

ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИНДОТРИКАРБОЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ ПРИ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИИ С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

Д. С. Тарасов^{1,2*}, М. П. Самцов¹, И. И. Хлудеев¹, Е. В. Малюшкова², И. В. Семак²

УДК 535.37;547.97;577.3;543.426

<https://doi.org/10.47612/0514-7506-2022-89-5-605-613>

¹ Институт прикладных физических проблем им. А. Н. Севченко, Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь; e-mail: tarasovds@bsu.by

² Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

(Поступила 23 июня 2022)

Исследованы фотофизические свойства индотрикарбоцианиновых красителей при комплексобразовании с сывороточным альбумином и оптимизирована методика обнаружения их образования с помощью электрофореза. В связи с деградацией молекул красителя под действием кислот поиск области локализации исследуемого красителя на поверхности гелевой пластины осуществлен путем регистрации спектров флуоресценции красителя до фиксации и визуализации белков с последующим завершением протокола получения электрофореграмм. Для минимизации возможного влияния свечения компонентов геля возбуждение осуществлялось излучением полупроводникового лазера с длиной волны 684 нм, возбуждающим флуоресценцию исследуемых красителей. Установлено, что положение максимумов и полуширины спектров флуоресценции красителей с ортофениленовым мостиком в цепи сопряжения в соответствующих локализации альбумина областях электрофореграммы совпадают с характеристиками испускания красителей в исходных растворах с альбумином, что позволяет выявить образование ковалентно связанных комплексов молекул красителей с альбумином.

Ключевые слова: индотрикарбоцианиновые красители, комплексобразование, белки сыворотки крови, гель-электрофорез, лазерная флуоресцентная спектроскопия.

The photophysical properties of indotricarbocyanine dyes upon complexation with serum albumin have been studied, and the technique for controlling their formation using electrophoresis has been optimized. In connection with the degradation of dye molecules under the action of acids, the search for the area of localization of the dye under study on the surface of the gel plate was carried out by recording the fluorescence spectra of the dye before protein fixation and visualization followed by the completion of the protocol for obtaining electrophoregrams. To minimize the possible influence of the luminescence of the gel components, the excitation was carried out by the radiation of a semiconductor laser with a wavelength of 684 nm, which initiates the fluorescence of the studied dyes. It was established that the position of the maxima and the half-width of the fluorescence spectra of dyes with an orthophenylene bridge in the conjugation chain in the regions of the electropherogram corresponding to the localization of albumin coincide with the characteristics of the emission of dyes in initial solutions with albumin, which makes it possible to reveal the formation of covalently bound complexes of dye molecules with albumin.

Keywords: indotricarbocyanine dyes, complexation, blood serum proteins, gel electrophoresis, laser fluorescence spectroscopy.

PHOTOPHYSICAL PROPERTIES OF INDOTRICARBOCYANINE DYES DURING COMPLEXATION WITH SERUM ALBUMIN

D. S. Tarasov^{1,2*}, M. P. Samtsov¹, I. I. Khludayev¹, E. V. Maliushkova², I. V. Semak²

(¹ A. N. Sevchenko Institute for Applied Physical Problems of Belarusian State University, Minsk, Belarus; e-mail: tarasovds@bsu.by; ² Belarusian State University, Minsk, Belarus)

* Автор, с которым следует вести переписку.

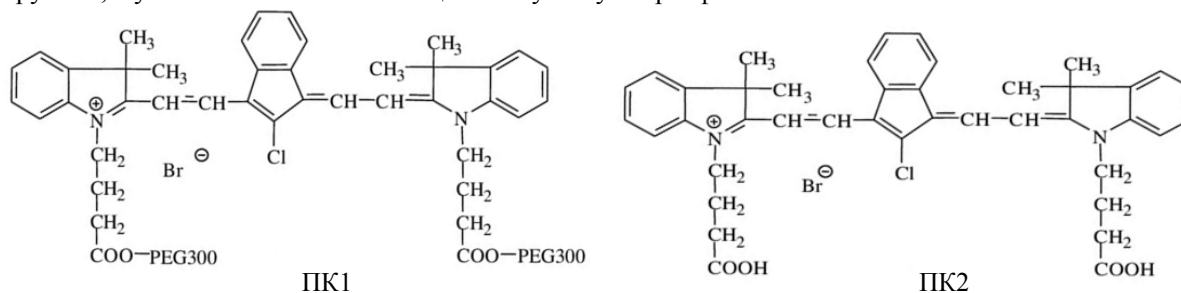
Введение. В последние годы отмечается рост количества публикаций, посвященных изучению свойств полиметиновых красителей в качестве основы биозондов и перспективных фотосенсибилизаторов (ФС) для фотодинамической терапии [1, 2]. Для соединений данного класса характерны наличие полос поглощения в широком спектральном диапазоне с большим коэффициентом поглощения, значительное повышение квантового выхода флуоресценции при комплексообразовании с биомолекулами, относительная простота модификации их структуры [3—6]. При этом ряд красителей проявляют выраженный противоопухолевый эффект при использовании в качестве ФС для фотодинамической терапии [7—11]. Варьирование длины полиметиновой цепи красителя и использование различных заместителей в его структуре являются общепринятой стратегией коррекции значимых характеристик ФС: положения спектра поглощения в окне прозрачности биологических тканей (700—900 нм), квантового выхода генерации синглетного кислорода или радикалов, темновой токсичности и скорости выведения из тканей [6]. В этом направлении нами проведены исследования свойств индотрикарбоцианиновых красителей [9, 12—15]. По результатам комплексных исследований фотофизических свойств индотрикарбоцианиновых красителей в модельных системах и перевивных опухолях экспериментальных животных *in vivo* определена структура красителя [10], которая обеспечивает соответствие большинству параметров идеального ФС [16, 17]. Отличительные особенности его строения — наличие хлорзамещенного ортофениленового мостика в цепи сопряжения и двух цепочек полиэтиленгликолей (ПЭГ) с массой 300 Да на концевых группах. Наличие молекул ПЭГ в структуре обеспечила новому ФС высокую растворимость в воде и биосовместимость.

