

**МЕЗО-ЗАМЕЩЕННЫЕ КАРБОЦИАНИНЫ – ЭФФЕКТИВНЫЕ
СПЕКТРАЛЬНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ И ФОТОХИМИЧЕСКИЕ
ЗОНДЫ ДЛЯ СТРУКТУРНО-ОРГАНИЗОВАННЫХ СИСТЕМ
НА ОСНОВЕ БИОМОЛЕКУЛ**© 2019 г. А. С. Татиколов^{1*}, П. Г. Пронкин¹, Л. А. Шведова¹, И. Г. Панова²¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия²Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: tatikolov@mail.ru

Поступила в редакцию 03.06.2019;

после доработки 03.06.2019;

принята в печать 20.06.2019

Исследования фотоники красителей в структурно-организованных системах имеют большое фундаментальное и прикладное значение. В связи с этим, поиск простых и удобных методов анализа состава и изучения структурно-организованных систем на основе биомолекул (белков, нуклеиновых кислот и др.) с использованием красителей-зондов, весьма актуален. Такими зондами могут быть мезо-замещенные полиметиновые (карбоцианиновые) красители. Мезо-замещенные красители обладают уникальным набором спектрально-флуоресцентных и фотохимических свойств, чувствительных к молекулярному окружению. В структурно-организованных системах фотоника этих красителей резко изменяется, что позволяет их использовать для изучения таких систем. Одной из особенностей этих красителей является подвижное равновесие между *транс*- и *цис*-изомерами, по-разному взаимодействующими с биомолекулами. Взаимодействие красителей с компонентами структурно-организованных систем приводит к росту флуоресценции и интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние. Нами разработаны и применены на практике спектрально-флуоресцентные и фотохимические зонды на основе мезо-замещенных карбоцианинов. В частности, один из анионных карбоцианинов широко использовался нами как зонд в биологических системах, содержащих сывороточный альбумин и коллагены. Настоящий обзор посвящен работам авторов по исследованию взаимодействия мезо-замещенных карбоцианиновых красителей с биомолекулами и фотонике мезо-замещенных карбоцианинов в комплексах с биомолекулами. Рассмотрены также работы по применению этих красителей в качестве зондов в биологических системах.

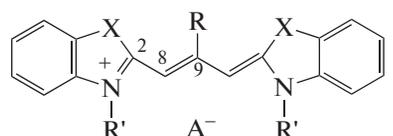
Ключевые слова: карбоцианиновые красители, биомолекулы, фотоника, спектрально-флуоресцентные свойства, *транс-цис*-изомеризация.

DOI: 10.1134/S0207401X19120185

ВВЕДЕНИЕ

Изучение фотоники красителей в структурно-организованных молекулярных и супрамолекулярных биосистемах имеет фундаментальное и прикладное значение. Эти исследования способны внести вклад в фотофизику и фотохимию красителей, а также могут иметь практическое значение при разработке и совершенствовании методов анализа и исследования структурно-организованных систем. Методы анализа систем на основе биомолекул с использованием красителей-зондов являются сравнительно простыми и удобными, поэтому их разработка весьма актуальна. Полиметиновые (цианиновые) красители могут служить такими красителями-зондами, поскольку они обладают высокими коэффициентами экстинкции и их свойства зависят от молекулярного окружения

[1]. Известно также, что ряд этих красителей образуют нековалентные комплексы с биомолекулами, что также создает предпосылки для их использования в качестве зондов в системах, содержащих биомолекулы [2]. Среди этих красителей особенно выделяются мезо-замещенные карбоцианины, которые обладают уникальным набором спектрально-флуоресцентных и фотохимических свойств, чувствительных к молекулярному окружению. Ниже приведена общая структура молекулы мезо-замещенных карбоцианиновых красителей:



где R – мезо- (или 9-) заместитель в полиметиновой цепи, X – гетероатом (обычно S или O), A⁻ – противоион. Заместители могут находиться также в концевых гетероциклах молекулы. Красители, изображенные выше, являются катионными; если оба заместителя R' содержат анионные группы (обычно сульфогруппы), то красители становятся анионными.

Одной из важных особенностей таких красителей является подвижное равновесие между *транс*- и *цис*-изомерами, по-разному взаимодействующими с биомолекулами, которое зависит от среды [2, 3]. Для разработки новых зондов на биомолекулы нами проводилось изучение взаимодействия мезо-замещенных карбоцианинов с биомолекулами и исследование их фотофизических и фотохимических свойств в биомолекулярных средах. Настоящий обзор посвящен рассмотрению таких работ.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КАТИОННЫХ МЕЗО-ЗАМЕЩЕННЫХ КАРБОЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ С ДНК И ДРУГИМИ БИОМОЛЕКУЛАМИ

Хотя в мировой литературе первые работы по исследованию взаимодействия мезо-замещенных карбоцианиновых красителей с ДНК и другими биомолекулами опубликованы еще в 1964 г. (изучался катионный краситель 3,3'-диэтил-4,5,4',5'-добензо-9-метилтиакарбоцианин-бромид (Stains-all) [4–6], такие работы все же довольно редки по сравнению с исследованиями других красителей [2]. Можно упомянуть, в частности, работу, в которой был синтезирован большой ряд катионных карбоцианинов (среди них семь мезо-замещенных) с целью использования для детектирования биомолекул и кратко изучено их взаимодействие с ДНК, РНК и бычьим сывороточным альбумином [7]. Однако исследование, проведенное в ней, было весьма поверхностным. Кроме того, в этой и в других подобных работах не проводилось изучения элементарных фотохимических процессов (*транс*-*цис*-фотоизомеризации и гибели образующегося фотоизомера, образования и тушения триплетного состояния) с участием полиметиновых красителей в биомолекулярных средах. Такое изучение, дающее ценную информацию о молекулярном окружении красителя-зонда, было сделано в ряде наших работ.

