

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧЕРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ ИМ. Н. М. ЭМАНУЭЛЯ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

---

На правах рукописи

КОСТЮКОВ АЛЕКСЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**ФОТОХИМИЯ ГЕПТАМЕТИНОВЫХ ЦИАНИНОВЫХ,  
ТРИМЕТИНОВЫХ БИСЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ И ИХ  
КОМПЛЕКСОВ С БИОМАКРОМОЛЕКУЛАМИ**

Специальность 02.00.04 физическая химия

**Диссертация**

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

Доктор химических наук, профессор

Кузьмин Владимир Александрович

Москва 2020

## Оглавление

<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>3</b>
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>11</b>
1.1. ПОЛИМЕТИНОВЫЕ КРАСИТЕЛИ .....	11
ФОТОНИКА ЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ.....	14
ФОТОИЗОМЕРИЗАЦИЯ.....	15
ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ.....	16
ДОСТАВКА ФОТОСЕНСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В ФДТ .....	20
АЛЬБУМИН .....	22
ДНК .....	22
ПРОЦЕССЫ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ С ДНК .....	23
МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ .....	24
1.2. СТРОЕНИЕ ЦК .....	25
ПРИМЕНЕНИЕ ЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ.....	27
ТРИКАРБОЦИАНИНОВЫЕ КРАСИТЕЛИ .....	29
БИСКАРБОЦИАНИНОВЫЕ КРАСИТЕЛИ .....	33
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>36</b>
2.1. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, ПРИМЕНЕННЫЕ В РАБОТЕ.....	36
2.2. МЕТОД ИМПУЛЬСНОГО ФОТОЛИЗА .....	39
2.3. МЕТОДИКИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ.....	42
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>44</b>
3.1. СПЕКТРАЛЬНО-КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЕПТАМЕТИНОВЫХ ЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ И ИХ НЕКОВАЛЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ С ЧСА. ....	45
3.2. КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ БКЦ1 С АЛЬБУМИНОМ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА .....	50
3.3. СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БКЦ4.....	55
3.4. ФОТОХИМИЯ ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ ИКЦ1-3.....	87
3.5. ФОТОХИМИЯ ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ БКЦ1.....	93
3.6. ФОТОХИМИЯ ТРИПЛЕТНЫХ СОСТОЯНИЙ БКЦ4. ....	107
3.8. ФОТОЦИТОТОКСИЧНОСТЬ БКЦ1 .....	111
3.9. НАКОПЛЕНИЕ БКЦ1 И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ. ....	113
3.10. НАКОПЛЕНИЕ БКЦ4 И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ. ....	116
<b>ВЫВОДЫ: .....</b>	<b>120</b>
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ: .....	122
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ. ....</b>	<b>123</b>

## Введение

Цианиновые красители (ЦК) являются органическими соединениями, содержащими поливиниленовый фрагмент между атомами азота с делокализованным зарядом [1]. Первый представитель данного семейства метиновых красителей цианин был синтезирован в 1856 г. Ч. Вильямсом. В дальнейшем цианин стал одним из первых красителей, у которого была обнаружена фотосенсибилизирующая активность. Он был способен сенсибилизировать в диапазоне 580-610 нм. Это открытие привело к интенсивному развитию химии и практического применения ЦК. Способность ЦК к фотосенсибилизации в галид-серебряной фотографии стала их ключевой особенностью, определившей развитие ИК-съемки в начале и середине 20 века. Во второй половине 20 века красители нашли применение в качестве активных и пассивных сред в лазерах и оптических системах хранения и передачи информации. В дальнейшем, благодаря исключительным по своей высоте показателям молярной экстинкции, интенсивной флуоресценции и хорошей светостойкости ЦК стали применяться в флуоресцентных методах анализов. Особенность структуры и разнообразие возможности химической модификации структуры позволяют создавать флуоресцентные метки на основе ЦК. ЦК обладают узкими полосами поглощения и флуоресценции, а варьирование длины полиметиновой цепи и заместителей в структуре позволяет изменять оптические свойства ЦК.

Анализ литературы за последние 10-15 лет показывает, что интерес к классу карбоцианиновых красителей различных структурных типов неуклонно возрастает. Особое внимание ведущими исследовательскими школами уделяется ЦК, которые могут представлять интерес для биологических и медицинских целей как биомаркеры [2]. Флуоресцентное маркирование, как неинвазивный метод диагностики, является относительно новым методом и находит все более широкое применение в медицинской практике наряду с традиционным радиоизотопным маркированием *in vitro* и *in vivo* [3–7]. Флуоресцентные метки успешно применяются в медицине и при анализе последовательности

нуклеиновых кислот [2]. Наибольшую эффективность в медицинском применении имеют флуорофоры, генерирующие сигнал в ближней-ИК области благодаря высокому соотношению сигнал-шум [8].

ЦК обладают высокой величиной квантового выход флуоресценции и имеют высокое сродство к биомакромолекулам, таким как клеточные мембраны, белки и ДНК [9].

Комплексообразование ЦК с биомакромолекулами находится в центре внимания, поскольку является ключевым моментом доставки флуорофора к мишени [10]. При образовании комплекса происходит существенное изменение оптических свойств основных и возбужденных состояний [11]. Влияние комплексообразования можно оценить по понижению вероятности перехода из синглетно-возбужденного состояния путем колебательной релаксации [12]. Для комплекса ЦК-биополимер характерными является образование пространственно-заторможенной конформации с возрастающими выходами флуоресценции и интеркомбинационной конверсии. Нековалентное связывание с биополимером существенно увеличивает вероятность протекания химической реакции между компонентами комплекса по сравнению с раствором [13].

Научный интерес к фотохимии цианиновых красителей связан с их способностью участвовать в реакциях фотопереноса электрона и образовывать активные формы кислорода в клетках по механизму ФДТ1 [8]. Тем самым позволяя провести анализ корреляции структура-свойства для решения проблемы подбора оптимальной структуры фотосенсибилизатора для медицинского применения [8]. Реакция фотолиза цианиновых красителей при взаимодействии с донорами электронов является одной из немногих, где образование промежуточной частицы можно зафиксировать как в растворах органических растворителей с донорами электрона, стабильными радикалами, так и в комплексе с биополимерами [14].

### **Цель исследования**

Физико-химическими оптическими методами определить основные закономерности взаимодействия красителей ближнего ИК-диапазона с

биомакромолекулами, охарактеризовать механизмы действия фотосенсибилизаторов на основе красителей с сопряженными хромофорными системами, а также дать оценку возможности применения новых реагентов для оптической медицинской визуализации на основе цианиновых красителей ближнего ИК-диапазона.

### **Задачи исследования**

Для выполнения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

- методами спектрофотометрии и спектрофлуориметрии охарактеризовать механизмы процесса комплексообразования с биомакромолекулами на примере гептаметиновых цианиновых и бискарбоцианиновых красителей;
- определить влияние заместителей в молекулах гептаметиновых цианиновых и бискарбоцианиновых красителей на процессы связывания с альбумином;
- определить состав комплекса, образующегося при связывании красителя с ЧСА;
- импульсными методами охарактеризовать спектрально-кинетические характеристики короткоживущих промежуточных частиц, анион-радикалов ЦК, образующихся при фотолизе ЦК в различных растворителях;

**Объектом** исследования являлись индотрикарбоцианиновые и бискарбоцианиновые красители и их комплексы с биомакромолекулами.

**Предмет исследований:** спектрально-кинетические характеристики возбужденных состояний цианиновых красителей в органических растворителях и их комплексов с биомакромолекулами в водной фазе.

**Научная новизна работы:** в рамках диссертационной работы были установлены спектрально-кинетические характеристики серии новых индокарбоцианиновых красителей. Показана их способность связываться с

биомакромолекулами, по изменениям спектров поглощения и флуоресценции рассчитаны значения констант связывания. Флуориметрически показана высокая эффективность накопления исследуемых соединений в клетках аденокарциномы. При выполнении работы показана эффективность применения бискарбоциановых красителей для фотодинамической терапии. Методом импульсного фотолиза зарегистрировано триплетное состояние молекул водорастворимых индокарбоцианиновых бискрасителей при прямом фотовозбуждении с биополимерами. На основе полученных результатов о фотоактивности бискарбоцианиновых красителей предложен фотосенсибилизатор для фотодинамической терапии, включающий нековалентный конъюгат бискрасителя и химерного белка, характеризующегося аминокислотной последовательностью рецептор-связывающего домена альфа-фетопротейна человека. Получен патент на изобретение RU2638131C1 «Фотосенсибилизатор на основе карбоцианинового красителя для фотодинамической терапии опухолей». Показано фотодинамическое воздействие бискарбоцианиновых красителей на раковые клетки серии НСТ116.

#### **На защиту выносятся следующие положения**

- Гептаметиновые цианиновые красители связываются с гидрофобным участком между сайтами связывания альбумина;
- Комплексообразование ЦК с альбумином приводит к образованию двух видов комплекса. БКЦ связываются с химерными белками, которые являются эффективными доставщиками;
- Изменение типа комплекса БКЦ и альбумина не зависит от концентрации белка и является реакцией первого порядка;
- Комплексообразование с биомакромолекулами увеличивает жесткость структуры молекулы и уменьшает вклад безызлучательных переходов в деградации энергии синглетно-возбужденного состояния;
- При помощи молекулярного докинга и молекулярной динамики произведен анализ расположения молекулы красителя в центре связывания;

- Процесс фотоизомеризации молекулы красителя конкурирует с интеркомбинационной конверсией и определяет квантовый выход триплетного состояния;
- Близость молекулы красителя к центру связывания альбумина оказывает существенное влияние на процесс фотопереноса электрона с участием триплетных состояний от ароматических аминокислот белка к молекуле красителя;
- Доставка ЦК в клетки осуществляется в виде комплекса ЦК-альбумин, что предотвращает нежелательный процесс агрегации красителя;
- Введение в молекулу красителя этоксигрупп приводит к росту величины константы связывания;

### **Апробация работы**

Результаты работы были представлены на: «Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты»: Конференция молодых ученых и VIII школа им. Н.М. Эмануэля (Москва), Москва, Россия, 28-30 ноября 2019; Пятый междисциплинарный научный форум с международным участием «Новые материалы и перспективные технологии», Москва, Россия, 30 октября - 1 ноября 2019; XXXI Симпозиум Современная химическая физика, Туапсе, Россия, 16-25 сентября 2019; 17th International Congress on Photobiology, Испания, 26-30 августа 2019; 4th Russian Conference on Medicinal Chemistry MedChem Russia 2019, Екатеринбург, Россия, 10-14 июня 2019; 4-ая Российская конференция по медицинской химии (МедХим-2019) с международным участием Екатеринбург, 9-14.06.2019, Екатеринбург, Россия, Четвертый междисциплинарный научный форум с международным участием "новые материалы и перспективные технологии" (Москва, Россия, 27-30 ноября 2018), XVII Ежегодная молодежная конференция с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы "БИОХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА", ИБХФ РАН, (Москва, Россия, 13-15 ноября 2018), XXX Симпозиум Современная химическая физика (г. Туапсе, Россия, 16-27 сентября 2018), V Всероссийская конференция с международным участием по

органической химии, (Владикавказ, Россия, 10-14 сентября 2018), International Symposium on Photochemistry (Дублин, Ирландия, 9-13 июля 2018), XXII Всероссийский симпозиум молодых ученых по химической кинетике 2016, Международная конференция по фотохимии СЕСР (Австрия 2016), II Всероссийская Конференция по молекулярной онкологии 2016.

### **Связь работы с научными программами и проектами**

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ, Соглашение № 14.613.21.0042 (11 ноября, 2015), уникальный код RFMEFI61315X0042, Российского научного фонда по проекту № 18-13-00463 «Механизмы фотохимических процессов в комплексах полиметиновых красителей с двумя сопряженными хромофорами и белков», Российского фонда фундаментальных исследований по проекту № 18-33-01112 «Спектрально-кинетические характеристики комплексов полиметиновых красителей, содержащих две хромофорные системы с биомакромолекулами».

### **Публикации**

Материалы диссертационной работы опубликованы в 9 статьях в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК, 10 тезисах докладов на конференциях и симпозиумах.