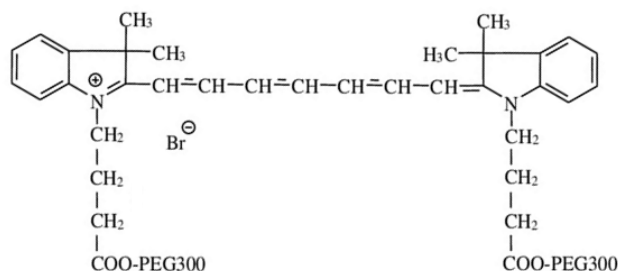
Эффективность ФС во многом зависит от избирательности его накопления в опухолевых тканях, что стимулирует исследование способов адресной доставки препаратов. Одним из путей решения этой задачи является комплексообразование молекул ФС с носителями, которые способствуют эффективному накоплению в целевых клетках. В этом плане важнейшее значение имеют компоненты сыворотки крови — белки и липопротеины [18—21]. В [22] с помощью методов спектрофотометрии и эксклюзионной хроматографии выявлено образование комплексов трикарбоцианиновых красителей с белками сыворотки крови, однако данные методы исследований не позволили установить характер связи в таких комплексах.

В определенной мере эталонной методикой, которая позволяет выявлять образование ковалентно связанных комплексов различных субстанций с биомолекулами, является гель-электрофорез [23—27], в основе которого лежит обнаружение и идентификация препарата по молекулярной массе комплексов с биомолекулами. Гель-электрофорез — один из основных методов молекулярной биологии и биохимии для разделения и анализа белков и нуклеиновых кислот [28], который широко применяется в медицинской биохимии. Использование флуоресцентных меток делает возможным прямое детектирование в геле целевых белковых макромолекул после их электрофоретического разделения [29]. Флуоресцентное изображение регистрируется с помощью CCD-камеры или фотоумножителя с механическим сканированием образца [29] при использовании соответствующего набора светофильтров. Такой мультиспектральный подход обеспечивает высокое пространственное разрешение. В то же время спектральная селективность составляет порядка нескольких десятков или сотен нанометров, что в ряде случаев недостаточно. Существует ряд схем получения гиперспектральных изображений биологических образцов [30].

В настоящей работе для обнаружения комплексов индотрикарбоцианиновых красителей с сывороточным альбумином в процессе гель-электрофореза предложено использовать систему на основе лазерного спектрофлуориметра с оптоволоконным коллектором сбора излучения, совмещенного с механической сканирующей платформой.

Эксперимент. Исследованы перспективный для использования в качестве ФС для фотодинамической терапии симметричный индотрикарбоцианиновый краситель ПК1 [10], а также два близких по структуре красителя — ПК2 и ПК3. Красители разработаны и синтезированы в лаборатории спектроскопии НИИ ПФП им. А. Н. Севченко БГУ. У ПК2 по сравнению с ПК1 отсутствуют ПЭГ на концевых группах, а у ПК3 в полиметиновой цепи отсутствует ортофениленовый мостик:





ПК3

В качестве модельной биологической среды использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) фирмы Serva (Германия). Растворы готовили в натрий-калиевом фосфатном буфере Дюльбекко (0.14 моль/л) с pH 7.4 (ФСБ). Образцы для электрофореза готовили путем введения в растворы БСА стоковых растворов красителей в ФСБ (ПК1 и ПК3). Краситель ПК2 обладает низкой растворимостью в воде, в связи с чем стоковый раствор для него готовился с содержанием этанола 5 %. Концентрация белка в анализируемых с помощью электрофореза образцах 30 мкМ (концентрация белка 2 г/л), концентрации красителей в разных опытах 30 и 10 мкМ. Исследованы две серии образцов, которые различались условиями окрашивания раствора БСА красителями: образцы инкубировали в течение 120 мин при комнатной температуре (22 °С) или в термостате при 37 °С.

Спектры поглощения зарегистрированы с помощью спектрофотометра Solar PV1251. Люминесцентные характеристики красителей изучали с помощью спектрофлуорометра Fluorolog, а также лазерного флуоресцентного спектрометра [31]. В последнем подвод возбуждающего излучения к исследуемому образцу и сбор флуоресценции осуществляли с помощью Y-образного оптоволоконного световода. В один канал световода подавали излучение полупроводникового лазера с $\lambda = 684$ нм, второй обеспечивал доставку излучения флуоресценции в полихроматор спектрометра.