Первая наша публикация по исследованию мезо-замещенных карбоцианинов и их комплексов с биомолекулами вышла в 2002 г. [8]. В ней описано исследование нековалентного взаимодействия двух мезо-замещенных карбоцианиновых красителей – 3,3'-диэтил-9-метилтиакарбоцианин-иодида (ДЭМТКЦ) и 3,3'-диэтил-9-метилоксакарбоцианин-иодида (ДЭМОКЦ) – с ДНК. Для сравнения изучалось также взаимодействие с ДНК двух

мезо-незамещенных аналогов – 3,3'-диэтилтиакарбоцианин-иодида (ДТКЦ) и 3,3'-диэтилоксакарбоцианин-иодида (ДОКЦ). Было показано, что красители образуют с ДНК комплексы, что сопровождается резким ростом флуоресценции, которая для мезо-замещенных красителей выше, чем для незамещенных.

Исследовалось также влияние ДНК на *цис*-*транс*-равновесие и флуоресцентные свойства 3,3'-диэтил-9-тиометилтиакарбоцианин-иодида (ДЭТТКЦ) [9]. Было показано, что в водном растворе ДЭТТКЦ находится в *цис*-форме, в то время как в изопропанолу имеется равновесие между *цис*- и *транс*-изомером. Обнаружено, что краситель образует с ДНК нековалентные комплексы преимущественно в форме *цис*-изомера. Комплексообразование с ДНК приводит к существенному росту квантового выхода триплетного состояния ДЭТТКЦ, константа скорости тушения которого кислородом $k_q(\text{O}_2) \sim 9 \cdot 10^7 \text{ л моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ оказалась существенно ниже диффузионного предела (за счет экранирования молекул красителя связанного с биополимером).

В дальнейшем наша работа в этом направлении интенсивно развивалась. В частности, изучалось влияние ДНК на *цис*-*транс*-равновесие и спектрально-флуоресцентные свойства ряда мезо-замещенных карбоцианинов: 3,3'-диэтил-9-метокситиакарбоцианин-иодида (ДМТКЦ), 3,3',9-триэтилтиакарбоцианин-иодида (ТЭТКЦ), 3,3'-диметил-9-этилоксакарбоцианин-иодида (ДМЭОКЦ), 3,3',9-триэтил-6,6'-диметоксидоксакарбоцианин-иодида (ТЭООКЦ), 3,3',9-триэтил-5,5'-диметиллоксакарбоцианин-иодида (ТЭМОКЦ) [10]. Для тиакарбоцианинов в ряде органических растворителей обнаружено равновесие между *цис*- и *транс*-изомерами, причем рост полярности растворителя сдвигает равновесие в сторону *цис*-изомера. Показано, что образование стабильных нековалентных комплексов тиакарбоцианиновых красителей с ДНК приводит к сдвигу изомерного равновесия и протекает преимущественно через *цис*-форму.

В работе [11] было показано, что взаимодействие с ДНК мезо-замещенного карбоцианинового красителя 3,3'-диэтил-9-хлортиакарбоцианин-перхлората (ДХТКЦ) протекает в *цис*-форме. Первоначально ДХТКЦ связывается с ДНК в комплекс в форме длинноволнового *транс*-изомера ($\lambda_{max}^{abs} = 556 \text{ нм}$), который затем (в течение десятков минут) переходит в более устойчивый комплекс *цис*-изомера ДХТКЦ с ДНК ($\lambda_{max}^{abs} = 520 \text{ нм}$). Обнаружено существенное влияние концентраций реагентов и ионной силы раствора на кинетику *транс*-*цис*-перехода комплекса ДХТКЦ с ДНК.

Методом импульсного фотолиза исследовались фотохимические процессы в молекулах мезо-за-

шенных тиакарбоцианинов ДМТКЦ, ТЭТКЦ, ДХТКЦ, ДЭМТКЦ [12]. При импульсном фотовозбуждении растворов ДМТКЦ наблюдались процессы *транс-цис*- и *цис-транс*-фотоизомеризации, получены данные о структуре полос поглощения изомеров. Комплексообразование с ДНК приводит к росту квантового выхода триплетного состояния красителей, что объясняется увеличением жесткости связанных молекул. В присутствии ДНК дезактивация триплетного состояния протекает по двухэкспоненциальному закону (отметим, что аналогичные результаты были также получены для ДЭТТКЦ [8]). Были изучены процессы тушения триплетного состояния красителей кислородом в растворах и в комплексах с ДНК. Константы скорости тушения триплетного состояния красителей в комплексах с ДНК кислородом оказались существенно ниже ожидаемых величин для диффузионно-контролируемых реакций (с учетом спин-статистического фактора ($k_q(\text{O}_2) < 1/9 k_{diff}$), что объясняется стерическим фактором комплексообразования. Комплексообразование определяет стерические препятствия при тушении триплетных состояний лигандов и обуславливает большую разницу в константах скоростей процессов тушения. Подробно изучено также тушение триплетного состояния ДМТКЦ, ДЭМТКЦ, ТЭТКЦ, ДЭТТКЦ нитроксильными радикалами, иодид-ионом и кислородом в растворах и в комплексах с ДНК [13]; определены соответствующие константы скорости. Полученные в [9, 12, 13] результаты свидетельствуют об образовании комплексов краситель-ДНК двух различных типов.