### **Степень достоверности полученных результатов**

Достоверность результатов обусловлена использованием прямой регистрацией сигналов в кинетических методах исследований. Корректность применяемой методики работы для используемых физикохимических и оптических методов исследования подтверждает достоверность результатов благодаря применению современной регистрирующей аппаратуры: использования для регистрации осциллографов с разрешающей способностью до  $6 \times 10^{11}$  точек в секунду, флуоресцентных детекторов для счета единичных фотонов с 4 пс разрешением. Полученные результаты использовали для



оптимизации модели, которая была получена по данным моделирования вычислительными методами. Данный подход позволил добиться высокой достоверности предлагаемой модели, расхождение результатов с которой не превышает 15%. При анализе полученных данных руководствовались оценкой вероятности ошибок первого и второго рода, используя положительный и отрицательный контроль в граничных условиях метода.

### **Структура и объем работ**

Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка используемых сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 148 источников. Диссертация иллюстрирована 9 таблицами, 52 рисунками, объем 139 страниц печатного текста.

### **Личный вклад автора**

Диссертантом проведен обширный литературный поиск, позволивший произвести постановку задач. Диссертантом выполнен весь объем физико-химических исследований, полностью проанализирован весь массив полученных данных по физико-химическому анализу и компьютерному моделированию, сформулированы положения, выносимые на защиту и выводы. Полученные научные результаты представлены на международных и всероссийских конференциях, диссертантом подготовлены и опубликованы статьи в реферируемых журналах. Моделирование комплексообразования методом молекулярного докинга проводили в системе AutoDock Vina 1.1.2, UCSF Chimera 1.10.2 и Sybyl-X 2.1 совместно с сотрудниками химического факультета МГУ В.А. Палюлин, Е.В. Радченко, М.Г. Местергази. Клеточные тесты и конфокальная микроскопия действия фотосенсибилизаторов выполнялись совместно с сотрудниками ФГБУН Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН А.В. Шибяевой, А.Ш. Радченко.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Впервые было охарактеризовано влияние комплексообразования бискарбоцианиновых красителей с биомакромолекулами на процесс быстрого фотопереноса электрона. Была охарактеризована модельная система реакции переноса электрона и доказана ее эффективность по образованию полувосстановленной формы красителя. Предложенный механизм переноса электрона от донора был отработан в экспериментах по импульсному фотолизу комплекса красителя с белком. Было продемонстрировано, что после образования переноса электрона от донора (ароматический амин, аскорбиновая кислота, стабильный радикал) к акцептору (красителю) происходит образование долгоживущей активной частицы, способной в живой клетке генерировать супероксид анион радикал.

В рамках работы описаны механизмы действия фотосенсибилизаторов на основе бискарбоцианиновых красителей на модельной линии клеток НСТ116. Установлено что липофильность и положительный заряд красителя увеличивают константу связывания. Продемонстрирована фототоксичность исследованного бискарбоцианинового красителя.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1. Полиметиновые красители

Полиметиновые красители являются обширным классом органических соединений, включающим в себя соединения, обладающие высокой экстинкцией в диапазоне от 190 до 1600 нм [15]. Цианиновые красители являются частным случаем полиметиновых красителей, в которых происходит осцилляция заряда между гетероциклическими фрагментами [16].

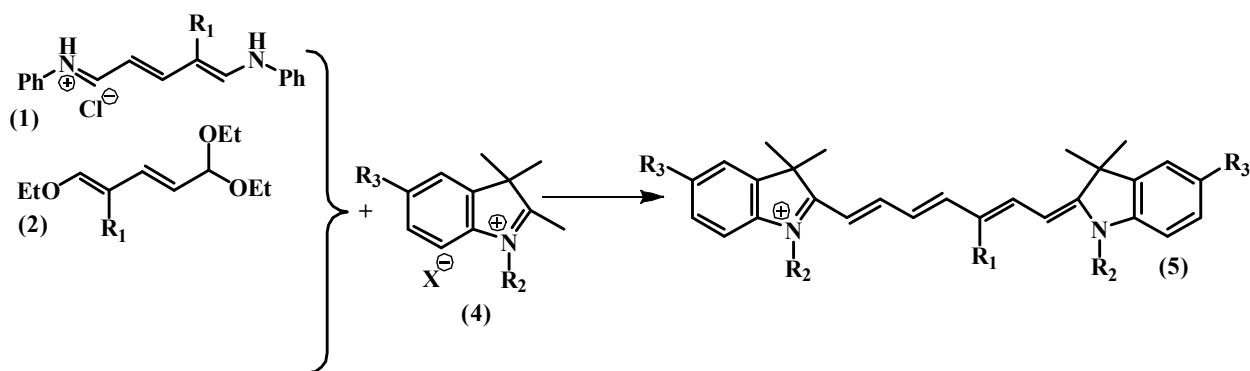
Классический подход к синтезу индоцианиновых красителей основан на взаимодействии содержащих активные метильные группы гетероциклических фрагментов (индоленинов, тиазолов) с полиметиновыми соединениями, содержащими активные заместители на концах цепи. Варьирование индоленинов позволяет синтезировать как симметричные, так и ассиметричные красители.

Индоленины являются высокоактивными соединениями, при получении которых используются различные подходы: синтез по методу Бишлера [17], Рейсера и Фишера, отдавая предпочтение синтезу Фишера [18]. Вводящийся в реакцию гидрозон обычно синтезируют конденсацией соответствующего гидразина с изопропилметилкетонем [19]. Полученные кватернизованные индоленины не подвергают хроматографической очистке ввиду их реакционной способности и неустойчивости, выделение производят методом осаждения.

Важно отметить, что условия конденсации напрямую соотносятся с кислотностью индоленинов, чем она ниже, тем более сильное основание необходимо использовать. Наиболее часто используемые синтоны для образования полиметиновой цепи: дианилы малонового\глутаконового альдегида, реже ацетали малонового\глутаконового диальдегида. Диэтилацтали получают взаимодействием этилового спирта с альдегидом в присутствии хлорида кальция. В дальнейшем получают винил-этиловые эфиры взаимодействием толуолсульфокислоты и хинолина. Полученные эфиры выделяют методом простой перегонки. Дианилы малонового диальдегида получают в виде желтых кристаллов методом переосаждения из спиртов [20].

Для синтеза замещенных дикарбоцианиновых красителей в качестве источников внешней полиметиновой цепи, вступающих в конденсацию с соответствующими четвертичными солями гетероциклических оснований, используются производные малонового альдегида ацетали и дифенилимины (дианилы) (1–2) (Схема 1). В качестве соединений, формирующих полиметиновую цепь карбоцианиновых красителей, обычно используют ортоэфир муравьиной кислоты или дифенилформамидин.

Соли дианилов малонового альдегида (1) одни из наиболее устойчивых его производных, они легче получают, чем другие производные, и поэтому находят наиболее широкое применение при синтезе цианиновых красителей [21].



**Схема 1 - Синтез замещенных карбоцианиновых красителей.**

Подходы к синтезу цианиновых красителей существенно варьируются в зависимости от выбранных синтонов. Псевдоцианины получают путем взаимодействия двух гетероциклов, один из которых содержит метильную группу по второму положению, а второй легко уходящую группу. Таким образом ввиду присутствия исходного синтона в кватернизованных солях индолениния, необходимо учитывать вероятное образование некоторого количества норцианинов при синтезе. Высокая реакционная способность существенно осложняет процесс очистки промежуточных продуктов. Образовавшиеся побочные продукты в реакционной смеси делают необходимо использование комбинации различных подходов к выделению красителей. ЦК являются труднодоступными соединениями в первую очередь из-за сложности выделения и очистки. Для разделения гидрофобных соединений чаще всего

применяется колоночная или препаративная хроматография на прямой фазе (обращенная фаза применяется для разделения водорастворимых соединений). Ввиду наличия делокализованного положительного заряда полиметиновой цепи, введение дополнительных заряженных функциональных групп позволяет производить разделение при помощи ионообменной хроматографии (например, применяя аминированную целлюлозу). Использование различных подходов к разделению позволяет варьировать последовательность выделяемых фракций, тем самым добиваться флуоресцентной чистоты индивидуальных соединений.

ЦК активно применяются в промышленности, науке, медицине технике как сенсоры, сенсibilизаторы, флуоресцентные маркеры для ПЦР и ангиографии, рабочие тела для лазеров. Красители обладают уникальными спектральными свойствами благодаря  $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходам, что проявляется в чрезвычайно интенсивных и узких полосах поглощения и флуоресценции [22].

Первоначально ЦК применялись как сенсibilизаторы в кинофотоматериалах для создания фотоснимков в ИК-диапазоне методом традиционной галид-серебряной фотографии. Впоследствии в ходе развития новых областей науки и техники ЦК находили широкое применение в качестве носителей для оптических методов хранения информации [23,24].

Передовым направлением практического приложения цианиновых красителей в настоящее время является использование красителей в качестве сенсоров для идентификации биомакромолекул в биологии и в медицине. Это обусловлено высокими коэффициентами молярной экстинкции и высоким квантовым выходом флуоресценции в видимой и ближней ИК-области. Способность связываться с нуклеиновыми кислотами основано на эффектах залегания и интеркаляции ЦК между парами основания [25]. Комплексообразование с основным (но не единственным) транспортным белком крови альбумином основано на гидрофобных и зарядовых взаимодействиях и проявляется в сильном изменении спектрально-люминесцентных характеристик красителей. При комплексообразовании с молекулами белков и

нуклеиновых кислот происходит стабилизация структуры красителя (т.н. формирование «замороженной структуры»), приводящее к увеличению квантового выхода флуоресценции, усилению полос поглощения, является основой для практического применения ЦК.

### **Фотоника цианиновых красителей**

Цианиновые красители обладают выдающимися характеристиками, узкая спектральная полоса возбуждения позволяет проводить селективное фотовозбуждение красителей, даже находящихся в растворе с другими органическими молекулами, дополнительно возможность химической модификации структуры позволяет подстроить полосу возбуждения под имеющийся источник излучения в случае необходимости [26]. Введение различных циклических заместителей в полиметиновую цепь уменьшает внутримолекулярную конверсию за счет торможения процессов изомеризации, удлинение полиметиновой цепи на каждый виниленовый фрагмент позволяет сместить максимум поглощения на 100 нм, а введение различных, обладающих электронно-донорным или электронно-акцепторным эффектом групп в полиметиновую цепь гетероциклический фрагмент позволяет сдвинуть полосу поглощения на 15-30 нм. В то же время их введение может вызывать значительно снижение молекулярной экстинкции.

Важной характеристикой красителей является их флуоресценция, процесс происходящий, когда после прекращения действия возбуждающих лучей происходит переход молекулы из возбужденного состояния в основное без изменения спина электрона, сопровождающееся испусканием кванта света [27]. Соотношение числа испущенных квантов света к поглощенным называют квантовым выходом флуоресценции. Наиболее информативным инструментом для характеристики флуоресценции является спектр флуоресценции, показывающий интенсивность полос и их положение, поскольку энергия поглощённого света растрачивается на тепловые колебания: интенсивность квантов света флуоресценции обычно ниже, когда спектр смещен правее

возбуждающего света, говорят о том, что выполняется закон Стокса [28]. Следующей по важности характеристикой является спектр возбуждения, показывающий распределение количества испущенных квантов света в зависимости от длины волны возбуждающего света. Флуоресценция является существенно более чувствительным методом анализа, нежели измерения по изменению оптической плотности раствора, в то же время флуоресценция существенно зависит от таких параметров как температура, вязкость раствора, его рН и ионная сила.

Основными по важности характеристиками флуоресценции являются квантовый ( $\phi$  - отношение числа испущенных квантов к числу поглощенных) и энергетический ( $\eta$  - отношение энергий флуоресценции к поглощенной энергии возбуждения) выходы, время жизни флуоресценции, которое можно оценить по формуле Ферстера из данных по поглощению. Для иммобилизованных в матрицах молекул красителей это время было оценено при помощи импульсного флуориметра и совпадает с предсказанным 2-4 нсек [12], [29].