Анализ связывания красителей с белками в растворах БСА выполняли путем электрофореза белков по методу Лэммли в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS) в восстанавливающих условиях (SDS-PAGE). Электрофоретическое разделение белков проводили в 15 %-ном полиакриламидном геле в диссоциирующих условиях с помощью камеры для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN (Bio-Rad). Данное оборудование позволило на одной электрофореграмме проводить исследование одновременно девяти образцов. Для определения молекулярной массы белков в одну из лунок вносили смесь белков-стандартов с известными молекулярными массами 10—200 кДа. Стандартный протокол электрофореза включает в себя следующие процедуры [32, 33]. Перед проведением электрофореза белки в течение 2 мин подвергают кипячению при 95 °С в денатурирующей смеси, содержащей 2-меркаптоэтанол и SDS, в результате чего происходит разрушение всех уровней регулярной укладки белка. При этом 2-меркаптоэтанол восстанавливает дисульфидные связи, обеспечивая линейность полипептидной цепи. Полипептиды за счет связывания молекул анионного детергента SDS приобретают отрицательный заряд. Собственный заряд полипептида становится несущественным по сравнению с суммарным отрицательным зарядом связанных с ним молекул SDS. Количество связанного SDS не зависит от последовательности аминокислот в полипептиде и практически всегда пропорционально его длине и, следовательно, молекулярной массе, вследствие чего все полипептиды имеют одинаковый удельный заряд и разделяются в полиакриламидном геле в условиях постоянного электрического поля обратно пропорционально логарифму их молекулярной массы.

После электрофореза гель помещают на 1 ч в раствор 30 %-ной трихлоруксусной кислоты для фиксации белков. Для визуализации белковых полос на электрофореграмме гель окрашивают красителем Кумасси R-250, затем отмывают 7 %-ной уксусной кислотой до полного обесцвечивания фона. Комплекс белок—Кумасси R-250 имеет максимум поглощения при 549 нм, интенсивность окрашивания зависит от концентрации белка, что делает возможным спектрофотометрическое (денситометрическое) определение его количества непосредственно в геле [34]. Для количественной оценки белков можно также использовать способность Кумасси R-250 к флуоресценции. Комплексообразование этого красителя с белками способствует усилению его флуоресценции, широкая полоса которой расположена вблизи 670 нм при возбуждении на 550 нм, при этом интенсивность флуоресценции пропорциональна содержанию белка [35].

Результаты и их обсуждение. При выполнении гель-электрофореза по стандартному протоколу исследуемые красители на поверхности гелевой пластины не обнаружены. В связи с этим проведены исследования по установлению влияния процессов денатурации белка, введения в раствор трихлоруксусной и уксусной кислот на состояние молекул красителей при таких воздействиях. Для этого изучены спектрально-люминесцентные свойства красителей в каждой из сред, используемых при приготовлении образцов и последовательном выполнении всех этапов электрофореза.

В стоковом растворе красителей в ФСБ в спектрах их поглощения наблюдается образование их агрегатов. Краситель ПК2 является гидрофобным и в воде агрегирует с образованием Н- и J-ассоциатов [36]. В спектрах поглощения его растворов в ФСБ проявляются полосы, соответствующие мономерам, Н- и J-агрегатам (рис. 1, а). Максимум полосы мономеров находится вблизи 707 нм. Краситель ПК1 гидрофильный, его растворы в ФСБ представляют собой равновесную смесь мономеров и димеров Н-типа [37]. Максимум поглощения мономеров расположен на $\lambda = 708$ нм. Анализ спектрально-люминесцентных свойств ПК3 в ФСБ подтверждает, что его молекулы находятся преимущественно в форме мономеров ($\lambda_{\text{макс}} = 746$ нм). Вместе с тем флуоресценция исследуемых красителей в ФСБ однокомпонентная: форма спектра не зависит от длины волны возбуждения при сканировании в пределах длинноволновой полосы поглощения, кинетика затухания флуоресценции аппроксимируется одной экспонентой (рис. 1, б; табл. 1). Спектр флуоресценции красителей приблизительно зеркально-симметричен спектру поглощения их мономеров.

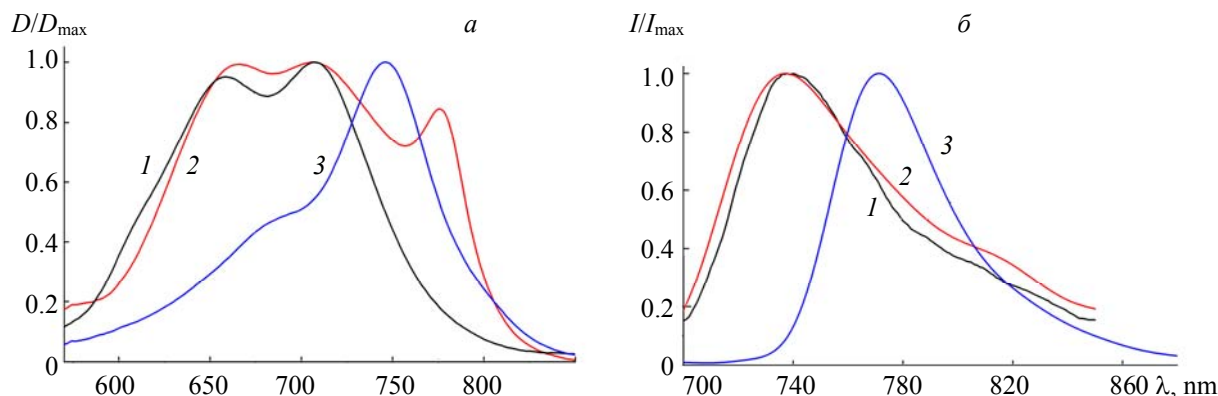


Рис. 1. Нормированные спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) трикарбоцианиновых красителей (10 мкМ) ПК1 (1), ПК2 (2) и ПК3 (3) при возбуждении излучением с $\lambda = 684$ нм в натрий-калиевом фосфатном буфере Дюльбекко (0.14 моль/л) с рН 7.4