Был осуществлен перенос энергии электронного возбуждения (ПЭЭВ) между молекулами карбоцианиновых красителей в комплексе с ДНК [14]. В качестве донора энергии использовался мезо-замещенный оксакарбоцианин ТЭМОКЦ, в качестве акцептора — ДТКЦ. Переносу энергии при этом способствует сближение молекул донора и акцептора при связывании с биомолекулой. При этом в спектре возбуждения флуоресценции акцептора наблюдалась полоса, принадлежащая донору. Изучено тушение флуоресценции донора акцептором в присутствии ДНК. Результаты экспериментов обсуждаются с позиции образования стехиометрического комплекса краситель-ДНК и с точки зрения концентрирования красителей в микрофазе (псевдофазе) биополимера. Показано, что экспериментальные результаты не описываются моделью стехиометрического комплекса. В дальнейшем обнаруженный ПЭЭВ был изучен более подробно [15, 16], при этом в качестве доноров энергии, помимо ТЭМОКЦ, использовался ДМЭОКЦ, в качестве акцептора — ДТКЦ. Методом пикосекундной спектроскопии была измерена кинетика затухания флуоресценции доноров и ее тушение акцептором в присутствии ДНК. При

интерпретации экспериментальных данных использовалась микрофазная модель, при этом учитывалось концентрирование молекул красителей вблизи молекул ДНК. Анализ кинетических зависимостей позволил получить данные о распределении расстояний в донорно-акцепторных парах при ПЭЭВ. Обнаружено влияние концентрации акцептора на параметры распределения его молекул в микрофазе тушения [16].

Проводилось также спектрально-флуоресцентное изучение взаимодействия с ДНК двух катионных карбоцианинов — мезо-замещенного красителя 3,3',9-триметилтиакарбоцианин-йодида (ТМКЦ) и, для сравнения, его незамещенного аналога 3,3'-диметилтиакарбоцианин-йодида (ДМКЦ) [17]. При титровании растворов красителей ДНК происходит падение интенсивности полосы поглощения исходного красителя, длинноволновый сдвиг и рост интенсивности полосы поглощения и интенсивности флуоресценции красителя, связанного с ДНК. Проведено математическое моделирование роста интенсивности флуоресценции, исходя из образования одного или двух типов комплексов красителя с ДНК. Экспериментальные результаты удовлетворительно описываются моделью, включающей один тип комплекса краситель-ДНК. Показано, что ТМКЦ связывается с ДНК в виде *цис*-изомера, в то время как ДМКЦ — в виде *транс*-изомера.

Спектрально-флуоресцентными методами подробно исследовалось *цис-транс*-равновесие ряда мезо-замещенных оксакарбоцианиновых красителей: ДЭМОКЦ, ДМЭОКЦ, ТЭОКЦ, ТЭМОКЦ, а также для сравнения — незамещенного красителя ДОКЦ в растворах и в комплексе с ДНК [18]. В присутствии ДНК наблюдается сдвиг изомерного *цис-транс*-равновесия в сторону образования *транс*-изомера, что во многом определяет спектральные эффекты, наблюдаемые при комплексообразовании оксакарбоцианиновых красителей. Резкий рост флуоресценции (благодаря связыванию *транс*-изомера) в комплексе с ДНК является благоприятным фактором для использования оксакарбоцианиновых красителей в качестве зондов для определения ДНК.

Методом импульсного фотолиза изучались: фотоизомеризация, обратная термическая изомеризация, а также спектрально-кинетические свойства триплетного состояния мезо-замещенных оксакарбоцианиновых красителей ДМЭОКЦ, ТЭМОКЦ и незамещенного красителя ДОКЦ в растворах и в комплексах с ДНК [19]. В растворах при импульсном фотовозбуждении красителей наблюдались процессы фотоизомеризации, получены дифференциальные спектры поглощения фотоизомеров. Образование комплексов красителей с ДНК затрудняет фотоизомеризацию и приводит к росту квантового выхода триплетного состояния.

Деактивация триплетного состояния протекает по двухэкспоненциальному закону, что указывает на возможность образования комплексов двух различных типов. Изучены процессы тушения триплетного состояния ТЭМОКЦ кислородом в растворах и в комплексах с ДНК. В присутствии ДНК константы скорости тушения оказались существенно ниже величин, характерных для диффузионно-контролируемых реакций с учетом спин-статистического фактора.