При изучении фотоники цианиновых красителей важно иметь представления о механизмах деградации энергии электронного возбуждения и связь квантовых выходов различных процессов со строением красителей. К основным процессам деградации энергии для молекул полиметиновых красителей относятся: флуоресценция, интеркомбинационная конверсия, фотоизомеризация и внутренняя конверсия без изменения конфигурации молекулы.

### **Фотоизомеризация**

Данный процесс протекает на первом синглетном возбужденном уровне и является важным механизмом деградации энергии электронного возбуждения [30]. Наличие полиметиновой цепи в красителях обуславливает возможность процесса фотоизомеризации у этих соединений, что делает необходимым учитывать кроме системы уровней исходного изомера, систему уровней фотоизомера [31]. Константа скорости гибели короткоживущих изомеров

зависит от распределения электронной плотности в полиметиновой цепи [32]. В то же время введение циклических и гетероциклических фрагментов в полиметиновую цепочку и иные стерические препятствия, как например заместители в хромофорную систему позволяет увеличить жесткость молекулы и тем самым сделать затрудненным или невозможным реализацию процесса фотоизомеризации, также это повышает величину выхода флуоресценции, интеркомбинационной конверсии и увеличивает фотостабильность красителей [33]. Если поворот молекул красителя осуществляется на меньший угол, это приводит к сокращению времени жизни фотоизомера на порядок и уменьшению энергии активации фотоизомера [34]. Введение электронодонорных заместителей в полиметиновую цепь приводит к увеличению электронной энергии связи, вокруг которой происходит вращение. Аналогично при введении электроноакцепторных заместителей происходит противоположный эффект [35]. Время жизни фотоизомеров прямо пропорционально зависит от вязкости растворителя, что одновременно приводит к росту флуоресценции в более вязких растворах. При увеличении стерических препятствий в красителях, уменьшается угол поворота в фотоизомере, увеличивается константа скорости и уменьшается энергия активации процесса релаксации фотоизомера, также снижается время жизни фотоизомера [36]. При этом сохраняется неизменность суммы квантовых выходов флуоресценции, фотоизомеризации и интеркомбинационной конверсии [37]. Характерные времена жизни для образующиеся в результате фототрансформации изомеров цианиновых красителей в органических растворителях обычно регистрируются в пределах  $10^{-1}$ - $10^{-3}$  сек [38].

### **Фотодинамическая терапия**

В современной медицине широкое распространение получили методы фотохимиотерапии (ФХТ) и фотодинамической терапии (ФДТ), основанные на сочетанном воздействии фотосенсибилизирующих препаратов и излучения оптического спектра. ФДТ является методом лечения заболеваний кожи, ряда онкологических заболеваний, основанный на применении фотоактивных



соединений (фотосенсибилизаторов), воздействуя светом на предварительно введенные в клетку вещества, выработки активных форм кислорода с высоким выходом [39]. Тем самым достигается разрушение клеток патологического процесса [40].

ФДТ является эффективным и малотравматичным методом лечения онкологических заболеваний (немеланомный рак кожи и пр.) на ранних стадиях заболевания. Благодаря направленному действию ФДТ достигается высокой эффективности в удалении локализованных опухолей небольшого размера. Благодаря тому, что действие ФС вызывает гибель клеток по механизму апоптоза достигается заживление без больших объемов фиброзной ткани [41].

Первым этапом ФДТ является доставка фотосенсибилизатора к пораженному участку ткани. При доставке происходит образование комплекса с белками и липопротеинами в кровяном русле [42]. Из-за повышенного метаболизма раковых клеток происходит накопление ФС [43]. Производят облучение пораженных тканей. Длина волны облучающего света должна быть близка к полосе поглощения ФС. Под действием света происходит образование активных частиц (супероксид анион, синглетный кислород, радикалы красителя). На следующей стадии происходит серия темновых процессов, приводящих к гибели клеток по механизмам некроза и апоптоза.

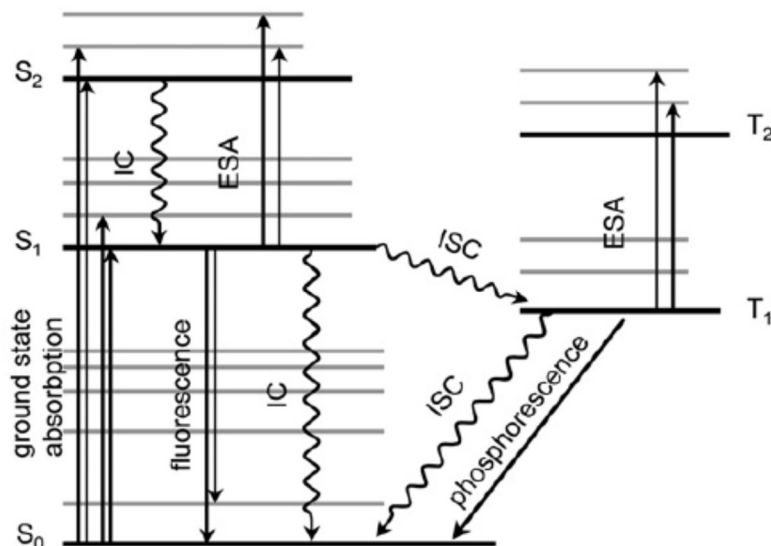
ФДТ подразделяется на несколько типов [44]:

Тип 1. Перенос электрона от донора на молекулу фотосенсибилизатора в триплетном состоянии, с образованием анион-радикала красителя.

Тип 2. Взаимодействие триплета фотосенсибилизатора с молекулой кислорода приводит к образованию синглетного кислорода.

В основе ФДТ лежит реакционная способность возбужденных состояний ФС. Время жизни синглетно-возбужденного состояния является столь малым (порядка нескольких наносекунд), что вероятность протекания химической реакции с его участием невелика. Однако триплетное состояние, в которое происходит переход из синглетно-возбужденного посредством

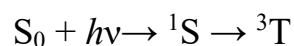
интеркомбинационной конверсии обладает существенно большим временем жизни (для цианиновых красителей до нескольких мс) (См. рисунок 1. [45]).



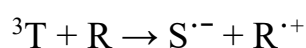
**Рисунок 1 - Диаграмма Яблонского. На рисунке обозначены: \$S\_0\$ основное состояние молекулы, \$S\_1\$, \$S\_2\$ возбужденные состояния, \$T\_1\$, \$T\_2\$ триплетные состояния молекулы. Сплошные стрелки -поглощательные и излучательные переходы, волнистые стрелки безызлучательные переходы.**

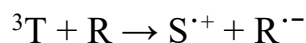
Органические красители участвуют в реакциях переноса протона или электрона и обладают способностью к образованию активных радикальных частиц. Данный механизм определен как 1-й тип ФДТ.

На первом этапе после поглощения кванта света происходит переход из основного синглетного состояния в синглетно-возбужденное, а затем посредством интеркомбинационной конверсии переход в триплетное состояние:

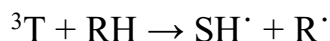
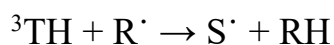


Далее происходит перенос электрона от тушителя, которыми являются ароматический амин в модельных экспериментах или ароматическая аминокислота в альбумине.

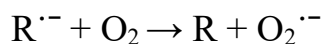




Также допустима реакция переноса протона:

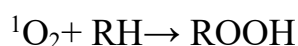
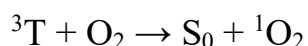
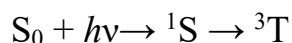


Образующиеся радикальные частицы могут инициировать перекисное окисление липидов, приводящее к цепному окислению в мембранном бислое. Более важным процессом по сравнению с образованием пероксидных радикалов является образование супероксид-аниона, гидроксильного радикала и др. активных форм кислорода. Кроме того, участвуя в реакции переноса электрона ФС способен к образованию супероксид-анион радикала и других долгоживущих радикалов.



Образующиеся промежуточные частицы обладают большим временем жизни и способны к дальнейшему химическому превращению. Результатов взаимодействия высокореактивных продуктов с клеточными структурами является возникновение окислительного стресса, повреждающего биоструктуры. Одной из основных мишеней фотосенсибилизаторов являются липиды биологических мембран. Взаимодействуя с ними ФС образуют радикалы липидов, алкоксильные радикалы, перекисные радикалы и гидропероксиды липидов [41]. Данные активные частицы запускают каскад радикальных процессов, способных вызывать гибель клетки по механизмам некроза и апоптоза. В то же время можно считать, что синглетный кислород не вносит основную роль в фотодинамический эффект напрямую, поскольку пробег частицы составляет порядка 10 нм [46].

Например, из-за процесса переноса энергии от триплетного состояния молекулы фотосенсибилизатора на молекулу кислорода происходит образование высоко реакционноспособной частицы: синглетного кислорода. Синглетный кислород способен к дальнейшему окислению большого числа молекул. Подобный процесс относят к ФДТ 2-го типа.



Возникающий под действием синглетного кислорода окислительный стресс часто приводит к кроссшивкам и одностранным разрывам ДНК, что является фактором риска для медицинского применения ФС. Повреждение ядерных структур, особенно во время митоза, может оказывать онкогенный эффект в долгосрочной перспективе.

К фотосенсибилизаторам предъявляются следующие требования[47]:

1. Индивидуальное вещество, не содержащее сопутствующих соединений, продуктов развала или синтеза.
2. Минимальная темновая токсичность, отсутствие мутагенности
3. Способность к сенсibilизации красного света
4. Высокая квантовая эффективность образования триплетного состояния
5. Отсутствие образования побочных фотохимических продуктов
6. Высокое сродство к биомолекулам
7. Быстрое и эффективное накопление в тканях патологического процесса
8. Быстрое выведение из организма после применения

### **Доставка фотосенсибилизаторов в ФДТ**

Фармакокинетика процесса доставки ФС в клетки определяется большим числом факторов, связанных с природой опухолевого процесса и физико-химическими свойствами молекулы ФС. Гидрофильные ФС лучше растворяются

в кровотоке, но обладают меньшими способностями к накоплению в раковых клетках. Необходимо принимать во внимание влияние фактора времени на накопление и выведение фотосенсибилизатора из организма.

Образование комплексов с белками крови является основным механизмом транспорта фотосенсибилизаторов. Раковые клетки ввиду повышенного метаболизма эффективнее накапливают фотосенсибилизатор. Основным доставщиком фотосенсибилизаторов являются альбумин (ЧСА) и липопротеины низкой плотности (ЛПНП). Процесс вхождения и распределения ФС в клеточной структуре определяется структурными особенностями и физико-химическими свойствами молекулы.

В доставке фотосенсибилизатора в клетки в фотодинамической терапии происходит с участием комплексов молекул красителей с белками крови и в результате в раковых клетках, в силу повышенного метаболизма, происходит накопление фотосенсибилизатора.

Для гидрофильных молекул основным переносчиком является альбумин. Основным транспортом для гидрофобных молекул являются липопротеины низкой плотности [48]. Особенностью ЛПНП является транспорт молекул напрямую в эндосомы клеток.

Одним из важнейших условий фотоэффекта применяемых фотосенсибилизаторов является количество квантов света, участвующих в фотохимической стадии ФДТ. Глубина прохождения света в ткани не превышает нескольких миллиметров (до 1 см). Ткани пропускают исключительно свет красного диапазона от 600 до 800 нм, что ограничено поглощением гема крови в коротковолновой области и низкой энергичностью облучения, а также обертонами воды в длинноволновой. Необходимо принимать во внимание темновую токсичность ФС, скорость накопления ФС в клетках и скорость обратного транспорта. Также учитывать отличающийся рН раковых клеток, их гипоксированность из-за повышенного метаболизма, а также большое межклеточное пространство.