Т а б л и ц а 1. Параметры флуоресценции индоцианиновых красителей в растворах ФСБ и БСА-ФСБ

Краситель	$\lambda_{\text{погл}}$, нм	$\lambda_{\text{фл}}$, нм	$\Delta\lambda_{\text{фл}}$, нм (см^{-1})	τ (20 °С), нс	P (20 °С)
<i>ФСБ</i>					
ПК1	708	738	64 (1134)	0.4±0.1	0.23±0.02
ПК2	707	737	77 (1357)	0.3±0.1	0.26±0.02
ПК3	746	772	49 (810)	0.3±0.1	0.33±0.02
<i>5 % раствор БСА-ФСБ</i>					
ПК1	728	755	37 (577)	1.4±0.1	0.46±0.02
ПК2	739	761	46 (770)	1.4±0.1	0.45±0.02
ПК3	746	775	50 (807)	0.4±0.1	0.42±0.02

П р и м е ч а н и е. Концентрация красителя 30 мкМ; $\lambda_{\text{погл}}$ — положение максимума поглощения мономеров, определенное по спектру возбуждения флуоресценции; $\lambda_{\text{фл}}$ — положение максимума флуоресценции; $\Delta\lambda_{\text{фл}}$ — полуширина спектра флуоресценции; τ — длительность затухания флуоресценции; P — степень поляризации флуоресценции.

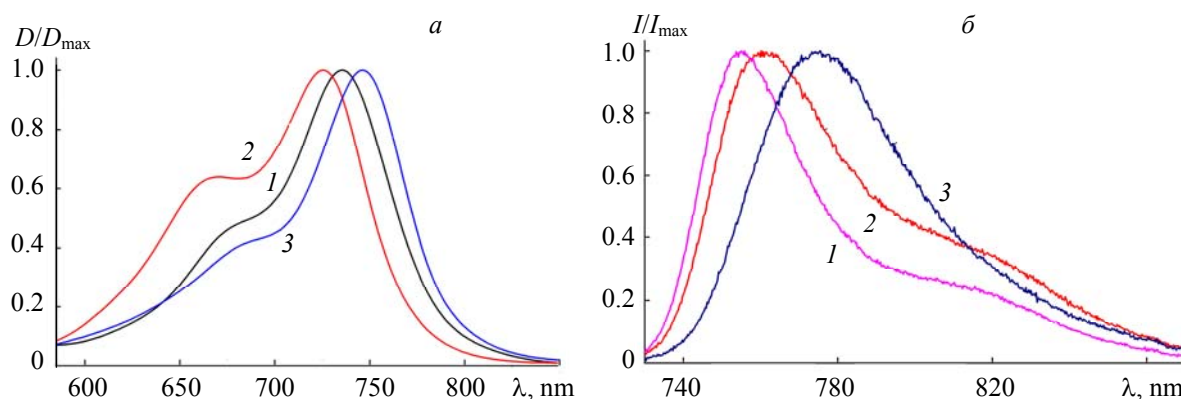


Рис. 2. Нормированные спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) при возбуждении с $\lambda = 684$ нм растворов трикарбоцианиновых красителей (30 мкМ, 37 °С) ПК1 (1), ПК2 (2) и ПК3 (3) в БСА для денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле

Спектральные параметры ПК1 и ПК2 в растворах БСА (рис. 2; табл. 1) резко отличаются от таковых в ФСБ: наблюдается смещение максимумов поглощения и флуоресценции в длинноволновую область, уменьшается вклад полосы агрегатов в суммарный спектр поглощения, возрастает длительность затухания флуоресценции, увеличивается степень поляризации флуоресценции с 0.23—0.26 до 0.45—0.46, что в совокупности позволяет сделать заключение об образовании комплексов с БСА.

Для красителя ПК3, у которого отсутствует хлорзамещенный ортофениленовый мостик в полиметиновой цепи сопряжения, в растворах БСА спектры поглощения, флуоресценции и время затухания флуоресценции изменяются незначительно. Вместе с тем увеличение степени поляризации флуоресценции с 0.33 до 0.42 в сочетании с увеличением длительности затухания флуоресценции являются свидетельством образования комплексов молекул красителя с макромолекулами белка.

Стабильность исследуемых красителей на каждой стадии электрофореза определялась путем анализа влияния на спектры их поглощения в растворе БСА при создании соответствующих условий. Установлено, что концентрация красителей не изменяется при инкубации в течение 2 мин в диссоциирующей смеси при 95 °С, т. е. отсутствует деструкция красителей. При этом введение кислот (стадия фиксации и проявления белков) приводит к полному и необратимому снижению концентрации красителей, их поглощение в основной полосе падает до нуля. С учетом полученных данных внесено изменение в протокол проведения электрофореза. На первом этапе, до начала обработки гелевой пластины 30 %-ным раствором трихлоруксусной кислоты и процедуры визуализации полос белков раствором Кумасси, определяли локализацию красителей путем сканирования поверхности геля и регистрации их флуоресценции. Затем проводили соответствующую обработку гелевой пластины для фиксации и проявления расположения белков.