Изучены спектрально-флуоресцентные и фотохимические свойства двух *мезо*-замещенных тиокарбоцианинов: 3,3'-диэтил-9-фенилтиокарбоцианин-иодида и 3,3'-диэтил-9-(*о*-гидрокси-*п*-метоксифенил)тиокарбоцианин-иодида в растворах и их взаимодействие с ДНК [20]. Красители образуют нековалентные комплексы с ДНК, что сопровождается изменениями спектров поглощения и ростом флуоресценции. Полученные данные указывают, что красители находятся в форме *транс*-изомеров как в растворителях различной полярности, так и в комплексах с ДНК. Это обусловлено поворотом и выходом *мезо*-фенильных колец из плоскости хромофора, что уменьшает их стерическое влияние на геометрию молекулы красителя. Показано, что взаимодействие красителей с ДНК – сложный процесс, включающий мономерные молекулы и агрегаты красителей. При импульсном фотовозбуждении в растворах наблюдаются образование и последующая гибель фотоизомеров красителей; триплетное состояние не образуется. В комплексе с ДНК не наблюдается сигналов фотоизомеров; в отсутствие кислорода наблюдается образование триплетного состояния. Кинетика гибели триплетного состояния двухэкспоненциальна; константы скорости тушения триплетных состояний кислородом ниже диффузионно-контролируемого предела.

Изучалось также взаимодействие катионных тиокарбоцианинов с другими биомолекулами. В частности, было изучено их нековалентное взаимодействие с гиалуроновой кислотой (ГК) – линейным полисахаридом, встречающимся в различных биосистемах [21]. Были взяты *мезо*-замещенные красители ТМКЦ и ДЭМТКЦ и для сравнения – незамещенные красители ДМКЦ и ДТКЦ. В присутствии ГК красители ТМКЦ, ДМКЦ и ДЭМТКЦ образуют Н-агрегаты, что отражается в появлении коротковолновой полосы поглощения с максимумом при 440–450 нм. По склонности к Н-агрегации в присутствии ГК красители можно расположить в ряд ТМКЦ > ДМКЦ > ДЭМТКЦ > ДТКЦ. Определено число агрегации ТМКЦ $n = 3$. В буферных растворах с рН 4.5, 7.0 и 9.1 полосы поглощения Н-агрегатов ТМКЦ более длинноволновые (с максимумами 460–470 нм), чем в отсутствие буферов. ТМКЦ предложен в качестве спектрального зонда для обнаружения ГК в биологических системах.

Изучалось также взаимодействие ТМКЦ с другим биологически важным соединением – гликозаминогликаном хондроитин-4-сульфатом (ХС) в буферных растворах с различным рН и в отсутствие буферов [22]. Показано, что во всех изученных средах при сравнительно больших концентрациях краситель связывается с ХС главным образом в виде мономера, что сопровождается резким ростом интенсивности флуоресценции (наблюдается также промежуточное образование агрегатов на ХС). Определены: константа связывания, число мономерных звеньев ХС на одну молекулу красителя и квантовый выход флуоресценции Φ_f связанного красителя. Зависимость Φ_f от рН немонотонна: она имеет минимум в области нейтральных рН, что объясняется изменением заряда макромолекулы ХС при изменении рН и конформационными изменениями в биополимере.

Методом импульсного фотолиза изучались первичные фотохимические процессы в молекулах ТМКЦ, ДЭМТКЦ и ТЭТКЦ в комплексах с ДНК и ХС [23]. Обнаружено, что, наряду с генерацией триплетного состояния красителей, наблюдается образование *транс*-фотоизомеров ТМКЦ и ДЭМТКЦ, связанных с биомолекулами (для свободных красителей фотоизомеризация не наблюдается). Эффект объясняется влиянием матрицы биополимера на поверхности потенциальной энергии процесса фотоизомеризации.

Проводилось спектрально-флуоресцентное изучение взаимодействия ТМКЦ с биологическими мицеллярными системами – солями желчных кислот (холатами): дезоксихолатом натрия, холатом натрия и таурохолатом натрия. При введении в водный раствор ТМКЦ малых концентраций холатов наблюдалась агрегация красителя на холатах. С ростом концентрации холатов выше второй критической концентрации мицеллообразования (ККМ2) наблюдался постепенный распад агрегатов на мономеры с ростом интенсивности флуоресценции красителя [24]. Методом импульсного фотолиза изучалась фотохимия ТМКЦ в мицеллах холатов. Наблюдалась фотоизомеризация и образование триплетного состояния красителя [25].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНИОННЫХ МЕЗО-ЗАМЕЩЕННЫХ КАРБОЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ С БЕЛКАМИ И ДРУГИМИ БИОЛОГИЧЕСКИ ВАЖНЫМИ МОЛЕКУЛАМИ

В 2004 г. была опубликована наша первая работа по исследованию взаимодействия полиметиновых красителей с сывороточным альбумином [26], в которой изучалось нековалентное взаимодействие различных классов полиметиновых красителей с сывороточным альбумином человека (САЧ). Было установлено, что в то время как катионные полиметиновые красители сравни-