## Альбумин

Альбумин представляют собой водорастворимый белок, примерная масса которого составляет 65 кДа [49]. Сывороточный альбумин составляет порядка 60% от доли всех белков, содержащихся крови [50]. Поскольку общая площадь поверхности сывороточного альбумина очень велика, он хорошо подходит для переноса многих веществ по руслу кровотока, которые не растворяются в воде. Молекула ЧСА является ассиметричным вытянутым (140 на 40 Å) эллипсоидом при рН 5-7. Альбумин обладает высокой растворимостью за счет присутствия на его поверхности большого числа ионизированных групп [51]. При физиологических значениях рН альбумин обладает небольшим отрицательным зарядом. ЧСА представляет собой полипептид, содержащий 585 аминокислотных остатков. Конформация ЧСА стабилизирована 17 дисульфидными мостиками и быть разделена на 3 домена, каждый из которых в свою очередь подразделен на 2 субдомена [52]. ЧСА может ограниченно изменять свою конформацию благодаря возможности перестройки соединений доменов, варьировании геометрии спиралей при взаимодействии с лигандами. Наличие нескольких сайтов связывания оказывает существенное влияние на процесс взаимодействия с различными лигандами. Таким образом несколько молекул могут неспецифически связываться с альбумином одновременно. ЧСА насчитывает 6 сайтов связывания из которых II является наименее специфическим, III и VI преимущественно имеют сродство к ароматическим лигандам, (I, IV и V) являются высоко специфическими сайтами связывания (ионы переходных металлов, гемин). При медицинском применении соединения необходимо обеспечить доставку к месту протекания патологического процесса. После введения лекарственного препарата в кровь происходит комплексообразование с белками крови. Связывание с альбумином играет ключевую роль в биологическом применении лекарственного препарата.

## ДНК

ДНК представляет собою биополимер, выполняющий функции хранения и передачи генетической информации в состав, которых входит: азотистое

основание (пиримидиновые основания: тимин (Т) и цитозин (С), пуриновые основания: аденин(А) гуанин (G), сахарный остаток (дезоксирибоза) и фосфатный фрагмент. К 5`-остатку дезоксирибозы подходит фосфатный остаток, а к 3`-остатку азотистое основание [53]. Поскольку ДНК выполняет в основном функцию по хранению, транскрипции и трансляции информации о последовательности аминокислот в белках - последовательность нуклеотидов не является фиксированной [54]. Нуклеотиды формируют структуру, имеющую преимущественно отрицательным зарядом и обладающей сходством с двойной спиралью (в соответствии с моделью Уотсона и Крика) благодаря возникающим водородным связям между парами оснований А-Т, G-С.

### **Процессы комплексообразования с ДНК**

При изучении структуры полнодуплексной ДНК было отмечено три типа конформации в зависимости от ионной силы раствора ввиду дополнительной стабилизации водородными связями (А (правая спираль 10 пар на виток), В (левая спираль 10 пар на виток), Z (левая спираль 12 пар на виток)). Принято считать, что В-ДНК является наиболее распространенной конформацией, поскольку в таком виде она встречается в живых организмах. В двойной спирали различают две бороздки (большую 22 Å и малую 12 Å). Белки, обладающие большой альфа-спиралью, присоединяются к определенным последовательностям в двуцепочечной ДНК, обычно взаимодействуют с фрагментами, которые наиболее доступны: фрагменты оснований в большой бороздке [55]. Таким образом существует несколько способов которыми молекула может формировать комплекс с ДНК: залегать в бороздку или интеркалировать между парами оснований [56]. Последнее явление наблюдается только если геометрические параметры и химическая природа позволяет поместиться между парами оснований ДНК (для упрощения плоские и вытянутые молекулы) [57]. Способность интеркалировать является ключевой особенностью применяемых ДНК-антибиотиков (например доксорубицин) [58]. Поэтому создание препаратов-доставщиков, способных к переносу

лекарственных средств к раковым клеткам позволит повысить специфичность лекарственных препаратов, работающих по механизму интеркаляции [59].

### **Молекулярный докинг**

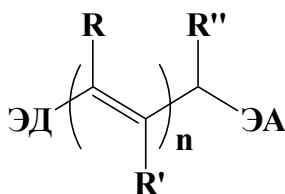
Для оценки биологической эффективности фотоактивного соединения необходимо детально изучить его взаимодействие с центром связывания в белке. В настоящей работе была произведена оценка связывания при помощи программной среды Autodock. После предварительной оценки наиболее вероятных участков белка было произведено сравнение энергии связывания при различных размещении лиганда в различных областях связывания: субдомена IIА и IIIА. В ходе докинга происходил поиск соответствующей конформации с наименьшей энергией. Происходила последовательная перестройка конформации молекулы красителя в сайте связывания и рассчитывалась энергия связывания. Происходило сравнение 25 различных конформеров в каждом из 9 возможных направлений связывания, из которых были выбраны 2 наиболее вероятных. Проведенные для фенотиазиновых красителей симуляции докинга показали вероятное размещение лиганда в области между субдоменами IIА и IIIА (Sudlow site I) ЧСА/БСА. Это хорошо согласуется с литературными данными о наиболее предпочтительном взаимодействии красителя и гидрофобного участка ЧСА. Данный сайт связывания содержит аминокислотные остатки (Arg-257, Arg-222, Lys-199, His-242, Arg-218, Lys-195) обуславливающие положительный заряд [60]. По мере перестройки конформации системы краситель-альбумин, краситель взаимодействует с аминокислотными остатками Lys-199, Leu-198, Ala-210, Trp-214, дополнительно образуя водородные связи с Ser-202, с длиной водородной связи порядка 2 Å (для фенотиазиновых красителей) [61]. Для БСА аминокислотными остатками, способными к взаимодействию с красителем являются Trp-213, His-237, Leu-241, Tyr-149, Arg-198, Gln-195, Arg-194, Ala-290, Glu-291, Arg-217 [61]. Данные аминокислотные остатки в основном взаимодействуют посредством гидрофобных и Ван-дер-ваальсовых сил, однако в некоторых случаях влияние на связывание оказывают водородные связи и гидрофобные взаимодействия [62]. При сравнении



расчетных и экспериментальных значений полученных величин углов взаимного расположения элементов структуры красителя и альбумина необходимо принимать во внимание эффект сольватации, а также энтропийный фактор. Кроме того, влияние взаимного расположения силовых полей в используемом поле Triros вносит вклад в расхождение с рентген-структурным анализом для проведенных ранее исследований (PDB 1AO6).

## 1.2. Строение ЦК

Цианиновые красители представляют собой молекулы, состоящие из электронно-донорных или электроноакцепторных групп по периферии и поливиниленовой цепи между гетероциклическими фрагментами (Рисунок 2) [63].



**Рисунок 2 – Структура полиметиновой цепи.**

ЭД - и ЭА гетероциклические фрагменты на периферии, обладающие соответственно электронно-донорными (трехвалентный азот) и электроноакцепторными (четыревалентный азот) свойствами. В поливиниленовый фрагмент могут также входить фрагменты хинолина, пиридина, бензола, толуола, индола. Вследствие альтернирования зарядов соединения подобные ЦК являются окрашенными, поскольку обладают резонансной структурой. Для ЦК характерны образование полуторных связей в полиметиновой цепи хромофорной системы, подобной ароматическим соединениям. Это приводит к затруднению процесса вращения полиметиновой цепи и создает барьер перехода из транс-изомерной формы в цис-изомерную (менее энергетически выгодную). Изменение копланарности хромофора сопровождается изменением спектра поглощения, что связано с изменением сопряжения в молекуле. Эта уникальная характеристика дает цианиновым красителям более широкий диапазон поглощения, чем любой другой известный

класс красителей. Известно, что большое количество синтетических цианинов имеют поглощение между видимой и инфракрасной областями спектра [64]. Кроме того, ЦК обладают очень узкими полосами поглощения и высокими коэффициентами экстинкции. Благодаря этим свойствам цианиновые красители широко используются в различных областях применения, таких как фотографические процессы, лазерная печать, нелинейно-оптические материалы и в последнее время флуоресцентные зонды для биомолекулярной маркировки. Например, [65] раскрывает примерные способы идентификации нитей ДНК с помощью цианиновых красителей. В последнее время они используются для оптической визуализации биомолекул, меченных красителем, либо *in vivo*, либо *in vitro* [66]. Цианиновые красители являются наиболее предпочтительными флуорофорами в биологических приложениях, поскольку флуоресцируют в области спектра 600-1000 Нм. Введение дополнительного виниленового фрагмента дает батохромный сдвиг на 100 нм. Несколько обзорных исследований показывают, что добавление ароматического 6-членного кольца сдвигает поглощение примерно на 20 нм. Основным недостатком такого подхода является повышенная гидрофобность полученного соединения.

Преимущества цианиновых красителей:

- 1) высокая экстинкция и способность флуоресцировать [67];
- 2) достаточно высокая устойчивость под действием света источников возбуждения для применения в флуоресцентной микроскопии [68];
- 3) способность к эффективному связыванию функционализированных ЦК с сохранением фотохимических свойств [69];
- 4) многие стандартные процедуры, в которых применяются красители, позволяют варьировать применяемое соединение без существенной модификации методики, благодаря чему класс красителей являются универсальными реагентами;
- 5) Цианиновые красители не оказывают стерических эффектов на способность конъюгатов связываться с мишенями.

## Применение цианиновых красителей

Флуоресцентные красители являются составной частью многих реагентов, которые используются в различных биоаналитических методиках, таких как обнаружение и секвенирование нуклеиновых кислот [70], проточная цитометрия для клеточной характеристики [71], флуоресцентная микроскопия, ферментативные анализы и все чаще в области оптической визуализации в качестве маркеров для тканей патологических процессов и органов *in vivo* [72]. Органические красители, обычно используемые в качестве контрастных материалов, поддаются модификации дизайна с помощью введения различных линкеров, содержащих одну, а иногда и серию функциональных групп.

Применение оптической медицинской визуализации (ИМ) для создания визуальных представлений структур тела является перспективным методом для проведения клинического анализа и определения объема вмешательства. ИМ является методом установления границы нормы и патологии для анатомии и физиологии. В основе метода лежит избирательное накопление флуоресцентного красителя в тканях. Флуоресцентная визуализация является методикой, обладающей широкими возможностями для изменения масштаба: от доклинической стадии у мелких животных к людям, поскольку один и тот же контрастный агент может использоваться без модификации биологической мишени [73]. Данное свойство является большим преимуществом перед методом биолюминесценции, чувствительность которого нельзя экстраполировать из доклинических данных небольшого изображения животного на человека. Кроме того, система на основе люциферина/люциферазы не может быть масштабирована для применения как метод изучения многостадийного механизма связывания с поверхностью клетки или рецепторов в опухолях, например, в применении для онкологической диагностики. Таким образом, методы, основанные на флуоресценции, являются оптимальным выбором для решения задач по оптической томографии, используемых одновременно с уже зарекомендовавшими себя методами, такими как ПЭТ и рентгенографии [74]. Данные методы позволяют получать более детальную информацию об

изучаемых объектах, поскольку маркеры на основе оптических красителей поддаются разнообразной модификации при помощи введения линкеров, что позволяет существенно варьировать сродство к различным компонентам живых систем. Системы визуализации, основанные на контрастных агентах включает в себя использование зонда, который избирательно нацелен на конкретный клеточный рецептор, последовательность нуклеиновых кислот в геноме, аминокислотные последовательности и посттрансляционные мотивы в белке, эпигенетические модификации, клеточные функции и более детальные факторы, указывающие на конкретное состояние заболевания [75]. Развитие химии красителей ближнего ИК-диапазона позволило данному классу соединений занять ведущие позиции в области оптической ангиографии [66]. В отличие от классического применения флуоресцентных красителей в других технологиях, дизайн флуоресцентных красителей для применения *in vivo* должен включать несколько важных критериев:

- (1) растворимость в воде
- (2) структурную и химическую стабильность
- (3) флуоресценцию в ближней ИК-области
- (4) высокий квантовый выход флуоресценции
- (5) функциональную группу для биоконъюгации

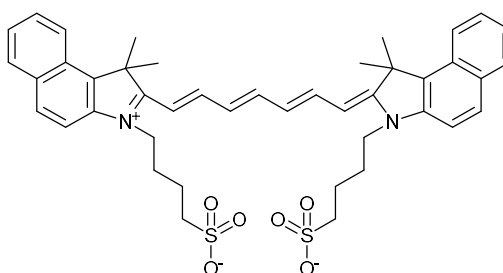
Среди флуоресцентных красителей, доступных для оптической визуализации, предпочтительным классом являются цианиновые красители. Они обеспечивают широкий диапазон длин волн для возбуждения и излучения флуоресценции *in vivo*. Свет в области красного и ближнего ИК-диапазона («терапевтического окна») проходит через ткани: гемоглобин имеет сильное поглощение на длинах волн ниже 600 нм и значительную фоновую флуоресценцию от эндогенных биомолекул до 650 нм [76]. Гептаметиновые цианиновые красители, имеют поглощение и флуоресценцию после 750 нм, относятся к категории ближние инфракрасные красители и являются подходящими флуорофорами для проведения ангиографии.