Наряду с этим проведены исследования спектров флуоресценции красителей при нанесении их растворов в ФСБ на поверхность пластины с последующим высушиванием при комнатной температуре (рис. 3). Для таких образцов установлено, что спектры флуоресценции красителей при нанесении на гелевую пластину смещаются в длинноволновую область по сравнению с исходными растворами: для ПК1 $\lambda_{\text{макс}} = 761$ нм и полуширина $\Delta\lambda = 34$ нм (610 см^{-1}), для ПК2 $\lambda_{\text{макс}} = 760$ нм и $\Delta\lambda = 34$ нм (628 см^{-1}), для ПК3 $\lambda_{\text{макс}} = 778$ нм и $\Delta\lambda = 57$ нм (795 см^{-1}). Положение максимумов и полуширины спектров флуоресценции исследуемых красителей заметно отличаются от таковых для растворов с БСА.

Поиск и идентификация исследуемых красителей на электрофореграмме осуществлялись путем регистрации спектров флуоресценции при сканировании поверхности коллектором световода и фиксации координат этих областей. Для этого использовано устройство, состоящее из перемещаемой микрометрическими винтами платформы, над которой перпендикулярно плоскости геля закреплен световод диаметром 2 мм флуоресцентного спектрометра. Обнаружение локализации исследуемых красителей на электрофореграмме выполнялось путем сопоставления характеристик флуоресценции красителя в исходных средах (ФСБ, раствор БСА) и обнаруженной на электрофореграмме спектров фотолюминесценции.

Координаты локализации молекул красителей в составе белков определяли по устойчивому превышению сигнала флуоресценции красителей по сравнению с фоновым, который регистрировался

вне области расположения на гелевой пластине полос с введенными белками (рис. 4). Для минимизации возможного влияния свечения компонентов геля возбуждение осуществлялось излучением полупроводникового лазера с длиной волны генерации 684 нм, которое инициирует флуоресценцию преимущественно красителя. Фоновое испускание компонентов геля спектрально отличается от флуоресценции красителей (рис. 5 и 6): $\lambda_{\text{макс}} = 748 \text{ нм}$, $\Delta\lambda = 32 \text{ нм}$ (553 см^{-1}), при этом его величина не превышает 1/3 сигнала флуоресценции красителей.

После определения координат локализации молекул исследуемых красителей осуществлялась визуализация расположения белков на гелевой пластине электрофореграммы. Для этого проводилась обработка пластины раствором Кумасси. С помощью фотокамеры фиксировали изображение ее поверхности и соотносили с координатами зарегистрированной флуоресценции красителей. В результате сканирования гель-электрофореграммы обнаружено несколько областей с выраженным сигналом, который соответствует по спектральному составу флуоресценции красителей в растворе с БСА, т. е. при образовании комплексов с белком. На фотографиях гелей после визуализации положения белков путем окрашивания раствором Кумасси отмечены эти позиции (рис. 4). В полосах на пластине, которые соответствуют движению при электрофорезе БСА без исследуемых красителей, флуоресценция не наблюдалась.

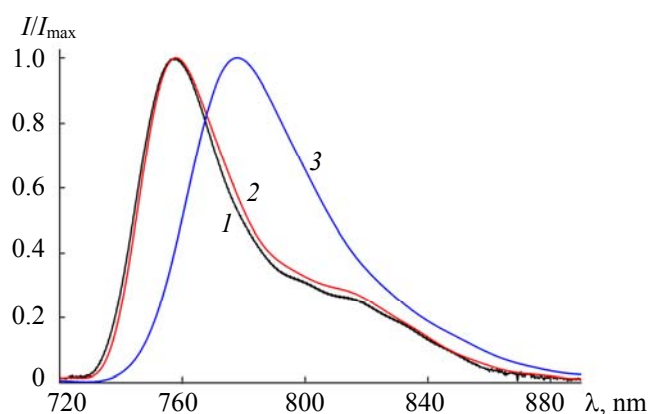


Рис. 3. Нормированные спектры флуоресценции красителей ПК1 (1), ПК2 (2) и ПК3 (3) после нанесения образцов в ФСБ (10 мкМ) на поверхность гелевой пластины с последующим высушиванием

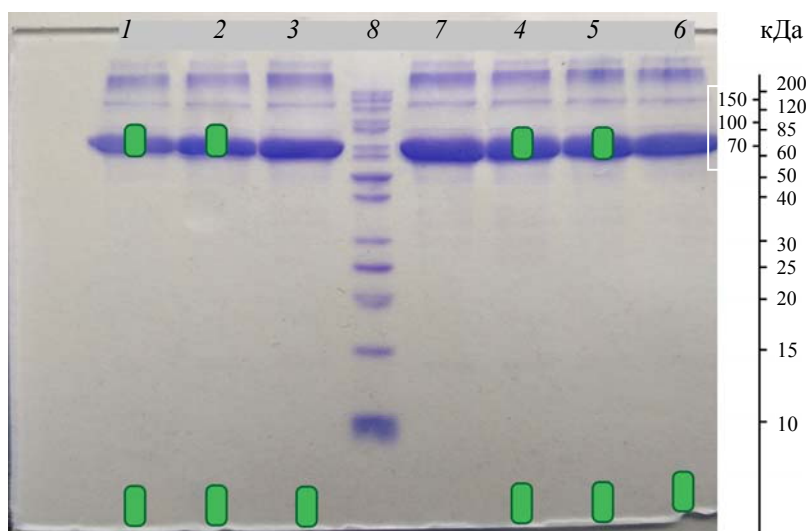


Рис. 4. Электрофореграмма растворов БСА, предварительно обработанных трикарбоцианиновыми красителями: 1 — ПК1, 22 °С; 2 — ПК2, 22 °С; 3 — ПК3, 22 °С; 4 — ПК1, 37 °С; 5 — ПК2, 37 °С; 6 — ПК3, 37 °С; 7 — раствор без красителей; 8 — набор белков стандартов с известными молекулярными массами

