays proton surface-to-bulk transfer and provides a pathway for lateral proton diffusion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **109**(25), 9744–9749. doi 10.1073/pnas.112127109
12. Heberle J., Riesle J., Thiedemann G., Oesterheld D., Dencher N.A. 1994. Proton migration along the membrane surface and retarded surface to bulk transfer. *Nature*. **370** (6488), 379–382. doi 10.1038/370379a0
13. Malkov D.Y., Sokolov V.S. 1996. Fluorescent styryl dyes of the RH series affect a potential drop on the membrane/solution boundary. *Biochem.Biophys.Acta*. **1278**, 197–204. doi 10.1016/0005-2736(95)00197-2
14. Gross D., Loew L.M. 1989. Fluorescent indicators of membrane potential: microspectrofluorometry and imaging. *Methods Cell Biol.* **30**, 193–218. doi 10.1016/S0091-679X(08)60980-2
15. Clarke R.J., Kane D.J. 1997. Optical detection of membrane dipole potential: avoidance of fluidity and dye-induced effects. *Biochim.Biophys.Acta*. **1323** (2), 223–239. doi 10.1016/s0005-2736(96)00188-5
16. Sokolov V.S., Gavrilchik A.N., Kulagina A.O., Meshkov I.N., Pohl P., Gorbunova Y.G. 2016. Voltage-sensitive styryl dyes as singlet oxygen targets on the surface of bilayer lipid membrane. *J. Photochem. Photobiol.B.* **161**, 162–169. doi 10.1016/j.jphotobiol.2016.05.016
17. Константинова А.Н., Харитонова Ю.В., Ташкин В.Ю., Соколов В.С. 2021. Стириловые красители di-4-ANEPPS и RH-421 как датчики протонов на поверхности липидных мембран. *Биол. мембраны*. **38** (2), 123–128. doi 10.31857/S0233475521020079
18. Gutman M. 1986. Application of the laser-induced proton pulse for measuring the protonation rate constants of specific sites on proteins and membranes. *Methods Enzymol.* **127**, 522–538. doi 10.1016/0076-6879(86)27042-1
19. Gutman M. 1984. The pH jump: probing of macromolecules and solutions by a laser-induced, ultrashort proton pulse--theory and applications in biochemistry. *Methods Biochem.Anal.* **30**, 1–103. doi 10.1002/9780470110515.ch1
20. Nandi R., Amdursky N.A. 2022. The dual use of the pyranine (HPTS) fluorescent probe: A ground-state pH indicator and an excited-state proton transfer probe. *Acc.Chem.Res.* **55**, 2728–2739. doi 10.1021/acs.accounts.2c00458
21. Gutman M., Nachliel E., Gershon E., Giniger R. 1983. Kinetic analysis of the protonation of a surface group of a macromolecule. *Eur.J.Biochem.* **134** (1), 63–69. doi 10.1111/j.1432-1033.1983.tb07531.x
22. Mueller P., Rudin D.O., Tien H.T., Wescott W.C. 1963. Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution. *J.Phys.Chem.* **67**, 534–535.
23. Ermakov Yu.A., Sokolov V.S. 2003. *Planar Lipid Bilayers (BLMs) and their applications*. Ed. Tien H.T., Ottova-Leitmannova A. Amsterdam etc: Elsevier, p. 109–141.
24. Sokolov V.S., Mirsky V.M. 2004. *Ultrathin electrochemical chemo- and biosensors: Technology and*

- performance*. Ed. Mirsky V.M. Heidelberg: Springer-Verlag, P. 255–291.
25. McLaughlin, S. 1977. Electrostatic potentials at membrane-solution interfaces. In: *Current topics in membranes and transport*. Eds. Bronner F., Kleinzeller A. New York, San Francisco, London: Acad. Press. V. 9, p. 71–144. [https://doi.org/10.1016/S0070-2161\(08\)60677-2](https://doi.org/10.1016/S0070-2161(08)60677-2).
 26. Gutman M., Nachliel E., Bamberg E., Christensen B. 1987. Time-resolved protonation dynamics of a black lipid membrane monitored by capacitive currents. *Biochim. Biophys. Acta*. **905** (2), 390–398.
 27. Agmon N., Bakker H.J., Campen R.K., Henchman R.H., Pohl P., Roke S., Thamer M., Hassanaali A. 2016. Protons and hydroxide ions in aqueous systems. *Chem. Rev.* **116** (13), 7642–7672. doi 10.1021/acs.chemrev.5b00736
 28. Knyazev D.G., Silverstein T.P., Brescia S., Maznichenko A., Pohl P. 2023. A new theory about interfacial proton diffusion revisited: the commonly accepted laws of electrostatics and diffusion prevail. *Biomolecules*. **13** (11), 1641. doi 10.3390/biom13111641

Electrostatic Potentials During Adsorption and Photochemical Reactions of Pyranine on Bilayer Lipid Membranes

V. S. Sokolov^{1,*}, V. Yu. Tashkin¹, D. D. Zykova^{1,2}, L. E. Pozdeeva³

¹*Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

²*Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Moscow oblast, 141700 Russia*

³*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

*e-mail: sokolov.valerij@gmail.com

Adsorption and photochemical reactions of pyranine on a bilayer lipid membrane (BLM) have been studied by measuring electrostatic potentials at the membrane–water interface. The dependence of the electrostatic potentials due to the adsorption of pyranine on its concentration in solution is described by the Gouy–Chapman theory assuming that anions with three charged groups are adsorbed on the membrane. No significant changes in the boundary potential were found when BLM with pyranine adsorbed on it was illuminated. Significant changes in the potential were observed if molecules of styryl dyes di-4-ANEPPS or RH-421 were adsorbed on BLM in addition to pyranine. The sign and magnitude of these changes correspond to the disappearance of the dipole potential created by styryl dye molecules on the BLM. The rate of potential disappearance was proportional to pyranine concentration and illumination intensity. The disappearance of the potential can be caused either by the binding of protons released from the pyranine molecule to the dye molecules with their subsequent desorption from the BLM or by their destruction. Pyranine and styryl dye molecules can form complexes at the BLM boundary. This is evidenced by experiments in which the sum of the potential changes caused by their adsorption separately differed significantly from the change in the boundary potential during their simultaneous adsorption. The kinetics of the disappearance of the dipole potential of BLM with styryl dyes upon excitation of pyranine turned out to be similar to that observed earlier with another compound, 2-methoxy-5-nitrophenyl sodium sulfate, which releases protons at the membrane boundary upon illumination (Konstantinova et al., 2021. *Biochem. (Mosc.), Suppl. Series A: Membr. Cell Biol.* **15** (2), 142–146). This suggests that it is associated with the desorption of dye molecules from the membrane, due to the binding of protons released from excited pyranin molecules to them.

Keywords: pyranin, styryl dyes, surface proton, adsorption, surface potential, lipid membrane