ЦК насчитывают большое количество подклассов соединений, каждое из которых имеет соответствующее разделение на симметричные и несимметричные соединения, среди которых можно выделить два подкласса, которые обладают поглощением и флуоресценцией в ближней ИК-области:

- а) Трикарбоцианины: из семи атомов углерода и т.д.
- б) Бискарбоцианины, обладающие сопряженными хромофорами

### Трикарбоцианиновые красители

Трикарбоцианиновые красители представляют собой сопряженную систему из семи атомов углерода, заключенных между двумя кватернизованными азотами индолениновых остатков. Наиболее известным трикарбоцианиновым ЦК является кардиогрин (ИКЦ1) [54].



**Рисунок 3 - Структура ИКЦ1**

ИКЦ1 поглощает свет области 700-810 нм в EtOH и флуоресцирует в диапазоне 830-850 нм; его спектральные характеристики подходят для применения для ангиографии. Единственным разрешенным для медицинского применения красителем ближнего ИК-диапазона является ИКЦ1 (кардиогрин, ICG) [77],[78].

Триpletные состояния играют ключевую роль в фотохимии красителей и родственных органических соединений, что определяется участием триплетов в таких важных процессах как фотоперенос электрона, отрыв атома водорода, фотоциклоприсоединение, перенос энергии, образование синглетного кислорода. Широкое применение в биологических и медицинских исследованиях находит водорастворимый индотрикарбоцианиновый краситель (кардиогрин) ИКЦ1, флуоресценция которого в ближнем ИК диапазоне спектра

обуславливает хорошие характеристики для достаточно глубокой диагностики сосудов и опухолей, так как этому диапазону соответствует, так называемое терапевтическое окно [79].

ИКЦ1 в течение нескольких десятилетий использовался в офтальмологии (ИКЦ1А) для ангиографии сосудов, питающих сетчатку. В настоящее время возрастает количество направлений, по которым данный краситель находит применение. В первую очередь это интраоперационный контроль, также определение ревматоидного артрита, оптическая маммография [4–6, 77, 80, 81]. Также ИКЦ1 находит применение в визуализации опухолей, используя краситель в качестве флуоресцентной метки для конъюгатов антитело-краситель. Постепенно ИКЦ1 начинают применять более широко в качестве контрастного препарата, который селективно накапливается в клетках патологического процесса и позволяет визуализировать его по флуоресценции в ближней ИК-области [3, 7].

Использование ИКЦ1 в качестве флуорофора предполагает низкое значение квантового выхода триплетного состояния, с целью избежать нежелательных фотосенсибилизированных процессов. В литературе описывается два возможных механизма действия фотосенсибилизатора, в них реакционноспособными частицами выступают синглетный кислород или супероксид анион-радикал [82, 83]. Процессы переноса энергии и процессы фотопереноса электрона с участием триплетного состояния играют важную роль в образовании этих двух промежуточных продуктов, что и обуславливает интерес к спектрально-кинетическим характеристикам триплетных состояний фотосенсибилизаторов.

Имеются данные об эффективной фотосенсибилизации различных фотобиологических процессов при использовании в качестве фотосенсибилизатора ИКЦ1 и его аналогов, что также требует изучения реакционной способности триплетного состояния [78]. Также сообщалось, что краситель ИКЦ1 способен оказывать токсический эффект под действием света

на клетки сетчатки глаза, генерировать синглетный кислород, влияние которого делает ИКЦ1 фотосенсибилизатором [84, 85].

Использование ИКЦ1 и сходных по структуре индотрикарбоцианинов в медицине в качестве флуорофора для ангиографии возможно только при условии отсутствия фотосенсибилизации, так как деструктивные фотопроцессы могут привести к негативным последствиям и разрушению клеточных структур при проведении диагностики. С другой стороны, в случае высокого квантового выхода триплетного состояния у красителя это соединение может быть потенциальным фотосенсибилизатором в ФДТ. В литературе отсутствуют прямые указания на спектрально-кинетические характеристики триплетов кардиофина, что затрудняет оценку его реакционной способности. Данные по оценке квантового выхода триплетов кардиофина имеют противоречивый характер [86, 87].

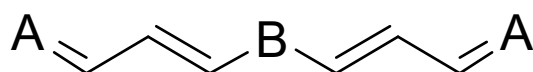
Ранее имелись сведения о существовании короткоживущего триплетного состояния ИКЦ1 [86], а также сведения о наличии более долгоживущего состояния [88], обусловленного цис-транс фотоизомеризацией в водном растворе. Исходя из литературных данных ИКЦ1 оказывает фотодинамическое действие, что не согласуется с утверждением о невысоком выходе интерконверсии. В то же время имеются сообщения о том, что ИКЦ1 можно использовать в качестве реагента для определения квантового выхода синглетного кислорода [12, 89]. В публикациях других авторов утверждается, что можно с помощью ИКЦ1 производить нейтрализацию активных форм кислорода, например, генерируемых хлорином Е6 [13]. Одновременно с этим сообщает о применении ИКЦ1 как фотосенсибилизатора [90]. Приводимые в литературе данные о квантовом выходе триплетного состояния ИКЦ1 варьируются от 0.1-0.2 до  $5 \times 10^{-5}$  [86, 91]. Время жизни триплетного состояния, зарегистрированного непрямым методом, оцениваются [88] в 1 мс как и время жизни цис-фотоизомера ИКЦ1, а [91] регистрируют время жизни триплетного состояния 700 мкс, однако время жизни фотоизомера оценивают как 430 мкс.

Важную роль в процессе безызлучательной деградации энергии электронного возбуждения для цианиновых красителей играет процесс транс-цис фотоизомеризации. Для некоторых производных бензотиа- и бензоксокарбоцианиновых красителей процесс фотоизомеризации является основным процессом деградации энергии электронного возбуждения, в то время как вклад флуоресценции для красителей с незакрепленной полиметиновой цепью составляет несколько процентов [92]. Вследствие высокого значения константы фотоизомеризации и константы флуоресценции вклад запрещенного процесса интеркомбинационной конверсии чрезвычайно мал (квантовый выход триплетов близок к нулю). В процессе фотоизомеризации при отсутствии стерических препятствий поворот вокруг полиметиновой цепи осуществляется на угол  $180^\circ$  с образованием достаточно долгоживущего фотоизомера с временем жизни от 10 до 100 мс [35]. В случае стерических препятствий, когда полный поворот не может быть осуществлен, происходит образование затрудненного короткоживущего (100 нс - 1 нс) фотоизомера и при этом угол поворота может составлять  $60^\circ$  -  $120^\circ$ , величину значительно меньшую  $180^\circ$ . Энергия активации для обратной темновой цис-транс изомеризации для этих затрудненных короткоживущих фотоизомеров значительно меньше (4 - 8 ккал /моль) по сравнению с энергией активации реакции для полиметиновых красителей без стерических препятствий при полном повороте вокруг полиметиновой цепи (16 ккал /моль) [93]. Такая быстрая фотоизомеризация является доминирующим процессом деградации энергии синглетного возбуждения и запрещенный по спине процесс интеркомбинационной конверсии, для которого характерны невысокие значения констант скорости, не вносит существенного вклада в процесс деградации энергии, что и приводит к чрезвычайно низким значениям квантового выхода триплетного состояния.



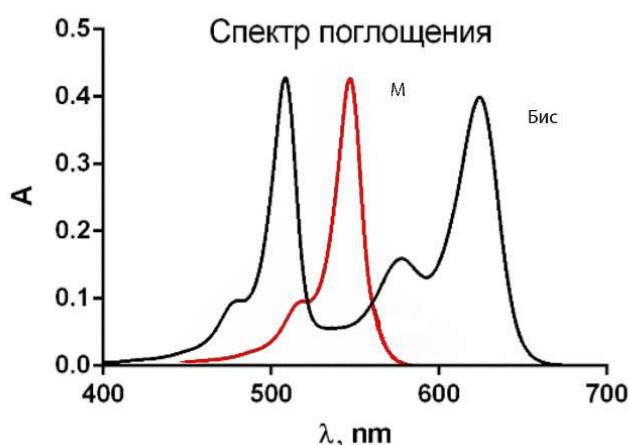
### Бискарбоцианиновые красители

Бискарбоцианиновые красители (БКЦ) представляют собой класс соединений, содержащих две хромофорные системы [93].



**Рисунок 4 - Принципиальная структура БКЦ. А- концевые индолениновые гетероциклические фрагменты, В центральный замещенный бензобистиазольный гетероцикл.**

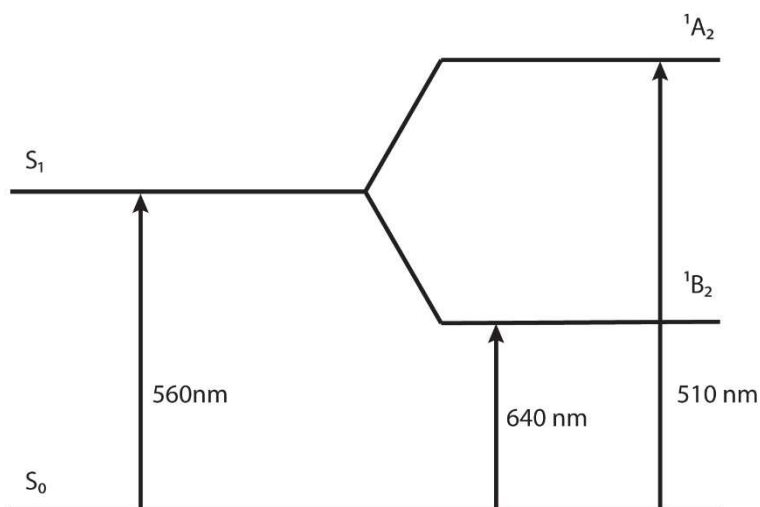
Каждая из хромофорных систем представляет собою диполь. В БКЦ диполи находятся на достаточно близком расстоянии, чтобы между ними происходило взаимодействие. Взаимодействие диполей подчиняется эффекту Давыдова [94]. Благодаря взаимодействию диполей происходит расщепление синглетного уровня. Расщепление приводит к появлению двух новых полос поглощения, также смещает полосу флуоресценции красителя [93]. Данный процесс сопровождается исчезновением полосы материнского красителя (М) и образованием двух новых полос поглощения, смещенных в коротковолновую и длинноволновую область (Бис) относительно материнского красителя.



**Рисунок 5 - Смещение полосы поглощения материнского красителя М при взаимодействии двух хромофоров Бис.**

Интенсивность полос поглощения изменяется в зависимости от угла расположения хромофорных систем друг относительно друга в структуре вещества, относительная интенсивность определяется по соотношению  $\varepsilon_1/\varepsilon_2 = \text{tg}^2$

$\alpha/2$ , где  $\alpha$  угол между хромофорами [95]. Красители линейной структуры имеют один пик поглощения, бискарбоцианины с углом между хромофорами  $90^\circ$  обладают равными экстинкциями полос поглощения.



**Рисунок 6 - Расщепление синглетных термов БКЦ. Взаимодействие двух хромофоров приводит к расщеплению синглет-синглетного уровня. Сопровождается возникновением двух новых полос поглощения 640 нм и 510 нм [96], вместо 560 нм.**

Ввиду наличия дополнительных уровней энергии у цианиновых красителей с сопряженными хромофорами происходит ускорение интеркомбинационной конверсии. ЦК с сопряженными хромофорными системами имеют существенно больший квантовый выход триплетного состояния [97].