тельно слабо взаимодействуют с САЧ (константа связывания K_b порядка 10^4 л/моль), ряд анионных красителей взаимодействуют с САЧ гораздо эффективнее (K_b порядка 10^7 л/моль). В частности, мезо-замещенный анионный карбоцианин пиридиниевая соль 3,3'-ди-(γ -сульфопропил)-4,5,4',5'-добензо-9-этилтиакарбоцианин-бетаина (ДЭЦ) взаимодействует с САЧ с $K_b > 10^6$ л/моль и резким ростом интенсивности флуоресценции (при этом димеры красителя, в виде которых он в основном находится в водном растворе, распадаются, образуя *транс*-мономеры), что было в дальнейшем использовано нами при применении ДЭЦ в качестве зонда на САЧ в биологических системах. Резкий рост интенсивности флуоресценции обусловлен тем, что исходно ни димеры красителя, ни *цис*-мономеры практически не флуоресцируют. К тому же, при взаимодействии с САЧ резко изменяется и спектр поглощения красителя: по лоса с максимумом $\lambda_{max}^{abs} \sim 535$ нм (димеры) заменяется на полосу с $\lambda_{max}^{abs} = 612$ нм (*транс*-мономеры). Было также обнаружено, что ДЭЦ, наряду с альбумином, эффективно взаимодействует с коллагенами с образованием J-агрегатов на молекулах коллагенов (с $\lambda_{max}^{abs} = 642\text{--}648$ нм), причем по спектральным свойствам и поведению J-агрегатов удалось даже различить коллагены типа I и III. Обнаружено также, что другой анионный мезо-замещенный краситель – пиридиниевая соль 3,3'-ди-(γ -сульфопропил)-5,5'-дифенил-9-этилоксакарбоцианин-бетаина (ДОЦ) также образует агрегаты на коллагенах [27].

Вышеприведенные работы послужили предпосылками для использования ДЭЦ в качестве спектрально-флуоресцентного зонда на САЧ и коллагены. С помощью ДЭЦ был, в частности, наряду с коллагеном, обнаружен альбумин в стекловидном теле глаза плодов человека [28]. ДЭЦ был предложен в качестве зонда для количественного определения САЧ и коллагена в межклеточных средах, при этом гиалуроновая кислота не мешает их определению. Чувствительность метода по САЧ составляет около 10^{-7} моль/л по спектрам поглощения и 10^{-9} моль/л по спектрам флуоресценции, поскольку образующийся при связывании с САЧ *транс*-мономер ДЭЦ обладает интенсивной флуоресценцией [29]. ДЭЦ широко использовался нами в качестве зонда для измерения концентрации САЧ в тканях глаза человека [30–32], а также для определения коллагена в тканях глаза лягушки (было установлено присутствие коллагена, близкого к типу I) [33]. Зонд ДЭЦ применялся также для определения содержания альбумина и коллагена в стекловидном теле глаза человека после ферментативной обработки протеиназой К, трипсином, коллагеназой и гиалуронидазой [34]. Этот же краситель использовался в качестве зонда для

изучения состояния САЧ, образующего белковые покрытия на магнитных наночастицах [35, 36].

При анализе тканей глаза было показано, что ДЭЦ взаимодействует только с САЧ и коллагенами и не взаимодействует с другими компонентами ткани (альфа-фетопротеином, ГК, мочевиной, мочевой кислотой и др.). Было установлено к тому же, что ДЭЦ обладает высокой селективностью по отношению к различным видам сывороточных альбуминов: эффективно взаимодействует с САЧ и очень слабо взаимодействует с сывороточными альбуминами других животных [37]. Для изучения этого свойства ДЭЦ спектрально-флуоресцентными методами проведено сравнительное исследование нековалентного взаимодействия ДЭЦ с сывороточными альбуминами различных позвоночных: крысы, кролика, быка и человека [38]. Показано, что при взаимодействии с САЧ краситель образует лишь один продукт – *транс*-мономер, связанный с САЧ, в то время как с другими альбуминами образуются также другие продукты связывания (прежде всего, агрегаты красителя). Это является следствием более высокой энергии взаимодействия красителя с САЧ, чем с другими сывороточными альбуминами, что объясняет высокую селективность ДЭЦ по отношению к САЧ.

Были подробно изучены спектрально-флуоресцентные свойства ДОЦ в растворах и в комплексах с САЧ [39]. Взаимодействие с САЧ приводит к значительному росту флуоресценции красителя. Изучено тушение флуоресценции ДОЦ в комплексе с САЧ ибупрофеном и варфарином. Данные по тушению флуоресценции ибупрофеном указывают на связывание красителя в субдомене IIIA центра связывания II молекулы САЧ. Синхронные спектры флуоресценции САЧ в присутствии ДОЦ показали, что комплексообразование с ДОЦ не приводит к заметной перестройке молекулы белка в центре связывания.

Изучено также влияние образования комплексов ДОЦ с бычьим сывороточным альбумином (БСА) на его спектрально-флуоресцентные свойства [40]. Связывание ДОЦ с БСА приводит к значительному росту флуоресценции красителя. Изменения спектров поглощения и флуоресценции ДОЦ при взаимодействии с БСА свидетельствуют в пользу сдвига *цис-транс*-равновесия красителя в комплексе. Исследовано влияние добавок денатурирующих альбумин соединений (мочевины, додецилсульфата натрия) на спектрально-флуоресцентные свойства красителя в комплексе ДОЦ–БСА.

Исследована J-агрегация ДОЦ в водных растворах в присутствии белков (сывороточных альбуминов, коллагенов, иммуноглобулина G) и синтетических полиэлектролитов (полиэтиленimina, поливинилпирролидона) [41]. Обнаружено, что денатурация сывороточного альбумина человека

мочевинной стимулирует J-агрегацию красителя. В присутствии денатурированного альбумина и полиэтиленimina краситель образует J-агрегаты двух типов. Образующиеся в присутствии полиэтиленimina J-агрегаты претерпевают перестройку во времени. Оксакарбоцианиновый краситель ДОЦ может служить зондом для альбуминов и использоваться для изучения процессов денатурации белков (см. [42]).