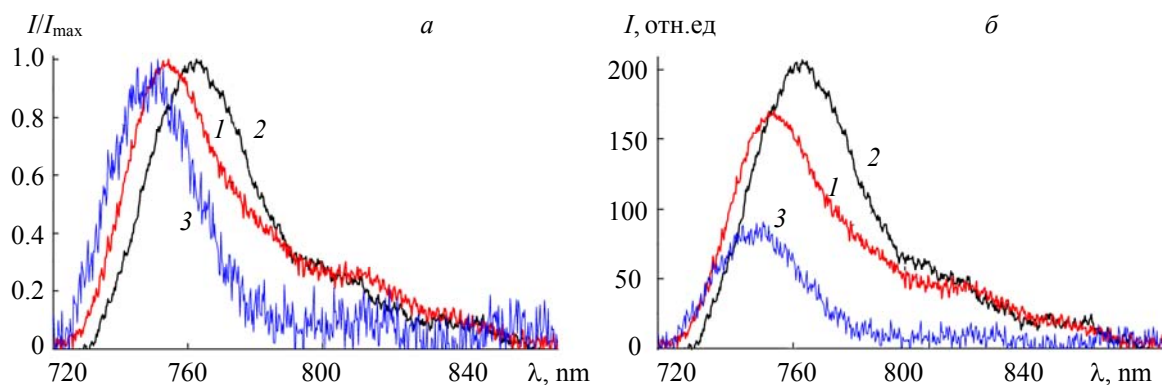


Рис. 5. Нормированные (а) и исходные (б) спектры флуоресценции комплексов трикарбоцианиновых красителей ПК1 (1) и ПК2 (2) с альбумином на электрофореграмме при возбуждении излучением с $\lambda = 684$ нм; 3 — фоновое испускание компонент геля

Молекулярная масса БСА 69 кДа, на электрофореграмме этому положению вблизи 69 ± 4 кДа соответствуют координаты полосы, в которой зарегистрирован выраженный сигнал флуоресценции образцов, окрашенных красителями ПК1 или ПК2, для обеих серий (рис. 4). Положения максимума и полуширина спектров флуоресценции ПК1 и ПК2 в областях, соответствующих расположению альбумина на электрофореграмме (для ПК1 $\lambda_{\text{макс}} = 754$ нм, $\Delta\lambda = 38$ нм (643 см^{-1}) и для ПК2 $\lambda_{\text{макс}} = 762$ нм, $\Delta\lambda = 37$ нм (636 см^{-1})), совпадают с характеристиками для красителей в исходных растворах с БСА. Поскольку перемещение в геле при прохождении электрического тока определяется размером молекул, можно утверждать, что флуоресценция в данной области соответствует ковалентно связанным комплексам ПК1 и ПК2 с альбумином. Совпадение спектров указывает на то, что полиакриламидный гель и содержащиеся в нем вещества практически не влияют на положение и форму спектра флуоресценции молекул красителя в составе комплексов с БСА.

Для всех красителей обнаружен достаточно интенсивный сигнал флуоресценции на нижнем крае гелевой пластины (рис. 6) со следующими параметрами: ПК1 $\lambda_{\text{макс}} = 761$ нм, $\Delta\lambda = 606 \text{ см}^{-1}$ (35 нм); ПК2 $\lambda_{\text{макс}} = 760$ нм, $\Delta\lambda = 588 \text{ см}^{-1}$ (34 нм); ПК3 $\lambda_{\text{макс}} = 779$ нм, $\Delta\lambda = 912 \text{ см}^{-1}$ (56 нм). Спектры с такими характеристиками не обнаруживаются в других областях геля. При этом такие же параметры спектров флуоресценции наблюдаются при капельном нанесении растворов красителей в ФС на поверхность чистого геля с последующим высушиванием. Согласно экстраполяции данных для набора белков стандарта, молекулярная масса объектов в этой области 1.5—6.0 кДа. Молекулярные массы красителей ПК1, ПК2 и ПК3 1270, 740 и 1117 Да соответственно. При этом после визуализации красителем Кумасси белки в этой области не обнаруживаются. На основании полученных данных можно утверждать, что в нижней области гелевой пластины локализованы не связанные с белками молекулы

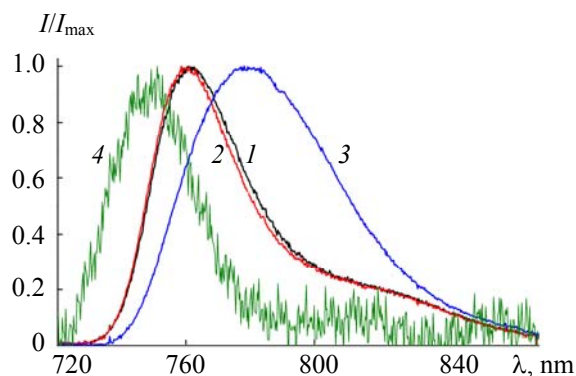


Рис. 6. Нормированные спектры флуоресценции трикарбоцианиновых красителей ПК1 (1), ПК2 (2) и ПК3 (3) в нижней части гелевых пластин на электрофореграмме при возбуждении излучением с $\lambda = 684$ нм; 4 — фоновое испускание компонент геля

красителя. При этом краситель ПКЗ обнаруживается на пластине только в данной области, что свидетельствует об отсутствии образования ковалентно связанных комплексов этого соединения с БСА. Регистрация в нижней части гелевых пластин не связанных с белком молекул красителей свидетельствует об их стабильности в процессе электрофореза при прохождении электрического тока.