Эффект взаимодействия хромофоров в БКЦ открывает новые возможности для синтеза и отбора фотосенсибилизаторов для различных практических применений цианиновых красителей, так как сильно увеличивает вероятность интеркомбинационной конверсии и квантового выхода в триплет. БКЦ с двумя сопряженными хромофорами являются потенциальными фотосенсибилизаторами. Будучи в триплетном состоянии, они способны к участию в реакции переноса электрона, которая приводит к образованию анион-радикала красителя. Высокая реакционная способность делает возможной

реакцию тушения триплета красителя кислородом с образованием синглетного кислорода.

Способность флуоресцировать позволяет использовать БКЦ в качестве флуоресцентных меток и сенсоров при регистрации биомакромолекул. Благодаря эффекту расщепления синглетного уровня, БКЦ обладают способностью поглощать свет в области «терапевтического окна». Стабильность бисцианиновых красителей значительно выше по сравнению с длинноцепочечными цианиновыми красителями, содержащими один хромофор. Удлинение полиметиновой цепи приводит к батохромному сдвигу и ведет к резкому уменьшению темновой стабильности красителей из-за возрастающей мобильности водорода в полиметиновой цепи [98]. Важным свойством фотосенсибилизаторов и флуорофоров является способность образовывать нековалентные комплексы с биомакромолекулами. Наличие положительных зарядов способствует проникновению и локализации бисцианиновых красителей в митохондриях, как это было установлено в [99].

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1. Методы исследования, примененные в работе

Спектры поглощения регистрировали при помощи спектрофотометра «Shimadzu UV-3101 PC» (Япония) в диапазоне 220-900 нм в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см при комнатной температуре. Пробы с содержанием белка были выдержаны от 1 до 4 часов для уравнивания. Спектры флуоресценции были записаны с помощью флуориметра «Панорама» (Россия) с ксеноновой лампой в качестве источника возбуждения в кювете с длиной оптического пути (0.4 и 1.0 см) из кварцевого стекла. Все спектры были зарегистрированы при комнатной температуре.

Эксперименты по связыванию с ЧСА в фосфатно-солевом буфере проводили при комнатной температуре. Спектры поглощения и флуоресценции были оценены в отсутствие и при добавлении ЧСА. Значения константы связывания для исследуемых соединений определяли через долю связывания:

$$\theta = \frac{K_b [HSA]}{1 + K_b [HSA]},$$

где [HSA] - концентрация ЧСА,  $\theta = (F - F_0)/(F_\infty - F_0)$  - доля красителя, связанного с белком, а  $F_0$ ,  $F_\infty$  и  $F$  - интенсивность флуоресценции при [HSA]=0 и при полном и промежуточном связывании красителя белком соответственно.

Кривые гибели флуоресценции комплекса ЦК и ЧСА зарегистрированы на флуорометре Fluotime 300 (PicoQuant, Германия) методом коррелированного по времени счета единичных фотонов однофотонного счета (TCSPC). Возбуждение производили от импульсного лазера. Функция отклика прибора (IRF) была получена экспериментально с использованием Ludox в качестве стандарта рассеяния. Данные о кинетике флуоресценции были зарегистрированы при ближней ИК области при помощи фотоумножителя Hamamatsu в интервале 500-900 нм при угле поляризующей призмы 54,7°. Функция отклика прибора (IRF) была получена экспериментально с использованием Ludox в качестве стандарта рассеяния. БКЦ добавляли к EtOH, PBS или растворы PBS + ЧСА (1 мкм; 10 мкм; 50 мкм) из 1 мм исходного раствора DMSO для получения конечных

концентраций 2 мкм. Все эксперименты проводились при комнатной температуре. Время жизни флуоресценции было установлено с помощью программного обеспечения FluoFit (PicoQuant GmbH, Германия). Все эксперименты проводились при комнатной температуре. Время жизни флуоресценции оценивали с помощью многоэкспоненциальной модели по уравнению:

$$I(t) = \int_{-\infty}^t IRF(t') \sum_{i=1}^n I_i e^{\left(\frac{-t-t'}{\tau_i}\right)} dt'$$

$I_i$ -амплитуда,  $\tau_i$ -время жизни  $i$ -й компоненты, а  $n$ -число компонент. Добротность модели оценивали с помощью теста  $\chi^2$  (близкого к 1 для наилучшего результата), а также с помощью контроля автокорреляционной функции.

### **Клеточная культура**

В работе использовалась клеточная линия аденокарциномы толстой кишки HCT116, протестированная в американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection) (США). Клетки культивировали в среде DMEM. 5% телячьей сыворотки, 2 мм L-глутамина, 100 ед / мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина добавляли в культуральные среды, инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> во влажной атмосфере. В экспериментах использовались культуры в логарифмической фазе роста. Мусоkill использовался для предотвращения заражения микоплазмами. Все эксперименты выполняли в трех повторах в средах, свободных от микоплазменного препарата.

### **Внутриклеточное накопление**

Клетки HCT116 ( $1 \times 10^5$  в 2 мл культуральной среды, 6-луночная пластина) инкубировали с 1 мкм красителя (приготовленным из 10 мм стока в ДМСО) в течение 1-24 ч, затем промывали средой, отделяли 0,25 мм ЭДТА в физиологическом растворе и дважды промывали средой центрифугированием 2.000 об / мин в течение 2 мин. Лизаты растворяли в 100 мкл ДМСО для экстракции красителя. Флуоресценцию измеряли на флуориметре Панорама

(Россия) в кварцевых кюветах при комнатной температуре и нормировали к тем же номерам клеток. Клетки подсчитывали с помощью гемоцитометра и рассчитывали с учетом факторов разведения.

### **Конфокальная лазерная сканирующая флуоресцентная микроскопия**

Клетки выращивали в 35 мм чашках со стеклянным дном. Для предотвращения перекрытия с флуоресценцией ЦК использовали среду флуоробрайт DMEM, не содержащая фенолового красного. Для определения внутриклеточной локализации ЦК клетки НСТ116 инкубировали с 1 мкм ЦК в культуральной среде в течение 1 ч, затем промывали средой. Фотографирование живых клеток проводили через 3 ч после инкубации с ЦК, чтобы позволить красителю перераспределиться в клетке. Для регистрации использовался лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Leica TCS SPE 5 с программным обеспечением LAS AF (Leica Microsystems GmbH, Германия). Для маркировки органоидов эндоплазматического ретикулула использовать маркер ER-трекер зеленый (ERT) (длине волны возбуждения  $\lambda_{\text{возб}}$  488 Нм, длина волны эмиссии  $\lambda_{\text{рег}}$  510-570 Нм), лизосомальный маркер LysoTracker зеленый DND-26 (ЛТ) (длина волны возбуждения  $\lambda_{\text{возб}}$  488 Нм длина волны эмиссии  $\lambda_{\text{рег}}$  500-580 Нм), митохондриального маркера Dihydrorhodamine-123 (DHR) (длина волны возбуждения  $\lambda_{\text{возб}}$  488 Нм/ длина волны эмиссии  $\lambda_{\text{рег}}$  510-570 Нм), и ядерного красителя Хехст 33342 (длина волны возбуждения  $\lambda_{\text{возб}}$  405 нм/ длина волны эмиссии  $\lambda_{\text{рег}}$  415-470 Нм).

### **Статистический анализ**

Результаты представлены в виде среднего арифметического значения  $\pm$  стандартное отклонение ( $X \pm S. D.$ ) По крайней мере четырех независимых экспериментов. Статистическое сравнение проводили с использованием t-критерия Стьюдента с  $P < 0,05$  в качестве минимального уровня значимости.

### **Тестирование цитотоксичности**

Цитотоксичность была протестирована по следующей стандартной методике: клетки НСТ116 высевали в лунки 96-луночного планшета (5000

клеток в 190 мкл культуральной среды), инкубировали в течение 24 ч при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>, во влажной атмосфере. Аликвоты раствора исследуемого вещества вносили в культуральную среду, приготовленную путем последовательных разведений от исходного раствора до конечных концентраций 0,01-5,0 мкм, инкубировали в течение 1 ч, среду меняли на чистую без красителя и оставляли на 3 ч (для определения светлой токсичности) или на 24 ч (для определения темной токсичности) в темноте при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>, во влажной атмосфере. Образцы для световой токсичности затем освещали в течение 30 мин светодиодом 630 Нм 500 МВт (11,5 Дж/см<sup>2</sup>), затем среду меняли на чистую и оставляли в темноте на 24 ч. Во всех экспериментах использовали три типа контроля: (i) лунки, содержащие клетки, обработанные PS, но не подвергнутые воздействию света, (ii) лунки, содержащие клетки без ЦК и без света, и (iii) лунки, содержащие клетки без ЦК и подвергнутые воздействию света. Клетки облучали непосредственно в культуральных планшетах, в стерильных условиях. После облучения клетки инкубировали в течение 24 ч при 37 °С в 5% CO<sub>2</sub>, 95% воздухе и увлажненной атмосфере. Жизнеспособность клеток измеряли путем определения митохондриальной активности с использованием метода 3-(4,5-диметилтиазол-2-Ил) дифенилтетразолий бромид (МТТ). Процент выживших клеток для каждой дозы рассчитывали, как отношение средней оптической плотности в лунках после инкубации с этой дозой к средней оптической плотности контрольных лунок (значения последних принимали за 100%). Контрольные значения (iii) были приняты за 100% выживаемость.

## 2.2. Метод импульсного фотолиза

Эксперименты по изучению возбужденных состояний методом импульсного фотолиза производили согласно методике [97]. Эксперименты проводили на установке лампового импульсного фотолиза с использованием ксеноновой лампы ИПФ-5000. Эксперименты по лазерному импульсному фотолизу проводили на установке Applied Photophysics LKS80.

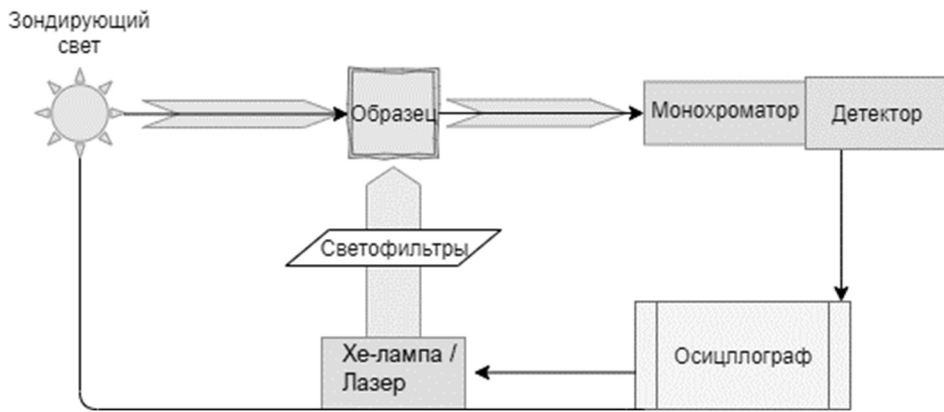
Изучение возбужденных состояний цианиновых красителей является сложной задачей. Для ее выполнения необходимо иметь возможность создания

высокой концентрации исследуемых соединений в триплетных состояниях и возможность регистрации кинетики их гибели, тушения кислородом и стабильными радикалами, участия в реакции фотопереноса электрона от ароматических аминокислот. Сущность метода, предложенного Портером и Норришем в 1949 г, заключается в фокусировке возбуждающего света от импульсного источника на кювете с образцом, тем самым происходит образование интермедиатов с высокой квантовой эффективностью фотохимической реакции.

По сути, установка импульсного фотолиза представляет собою времяразрешенный спектрофотометр, производящий измерение временной зависимости интенсивности величины поглощения образцом пропускаемого света от точечного источника света по дифференциальному методу на различных длинах волн. Образование интермедиатов происходит под действием вспышки света высокой интенсивности, возникающего после разряда импульсной ксеноновой лампы (энергия от 50 до 500 Дж), длительность импульса от нескольких мкс до 200 мкс. В это время уже запущен осциллограф в режиме записи изменения напряжения на фотодиоде\фотоумножителе находящемся на противоположной стороне от лампы зондирующего света относительно кюветы. Таким образом после вспышки возбуждающего света ксеноновой лампы (ИФП-5000) длительностью 50-100 мкс и энергией 80-100 Дж (в зависимости от конфигурации подключения конденсаторов, обеспечивающих питание), проходящая через светофильтры, подобранные в соответствии с полосой поглощения исследуемого вещества, вещество переходит в возбужденное состояние. По изменению интенсивности света на выбранной длине волны видна кинетика поведения вещества. Далее производят перестройку монохроматора на необходимую длину волны для регистрации кинетики гибели возбужденного состояния в следующей точке.