Проведено спектрально-флуоресцентное исследование взаимодействия с САЧ и БСА двух анионных полиметиновых красителей, один из которых – *мезо*-замещенный карбоцианин пиридиниевая соль 3,3'-ди-(γ -сульфопропил)-9-метилтиакробоцианин-бетаина (ДСМТ) [43]. При взаимодействии с альбуминами наблюдается рост интенсивности флуоресценции и, в большинстве случаев, длинноволновый сдвиг полосы поглощения красителей. Для ДСМТ наблюдается подвижное *цис-транс*-равновесие: в свободном состоянии краситель находится главным образом в виде *цис*-изомера, а в комплексе с альбуминами равновесие сдвигается в сторону *транс*-изомера (этот сдвиг сильнее для САЧ, чем для БСА). Определены константы связывания красителей с альбуминами. ДСМТ рекомендован в качестве спектрально-флуоресцентного зонда на сыровоточные альбумины.

Недавно были начаты исследования взаимодействия с САЧ близкого аналога ДЭЦ – натриевой соли 3,3'-ди-(γ -сульфопропил)-4,5,4',5'-дибензо-9-метилтиакробоцианин-бетаина (ДМЦ) [44, 45]. Показано, что он эффективно взаимодействует с САЧ с ростом интенсивности флуоресценции.

Был изучен ПЭЭВ между молекулами двух *мезо*-замещенных тиакробоцианиновых красителей, нековалентно связанных с САЧ [46]. В качестве донора энергии использовался ДСМТ и в роли красителя-акцептора выступал ДЭЦ. Перенос энергии был возможен вследствие сближения молекул донора и акцептора при связывании с молекулой САЧ. ПЭЭВ был изучен как в образцах, представляющих собой растворы САЧ, так и в системах, содержащих магнитные наночастицы с белковыми покрытиями. На основании полученных результатов сделан вывод о сохранении функциональных свойств САЧ в составе шитого покрытия, что свидетельствует о биосовместимости покрытий, полученных свободнорадикальной окислительной модификацией белка.

Методами оптической и флуоресцентной спектроскопии изучен ПЭЭВ между рядом анионных полиметиновых красителей, связанных с САЧ; также проведены измерения кинетики затухания флуоресценции. При этом донорами энергии служили тетрацианотри- и пентаметины, а акцепторами – два *мезо*-замещенных красителя:

ДЭЦ и 3,3'-ди-(γ -сульфопропил)-5,5'-диметокси-9-этилтиакробоцианин-бетаин [47]. Сравнительно малое расстояние между донором и акцептором (2.5–2.8 нм), определенное из модели Ферстера (Förster) и некоторые спектроскопические данные показывают, что молекулы донора и акцептора, вероятно, находятся в одном и том же домене связывания САЧ.

Краситель ДЭЦ был использован также при изучении структурных изменений биологических мицеллярных систем – солей желчных кислот (холатов): дезоксихолата натрия, холата натрия и таурохолата натрия [24]. Было показано, что структурные перестройки в водных растворах холатов происходят в широком диапазоне их концентраций, а не только вблизи значений ККМ, а краситель ДЭЦ может служить в качестве спектрально-флуоресцентного зонда при исследовании таких перестроек (в частности, служить индикатором для определения величины ККМ₂). Кроме того, методом импульсного фотолиза изучалась фотохимия ДЭЦ в мицеллах холатов. Наблюдалось образование фотоизомера и триплетного состояния красителя [25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как показало рассмотрение вышеприведенных работ, *мезо*-замещенные карбоцианиновые красители обладают рядом уникальных свойств, которые делают их незаменимыми при исследовании структурно-организованных сред, содержащих биомолекулы. Высокие константы связывания с биомолекулами, зависимость спектрально-флуоресцентных и фотохимических свойств от молекулярного окружения – все это дает большие преимущества для использования этих красителей в качестве зондов в биомолекулярных системах. Одной из важных особенностей таких красителей является динамическое равновесие между *транс*- и *цис*-изомерами, зависящее от среды, что благоприятствует использованию красителей в качестве зондов. Более резкий рост интенсивности флуоресценции при связывании с биомолекулами, обычно наблюдающийся для *мезо*-замещенных тиакробоцианинов по сравнению с незамещенными, является следствием того, что эти красители в водных растворах, как правило, находятся в форме нефлуоресцирующих *цис*-изомеров, молекулы которых, связываясь с биомолекулами, приобретают жесткость (что способствует флуоресценции), оставаясь в *цис*-форме (как в случае ДНК), или переходят во флуоресцирующие *транс*-изомеры (в случае альбуминов). В то же время незамещенные тиакробоцианины находятся в форме флуоресцирующих *транс*-изомеров как в свободном, так и в связанном состоянии, что объясняет меньший интервал изменения интенсивности флуоресценции при связывании с биомолекулами.

Сближение пары молекул красителей – донора и акцептора – в комплексе с биомолекулой дает возможность осуществить ПЭЭВ между ними. Определение параметров ПЭЭВ (из модели Ферстера) (Förster) позволяет извлечь важную информацию о локализации и динамике молекул донора и акцептора в комплексе.

Подчеркнем, что мезо-замещенные карбоцианины могут служить зондами при изучении не только нативных биомолекул, но и денатурированных, а также биомолекул в составе белковых оболочек наноразмерных частиц и биологических тканей, подвергшихся действию ферментов. С помощью этих красителей могут также изучаться процессы денатурации альбуминов под действием различных денатурирующих агентов.