Заключение. На основании исследования фотофизических свойств индотрикарбоницианиновых красителей при комплексообразовании с сывороточным альбумином разработана двухстадийная методика электрофореза, которая позволила выявить образование ковалентно связанных комплексов индотрикарбоницианиновых красителей с белковыми макромолекулами. Для обнаружения и идентификации красителей на гелевой пластине электрофореграммы предложено использовать сканирующее устройство со световодным коллектором флуоресцентного спектрометра, что позволило обеспечить достаточно высокие спектральное разрешение и уровень чувствительности. Показано, что путем анализа спектров флуоресценции исследуемых красителей на электрофореграмме можно идентифицировать флуоресцентные метки и получить важную информацию об их состоянии. Интенсивность флуоресценции красителя может использоваться для количественных оценок его содержания в различных белковых фракциях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (договоры Ф22УЗБ-044 от 04.05.2022 и Ф22МВ-014 от 04.05.2022) и государственных программ научных исследований (задания 3.03.6 ГПНИ “Конвергенция-2025” и 1.6.3 ГПНИ “Фотоника и электроника для инноваций”).

- [1] **D. M. Dereje, C. Pontremoli, M. J. Moran Plata, S. Visentin, N. Barbero.** *Photochem. Photobiol. Sci.*, **21** (2022) 397—419, <https://doi.org/10.1007/s43630-022-00175-6>
- [2] **N. Lange, W. Szlasa, J. Saczko, A. Chwilkowska.** *Pharmaceutics*, **13**, N 6 (2021) 818, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060818>
- [3] **A. A. Ishchenko.** *Russ. Chem. Rev.*, **60**, N 8 (1991) 865—884, <https://doi.org/10.1070/RC1991v060n08ABEH001116>
- [4] **L. Beverina, P. Salice.** *Eur. J. Org. Chem.*, N 7 (2010) 1207—1225, <https://doi.org/10.1002/ejoc.200901297>
- [5] **L. Beverina, M. Sassi.** *Synlett*, **25**, N 4 (2014) 477—490, <https://doi.org/10.1055/s-0033-1340482>
- [6] **L. Stackova, E. Muchova, M. Russo, P. Slavicek, P. Stacko, P. Klan.** *J. Org. Chem.*, **85**, N 15 (2020) 9776—9790, <https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c01104>
- [7] **М. П. Самцов, Е. С. Воропай, Л. С. Ляшенко, Д. Г. Мельников, К. Н. Каплевский, А. П. Луговский.** *Журн. прикл. спектр.*, **78**, № 1 (2011) 121—127 [**M. P. Samtsov, E. S. Voropay, L. S. Lyashenko, D. G. Melnikau, K. N. Kaplevsky, A. P. Lugovskij.** *J. Appl. Spectr.*, **78**, N 1 (2011) 110—116], <https://doi.org/10.1007/s10812-011-9432-y>
- [8] **E. S. Voropay, M. P. Samtsov, A. P. Lugovsky, E. A. Zhavrid, E. N. Alexandrova, Yu. P. Istomin, I. N. Zhuravkin.** *Exp. Oncol.*, **19** (1997) 56—60
- [9] **Y. P. Istomin, E. N. Alexandrova, E. A. Zhavrid, E. S. Voropay, M. P. Samtsov, K. N. Kaplevsky, A. P. Lugovsky, A.A. Lugovsky.** *Exp. Oncol.*, **28**, N 1 (2006) 80—82, <https://exp-oncology.com.ua/article/655/the-effect-of-hypoxia-on-photocytotoxicity-of-tics-tricarboyanine-dye-in-vitro>
- [10] **A. A. Lugovski, M. P. Samtsov, K. N. Kaplevsky, D. S. Tarasau, E. S. Voropay, P. T. Petrov, Y. P. Istomin.** *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **316** (2016) 31—36, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2015.10.008>
- [11] **J. Atchison, S. Kamila, H. Nesbitt, K. A. Logan, D. M. Nicholas, C. Fowley, J. Davis, B. Callan, A. P. McHale, J. F. Callan.** *Chem. Commun.*, **53**, N 12 (2017) 2009—2012, <https://doi.org/10.1039/C6CC09624G>
- [12] **М. П. Самцов, Е. С. Воропай, К. Н. Каплевский, Д. Г. Мельников, Л. С. Ляшенко, Ю. П. Истомин.** *Журн. прикл. спектр.*, **76**, № 4 (2009) 576—582 [**M. P. Samtsov, E. S. Voropay, K. N. Kaplevsky, D. G. Melnikau, L. S. Lyashenko, Y. P. Istomin.** *J. Appl. Spectr.*, **76**, N 4 (2009) 547—553], <https://doi.org/10.1007/s10812-009-9223-x>
- [13] **М. П. Самцов, Е. С. Воропай, Д. Г. Мельников, Л. С. Ляшенко, А. А. Луговский, Ю. П. Истомин.** *Журн. прикл. спектр.*, **77**, № 3 (2010) 438—444 [**M. P. Samtsov, E. S. Voropai, D. G. Mel'nikov, L. S. Lyashenko, A. A. Lugovskii, Y. P. Istomin.** *J. Appl. Spectr.*, **77**, N 3 (2010) 406—412], <https://doi.org/10.1007/s10812-010-9346-0>