Для регистрации применяли цифровой осциллограф “Bordo 210” (Аурус, Беларусь), обработку сигналов проводили при помощи Microsoft Office Excel.

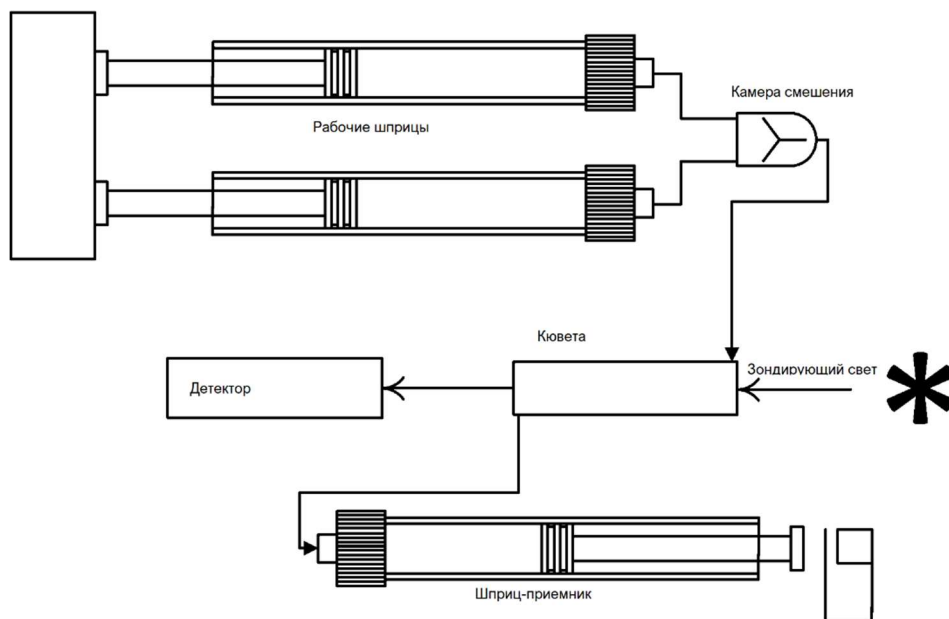




**Схема 2 - Принципиальное устройство установки импульсного фотолиза.**

### Метод остановленной струи

Изучение процессов комплексообразования ЦК с биополимерами проводили при помощи спектрофотометрии и спектрофлуориметрии на установке остановленной струи Applied Photophysics SX20.



**Схема 3 - Принципиальное устройство установки остановленной струи**

Получение спектрально-кинетических характеристик в методе остановленной струи основано на том, что происходит регистрация кинетики изменения поглощения или флуоресценции в проточной кювете после смешения двух компонентов реакции. Таким образом метод остановленной струи позволяет устанавливать кинетические характеристики бимолекулярных

процессов.

### Вещества и растворители

Красители для исследований БКЦ были предоставлены Б.И. Шапиро (ГОСНИИХИМФОТОПРОЕКТ), синтезированы Ф. А. Михайленко в ИОХ НАН (Киев, Украина). Красители ИКЦ 1-3, БКЦ4 синтезированы под руководством академика Н.С. Зефирова (Химический факультет МГУ) в группе доцента кафедры медицинской химии к.х.н. Т.А. Подругиной и аспирантом Дорошенко И.А., студентом Шмыковой А.М., метиленовый голубой (Aldrich, Germany), ИКЦ1 (ADOOQ, USA). В работе использовались 4-гидрокси-ТМПО, N,N-ДМА, БСА (Aldrich, USA), ЧСА (Пан-эко, Россия), ДНК (Деринат, Россия), антрацен, тетрацен, тетрасульфобензопирен (Eastman-Kodak), фосфатный буфер (Пан-эко, Россия).

Растворители (использовали производства Компонент-Реактив, Россия) марки эталон.

### 2.3. Методики экспериментов

Коэффициенты молярной экстинкции красителей определяли в последовательно растворяя серию навесок EtOH и фосфатно-солевом буфере. Растворение проводили при умеренном нагревании. Было установлено что коэффициенты экстинкции исследуемых соединений ИКЦ1-3 незначительно колебались в диапазоне 10%:  $1.8 \pm 0.2 \times 10^5$  (790 нм),  $1.64 \pm 0.2 \times 10^5$  (790 нм) и  $1.57 \pm 0.2 \times 10^5$  л моль<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> (790 нм). Величина молярной экстинкции для соединений БКЦ1 и БКЦ4 составила  $1.9 \times 10^5$  и  $2.2 \times 10^5$  л моль<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>.

Измерения проводили, предварительно проинкубировав растворы 1 час. При изучении комплексообразования с биополимерами использовали постоянную концентрацию красителя и варьировали концентрацию белка, ДНК. Концентрация ДНК оценивалась по оптической плотности 260 нм с учетом коэффициента экстинкции пары оснований  $\epsilon = 13200$  л  $\times$  моль<sup>-1</sup> / см<sup>-1</sup>. Концентрация альбумина определялась из исходной навески по массе, принимая молекулярную массу белка в 65000 Да.

Квантовые выхода флуоресценции красителей определяли в этаноле и водной

фазе измерены сравнительным методом и рассчитаны с использованием уравнения (2). Где Q-квантовый выход, I-интегральная интенсивность, A-оптическая плотность, а n-показатель преломления.

$$Q = Q_r \frac{I}{I_r} \frac{A_R}{A} \frac{n^2}{n_r^2}$$

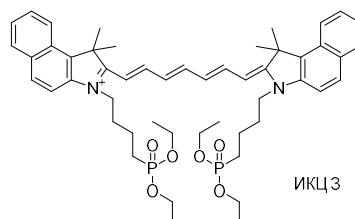
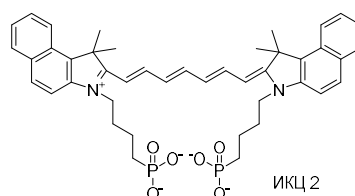
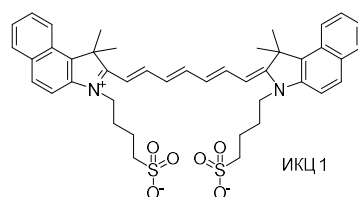
Индекс r относится к флуорофору-стандарту. Оптическая плотность была ниже 0,07 для всех образцов, чтобы избежать эффекта внутреннего фильтра. Оптическая плотность была подобрана для исследуемых образцов и эталонного образца при длинах волн возбуждения  $\lambda = 640$  нм,  $\lambda = 790$  нм. Измерения проводили в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см при комнатной температуре.

Триплетные состояния красителей, константы тушения триплетного состояния красителей стабильными радикалами, ароматическими аминами и кислородом проводили на установке импульсного фотолиза. Перед работой из кюветы с образцом удаляли кислород при пониженном давлении (до 0.06 мБар). Для экспериментов по определению констант тушения кислородом применяли манометрическую установку Vuchi (Швейцария).

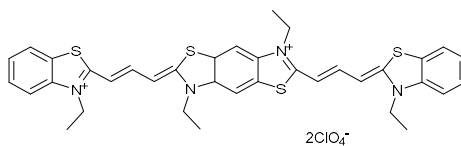
### Глава 3. Результаты исследования

Цианиновые красители являются обширным классом органических соединений. Данные молекулы, несмотря на труднодоступность в синтезе, находят широкое применение в современной медико-биологической практике в качестве препаратов, обладающих исключительно высокими показателями молярной экстинкции и интенсивной флуоресценции, а также способности взаимодействия с биомолекулами [2].

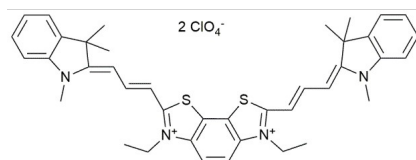
Исследуемые красители:



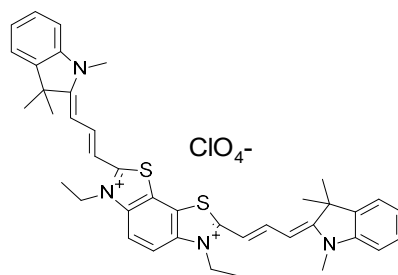
**Рисунок 7 - Красители ИКЦ 1-3.**



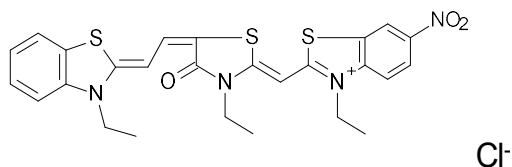
**Рисунок 8 - Краситель БКЦ.**



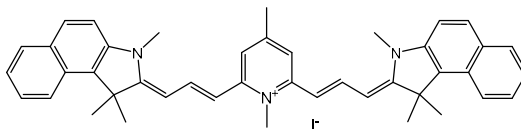
**Рисунок 9 - Краситель БКЦ1.**



**Рисунок 10 - Краситель БКЦ2.**



**Рисунок 11 - Краситель БКЦ3.**



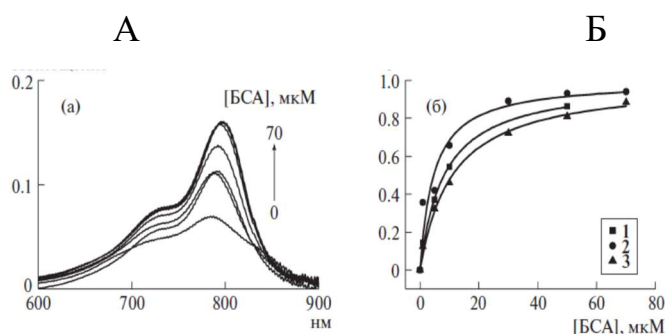
**Рисунок 12 - Краситель БКЦ4.**

### 3.1. Спектрально-кинетические характеристики гептаметиновых цианиновых красителей и их нековалентных комплексов с ЧСА.

Образование нековалентных комплексов между ЧСА и трикарбоцианиновыми красителями является основой применения флуоресцентных меток. Комплексообразование ЦК определяет возможность применения красителей для оптической медицинской визуализации. Установление основных закономерностей процессов деградации энергии фотовозбуждения в комплексах краситель альбумин является основным фактором оценки практической значимости флуорофоров. Также существенным для биологического применения ЦК является вклад фактора водорастворимости и склонности ЦК к агрегации. В алифатический линкер при атоме азота индотрикарбоцианинового красителя были введены фосфонатные (ИКЦ3) и фосфоновые (ИКЦ2) группы. Были охарактеризованы фотохимические свойства водорастворимых индотрикарбоцианиновых красителей, а также вклады процессов деградации энергии синглетно-возбужденного состояния: интеркомбинационная конверсия, внутренняя конверсия, флуоресценция.