Следует отметить, что мезо-замещенные карбоцианины могут служить не только спектрально-флуоресцентными, но и фотохимическими зондами. Связывание с биомолекулами резко изменяет фотохимические свойства таких красителей. В водной среде они обычно находятся в *цис*-форме, не фотоизомеризующейся и не переходящей в триплетное состояние при фотовозбуждении. В то же время в комплексах с биомолекулами они часто переходят в *транс*-форму, которая может фотоизомеризоваться (в мицеллах) и генерировать триплетное состояние (в мицеллах и в комплексах с ДНК). При этом двухкомпонентная кинетика гибели триплетного состояния в комплексах с ДНК свидетельствует о двух типах комплексов краситель–ДНК: интеркаляции между парами оснований и связывания в желобе ДНК. Тушение триплетного состояния связанного красителя тушителями различной природы дает ценную информацию о доступности молекулы-лиганда в комплексе с ДНК для активных реагентов (кислорода, ионов, радикалов и др.). Хотя в комплексе с биомолекулами фотоизомеризация обычно затруднена, для ТМКЦ и ДЭМТМКЦ нами был обнаружен новый эффект – появление *цис-транс*-фотоизомеризации при их связывании с ДНК и хондроитин-4-сульфатом (отсутствующей у красителей в водных растворах), что можно объяснить деформацией потенциальной поверхности фотоизомеризации красителей в комплексах с биомолекулой, приводящей при фотовозбуждении к образованию *транс*-фотоизомера.

Благоприятные спектрально-флуоресцентные свойства ряда мезо-замещенных карбоцианинов позволили нам рекомендовать их в качестве спектрально-флуоресцентных зондов для обнаружения и изучения биомолекул. К ним относятся: тикарбоцианины ТМКЦ (для ДНК, ГК, ХС), ДЭЦ (для САЧ, коллагенов, холатов), ДМЦ (для САЧ), ДСМТ (для сывороточных альбуминов); оксакарбоцианины ДЭМОКЦ, ДМЭОКЦ, ТЭООКЦ, ТЭМОКЦ (для ДНК), ДОЦ (для альбуминов).

Уникальные свойства красителя ДЭЦ дали нам возможность широко использовать его в качестве спектрально-флуоресцентного зонда при изучении разнообразных практически важных систем, включающих биомолекулы: тканей глаза человека и животных в развитии, белковых покрытий наноразмерных частиц, мицеллярных систем солей желчных кислот. Другие из рекомендованных красителей еще не нашли широкого практического применения. Не нашли широкого применения эти красители и в качестве фотохимических зондов, хотя изучение элементарных фотохимических процессов с участием данных красителей в комплексах с биомолекулами может дать большую и ценную информацию о детальном строении центров связывания, структуре и динамике биомолекулярных систем. Таким образом, в будущем можно ожидать интенсивного развития этого направления исследований.

Работа выполнена в рамках госзадания № 001201253314 (ИБХФ РАН) и частично в рамках госзадания № 0108-2019-0005 (ИБР РАН).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иценко А.А. // Успехи химии. 1991. Т. 60. № 8. С. 1708.
2. Taticolov A.S. // J. Photochem. Photobiol., C: Photochem. Reviews. 2012. V. 13. № 1. P. 55; <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2011.11.001>
3. Khimenko V., Chibisov A.K., Görner H. // J. Phys. Chem. A. 1997. V. 101. № 39. P. 7304; <https://doi.org/10.1021/jp971472b>
4. Kay R.E., Walwick E.R., Gifford C.K. // J. Phys. Chem. 1964. V. 68. № 7. P. 1896; <https://doi.org/10.1021/j100789a040>
5. Kay R.E., Walwick E.R., Gifford C.K. // J. Phys. Chem. 1964. V. 68. № 7. P. 1907; <https://doi.org/10.1021/j100789a041>
6. Bean R.C., Shepherd W.C., Kay R.E., Walwick E.R. // Ibid. 1965. V. 69. № 12. P. 4368; <https://doi.org/10.1021/j100782a050>
7. Kovalska V.B., Volkova K.D., Losytskyy M.Yu. et al. // Spectrochim. Acta, Part A. 2006. V. 65. № 2. С. 271; <https://doi.org/10.1016/j.saa.2005.10.042>
8. Аниковский М.Ю., Татиолов А.С., Кузьмин В.А. // Химия высоких энергий. 2002. Т. 36. № 3. С. 207.
9. Аниковский М.Ю., Татиолов А.С., Пронкин П.Г. и др. // Там же. 2003. Т. 37. № 6. С. 445.
10. Пронкин П.Г., Татиолов А.С., Аниковский М.Ю., Кузьмин В.А. // Там же. 2005. Т. 39. № 4. С. 280.
11. Пронкин П.Г., Татиолов А.С., Кузьмин В.А. // Там же. 2007. Т. 41. № 2. С. 129.
12. Пронкин П.Г., Татиолов А.С., Скляренко В.И., Кузьмин В.А. // Там же. 2006. Т. 40. № 4. С. 295.
13. Пронкин П.Г., Татиолов А.С., Скляренко В.И., Кузьмин В.А. // Там же. 2006. Т. 40. № 6. С. 451.
14. Пронкин П.Г., Татиолов А.С. // Там же. 2009. Т. 43. № 6. С. 527.