- [14] **Н. В. Белько, М. П. Самцов, Д. С. Тарасов.** Журн. Бел. гос. ун-та. Физика, № 3 (2020) 17—23, <https://doi.org/10.33581/2520-2243-2020-3-17-23>
- [15] **М. П. Самцов, Д. С. Тарасов, А. П. Луговский, П. Т. Петров, А. О. Савин, Р. Д. Зильберман, Е. С. Воропай.** Докл. БГУИР, **18**, № 8 (2020) 5—13; <https://doi.org/10.35596/1729-7648-2020-18-8-5-13>
- [16] **U. Chilakamarthi, L. Giribabu.** Chem. Rec., **17**, N 8 (2017) 775—802, <https://doi.org/10.1002/tcr.201600121>
- [17] **N. V. Kudinova, T. T. Berezov.** Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. B: Biomed. Chem., **4**, N 1 (2010) 95—103, <https://doi.org/10.1134/S1990750810010129>
- [18] **A. Loureiro, N. G. Azoia, A. C. Gomes, A. Cavaco-Paulo.** Current Pharm. Design, **22**, N 10 (2016) 1371—1390, <https://doi.org/10.2174/1381612822666160125114900>
- [19] **H. Jeong, M. Huh, S. J. Lee, H. Koo, I. C. Kwon, S. Y. Jeong, K. Kim.** Theranostics, **1** (2011) 230—239, <https://doi.org/10.7150%2Fthno%2Fv01p0230>
- [20] **B. Bhushan, V. Khanadeev, B. Khlebtsov, N. Khlebtsov, P. Gopinath.** Adv. Coll. Interface Sci., **246** (2017) 13—39, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.06.012>
- [21] **C. Zhu, Y. Xia.** Chem. Soc. Rev., **46**, N 24 (2017) 7668—7682, <https://doi.org/10.1039/C7CS00492C>
- [22] **Н. В. Белько, И. И. Хлудеев, В. П. Зорин, М. П. Самцов.** Весті БДПУ. Сер. 3. Фізика. Математика. Інфарматика. Біологія. Геаграфія, **1** (2018) 14—20, <https://elibrary.ru/item.asp?id=37154997>
- [23] **H. Chen, A. Ji, S. Qiu, Y. Liu, Q. Zhu, L. Yin.** Food Hydrocoll., **76** (2018) 173—183, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.004>
- [24] **M. Kasran, S. W. Cui, H. D. Goff.** Food Hydrocoll., **30**, N 2 (2013) 552—558, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.08.004>
- [25] **M. Li, H. Li, P. De, B. S. Sumerlin.** Macromol. Rap. Commun., **32**, N 4 (2011) 354—359, <https://doi.org/10.1002/marc.201000619>
- [26] **S. M. Usama, C. M. Lin, K. Burgess.** Bioconjugate Chem., **29**, N 11 (2018) 3886—3895, <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00708>
- [27] **K. Manokruang, J. S. Lym, D. S. Lee.** Mater. Lett., **124** (2014) 105—109, <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.03.052>
- [28] **K. Wilson, J. Walker.** Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology, Cambridge University Press (2018) 219—252
- [29] **W. F. Patton.** Electrophoresis: An Int. J., **21**, N 6 (2000) 1123—1144, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000401\)21:6%3C1123::AID-ELPS1123%3E3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:6%3C1123::AID-ELPS1123%3E3.0.CO;2-E)
- [30] **L. Gao, R. T. Smith.** J. Biophoton., **8**, N 6 (2015) 441—456, <https://doi.org/10.1002/jbio.201400051>
- [31] **М. П. Самцов, А. Е. Радько, К. Н. Каплевский, К. А. Шевченко.** Квантовая электроника: материалы V междунар. науч.-техн. конф., Минск, 22—25 ноября 2004 г., Минск, БГУ (2004) 20—24
- [32] **U. K. Laemmli.** Nature, **227**, N 5259 (1970) 680—685
- [33] **B. D. Hames.** Gel Electrophoresis of Proteins: Practical Approach, OUP Oxford (1998) 1—352
- [34] **S. F. S. Groth, R. G. Webster, A. Datyner.** Biochim. Biophys. Acta, **71** (1963) 377—391, [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(63\)91092-8](https://doi.org/10.1016/0006-3002(63)91092-8)
- [35] **S. Luo, N. B. Wehr, R. L. Levine.** Anal. Biochem., **350**, N 2 (2006) 233—238, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.10.048>
- [36] **Н. В. Белько, М. П. Самцов, А. П. Луговский.** Журн. Бел. гос. ун-та. Физика, **2** (2020) 19—27, <https://doi.org/10.33581/2520-2243-2020-2-19-27>
- [37] **Д. С. Тарасов, К. Н. Каплевский, М. П. Самцов, Е. С. Воропай.** Вестн. БГУ, Сер. 1, № 2 (2015) 8—12