15. *Пронкин П.Г., Татиколов А.С.* // Там же. 2011. Т. 45. № 2. С. 169.
16. *Пронкин П.Г., Татиколов А.С.* // Там же. 2012. Т. 46. № 2. С. 148.
17. *Акимкин Т.М., Татиколов А.С., Ярмолюк С.М.* // Там же. 2011. Т. 45. № 3. С. 252.
18. *Пронкин П.Г., Татиколов А.С.* // Там же. 2012. Т. 46. № 4. С. 301.
19. *Пронкин П.Г., Татиколов А.С.* // Там же. 2015. Т. 49. № 5. С. 368;
<https://doi.org/10.7868/S0023119315050113>
20. *Pronkin P.G., Tatikolov A.S.* // Spectrochim. Acta, Part A. 2018. V. 202. P. 269;
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.05.053>
21. *Акимкин Т.М., Татиколов А.С., Панова И.Г., Ярмолюк С.М.* // Химия высоких энергий. 2011. Т. 45. № 6. С. 553.
22. *Tatikolov A.S., Akimkin T.M., Panova I.G., Yarmoluk S.M.* // Spectrochim. Acta, Part A. 2017. V. 177. P. 93;
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.01.033>
23. *Tatikolov A.S., Akimkin T.M., Pronkin P.G., Yarmoluk S.M.* // Chem. Phys. Lett. 2013. V. 556. P. 287;
<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2012.11.097>
24. *Tatikolov A.S., Pronkin P.G., Panova I.G.* // Spectrochim. Acta, Part A. 2019. V. 216. P. 190;
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.03.017>
25. *Татиколов А.С., Пронкин П.Г.* // Журн. прикл. спектроскопии. 2018. Т. 85. № 6. С. 861.
26. *Tatikolov A.S., Costa S.M.B.* // Biophys. Chem. 2004. V. 107. P. 33;
[https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(03\)00218-7](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(03)00218-7)
27. *Татиколов А.С., Панова И.Г.* // Химия высоких энергий. 2005. Т. 39. № 4. С. 275.
28. *Панова И.Г., Татиколов А.С.* // ДАН. 2005. Т. 402. № 5. С. 709.
29. *Panova I.G., Sharova N.P., Dmitrieva S.B. et al.* // Anal. Biochem. 2007. V. 361. P. 183;
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.11.029>
30. *Панова И.Г., Татиколов А.С., Сухих Г.Т.* // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2007. Т. 144. № 11. С. 522.
31. *Panova I.G., Tatikolov A.S.* // Proc. SPIE. 2009. V. 7163. P. 71631O;
<https://doi.org/10.1117/12.808400>
32. *Панова И.Г., Татиколов А.С.* // Изв. РАН. Сер. биол. 2011. № 2. С. 235.
33. *Panova I.G., Sharova N.P., Dmitrieva S.B., et al.* // Comp. Biochem. Physiol., Part A. 2008. V. 151. P. 676;
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.08.020>
34. *Panova I.G., Tatikolov A.S., Sharova N.P.* // Proc. SPIE. 2010. V. 7550. P. 75501W;
<https://doi.org/10.1117/12.841128>
35. *Пронкин П.Г., Бычкова А.В., Сорокина О.Н. и др.* // Химия высоких энергий. 2013. Т. 47. № 5. С. 400;
<https://doi.org/10.7868/S0023119713050116>
36. *Бычкова А.В., Пронкин П.Г., Сорокина О.Н. и др.* // Коллоид. журн. 2014. Т. 76. № 4. С. 420;
<https://doi.org/10.7868/S002329121404003X>
37. *Татиколов А.С., Акимкин Т.М., Кашин А.С., Панова И.Г.* // Химия высоких энергий. 2010. Т. 44. № 3. С. 252.
38. *Татиколов А.С., Панова И.Г.* // Там же. 2014. Т. 48. № 2. С. 116.
39. *Пронкин П.Г., Татиколов А.С.* // Журн. прикл. спектроскопии. 2015. Т. 82. № 3. С. 429.
40. *Пронкин П.Г., Татиколов А.С.* // Там же. 2016. Т. 83. № 6. С. 884.
41. *Пронкин П.Г., Татиколов А.С.* // Там же. 2017. Т. 84. № 2. С. 192.
42. *Горобец М.Г., Вассерман Л.А., Васильева А.Д. и др.* // ДАН. 2017. Т. 474. № 6. С. 751.
43. *Кашин А.С., Татиколов А.С.* // Химия высоких энергий. 2009. Т. 43. № 6. С. 536.
44. *Шведова Л.А., Татиколов А.С., Пронкин П.Г., Панова И.Г.* // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2018. Т. 3. № 1. С. 168.
45. *Шведова Л.А., Татиколов А.С., Пронкин П.Г., Панова И.Г.* Приоритетные направления развития науки и образования (монография). Глава 16. Анионные мезо-замещенные карбоцианиновые красители в качестве спектрально-флуоресцентных зондов на альбумин *in vitro*. Пенза: МЦНС "Наука и просвещение", 2018. С. 146.
46. *Пронкин П.Г., Сорокина О.Н., Бычкова А.В. и др.* // Химия высоких энергий. 2015. Т. 49. № 1. С. 26.
47. *Tatikolov A.S., Costa S.M.B.* // Photochem. Photobiol. 2004. V. 80. P. 250;
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2004.tb00079.x>