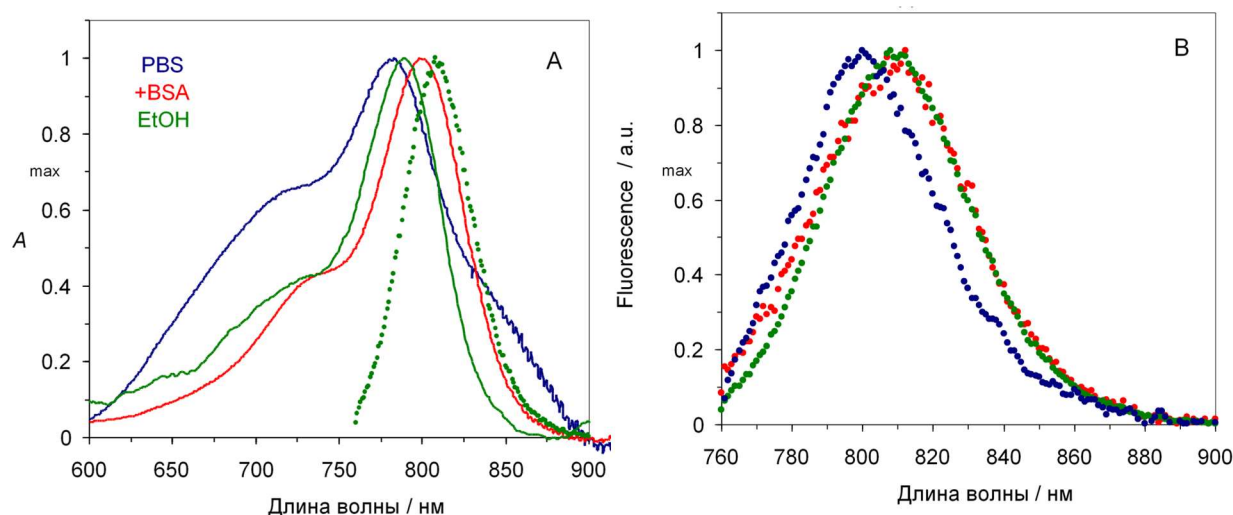
Были зарегистрированы спектры поглощения красителей ИКЦ2 и 3, в органических растворителях и в комплексе с альбумином.

Красители ИКЦ2 и ИКЦ3 поглощают в ближней ИК -области спектра с  $\lambda_{\text{макс}} = 789$  и  $790$  нм ( $\epsilon_{\text{макс}} = (1,85 \pm 0,05) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  в EtOH), соответственно. Было установлено, что форма спектра поглощения, положение максимума поглощения ( $\lambda_{\text{макс}}$ ) красителей ИКЦ зависит от растворителя. В PBS положение  $\lambda_{\text{макс}}$  смещается в коротковолновую область на 10 нм и  $\epsilon_{\text{макс}} = (1.15 \pm 0,05) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ .



**Рисунок 13 - А. Спектры поглощения соединения ИКЦ2 ( $4.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) в отсутствие и в присутствии БСА ( $1 \times 10^{-6} - 7 \times 10^{-5} \text{ M}$ ); Б. Кривые связывания для соединений ИКЦ1–3.**

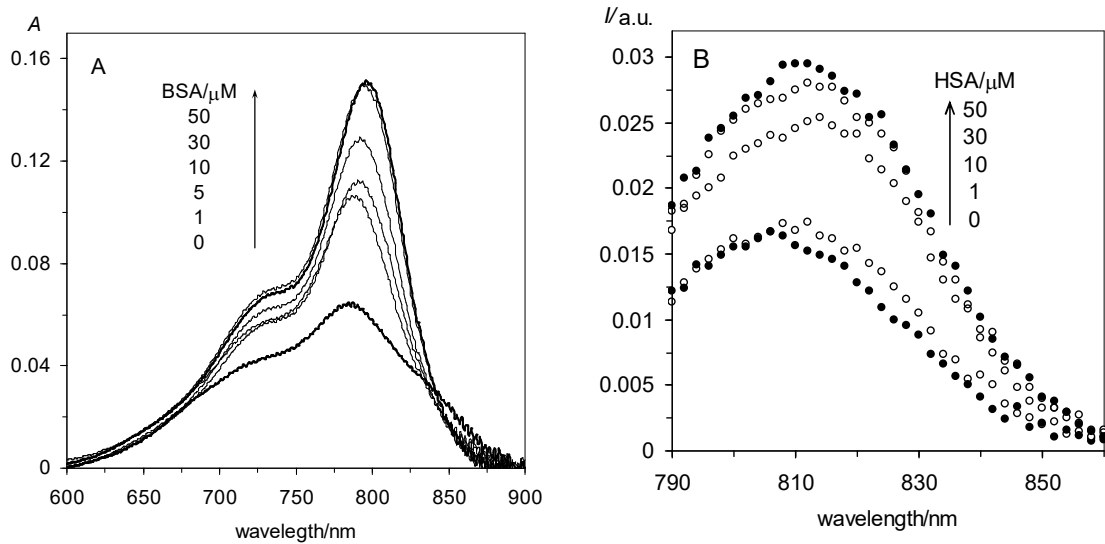
Спектр поглощения красителей ИКЦ в PBS имеет отличную форму от спектра в EtOH. Он существенно шире и обладает плечом вплоть до 900 нм. Это свидетельствует об образовании J-агрегатов, обладающих поглощением в ближней ИК-области. Спектры флуоресценции красителей ИКЦ2 и 3 являются относительно узкими и в PBS ( $\lambda_{\text{ст}} = 800$  нм) и этаноле ( $\lambda_{\text{ст}} = 810$  нм) (Рисунок 14). Данное свойство указывает на то, что в растворе находится преимущественно мономерная форма красителя, которая флуоресцирует. Соотношение интегральной площади интенсивностей флуоресценции в водных растворах и растворах EtOH составляет 0,08 к 1 при одинаковой оптической плотности при  $\lambda_{\text{ex}}$ , что подтверждает агрегацию молекул красителя в PBS.



**Рисунок 14 - Спектры поглощения (А) и флуоресценции (В) ИКЦ2 с альбумином. А. Нормализованные спектры поглощения (сплошные линии) красителя ИКЦ2 в PBS (голубой), в EtOH (зеленый), и в присутствии бычьего сывороточного альбумина (красный) в PBS и спектра излучения (пунктирная линия, зеленый) в EtOH; В. Нормализованные спектры флуоресценции красителя 2 в PBS (синий), EtOH (зеленый) и в присутствии БСА (красный) в PBS ( $\lambda_{ex}=755,9$  нм).**

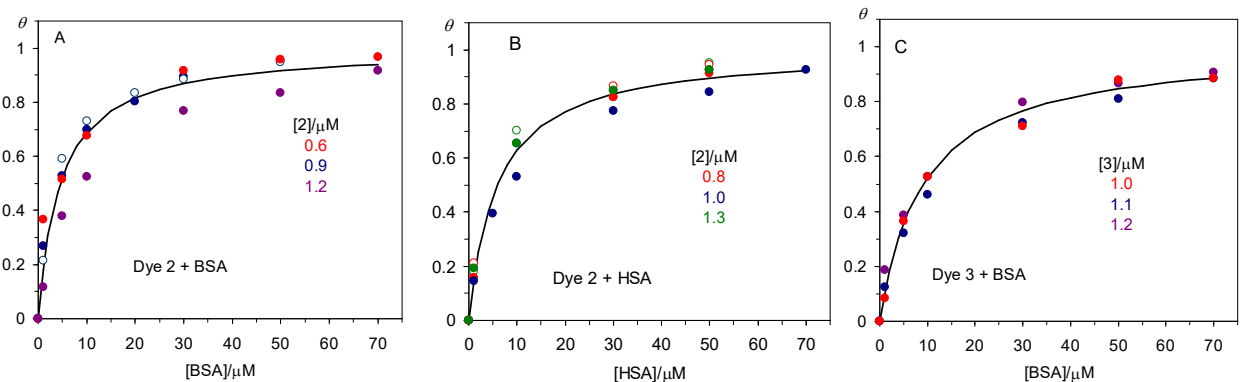
#### **Константа связывания красителей ИКЦ 2 и ИКЦ 3 с ЧСА и БСА**

При взаимодействии ЧСА и красителей ИКЦ2,3 в водной фазе происходит bathochromное смещение пиков флуоресценции. Добавление ЧСА приводит к тому, спектр возбуждения смещается на 20 нм, а спектр флуоресценции смещается на 10 нм. Происходит двухкратное возрастание интенсивности флуоресценции с ростом концентрации альбумина (Рисунок 15). Спектр красителей ИКЦ 2,3 в присутствии белка подобен по форме спектру в EtOH, что указывает на то, что краситель преимущественно находится в молекулярной форме. Приведенные наблюдения позволяют предположить, что аналогично красителю ИКЦ1 [9] красители ИКЦ 2 и ИКЦ 3 образуют комплексы с белками в молекулярной форме.



**Рисунок 15 - А. Спектры поглощения красителя 2 (0.6 мкМ) в отсутствие и в присутствии БСА (1,0- 50,0 мкМ) в PBS. В. Спектры флуоресценции красителя 2 (1.3 мкМ) в отсутствие и в присутствии ЧСА (1,0- 50,0 мкМ) в PBS,  $\lambda_{ex}=780$  нм.**

При росте концентрации альбумина происходит смещение равновесия краситель-альбумин в сторону образования нековалентного комплекса. Под действием энтропийного фактора происходит связывание красителя с сайтом связывания белка. Константы связывания для красителей ИКЦ1–3 рассчитывали для различных начальных концентраций красителей. В соответствии с формулой для расчета доли связывания [100] оценивали значение  $\theta$  (1) (Рисунок 16). Проводили сравнение величины константы связывания красителя и используемого метода (поглощения или флуоресценции) (таблица 1). Кривые связывания приведены на рисунки 16 в виде сплошных линий и соответствующей  $K_b$  в таблице 1 как средние значения.





**Рисунок 16 - Экспериментальные значения  $\theta$  как функция концентрации белка для красителей ИКЦ2 и 3, полученных методом абсорбционной (заполненные кружки) и флуоресцентной (пустые кружки) спектроскопии. А- взаимодействие ИКЦ2 с БСА, В взаимодействие ИКЦ2 с ЧСА, С взаимодействие ИКЦ3 с БСА**

**Таблица 1 - Константы связывания  $K_b$  ( $M \pm m$ ), красителей ИКЦ1–3 с БСА.**

Соединение	$K_b \times 10^{-5}, M^{-1}$
<b>ИКЦ 1</b>	$1,2 \pm 0,2$
<b>ИКЦ 2</b>	$2,2 \pm 0,8$
<b>ИКЦ 3</b>	$0,9 \pm 0,1$

Было установлено, что значение константы, полученной по расчету доли связывания с учетом изменения флуоресценции выше, чем при измерении с помощью поглощения (Таблица 2). Данное явление обосновано тем, что измеренное  $K_b$  является средним значением для разных сайтов связывания, комплекс с более высоким  $K_b$  в большей степени способствует росту интенсивности флуоресценции. Таким образом средние значения полученной по поглощению  $K_b$  для ЧСА ниже, поскольку по поглощению происходит регистрация всех типов образующихся комплексов, а также вклад вносит светорассеяние, возникающее при высоких концентрациях альбумина [10]. Установлено что константа связывания для красителя ИКЦ2 с группой этокси фосфонатов почти в два раза выше, чем для красителя ИКЦ3 с фосфонатными группами и красителя ИКЦ1 с отрицательно заряженными сульфогруппами. Было установлено, что введение фосфонатных групп в структуру красителя увеличивает константу связывания. Дополнительно было отмечено, что введение в структуру красителя этокси фосфонатных групп двукратно увеличивает значение константы связывания с альбумином. Полученные величины констант связывания указывают на то, что происходит дополнительное взаимодействие линкеров в молекулах индотрикарбоцианиновых красителей с сайтами связывания альбумина [10].

Характер взаимодействий указывает на участие дополнительных сорбционных гидрофильных участков в сайте связывания белка при взаимодействии с молекулой красителя [101].

**Таблица 2 - Константы связывания  $K$  красителей ИКЦ1 - 3 с ЧСА в растворе PBS.**

Краситель	Альбумин	Концентрация красителя $\times 10^6$ , М.	Метод	$K_b \times 10^{-5}$ , М <sup>-1</sup>
<b>ИКЦ 1</b>	ЧСА	0.7	Поглощение	1.1
<b>ИКЦ 2</b>	ЧСА	1.3	Поглощение	2.0
		1.3	Флуоресценция	2.2
<b>ИКЦ 3</b>	ЧСА	1.2	Поглощение	1.2

### Заключение

Методами спектрофотометрии и спектрофлуориметрии были охарактеризованы оптические свойства серии индотрикарбоцианиновых красителей ИКЦ1-3 и их комплексов с альбумином. Отмечалось усиление полос поглощения и флуоресценции. Определена доля связывания красителя с альбумином и рассчитаны величины констант связывания для красителей ИКЦ1-3. Проведен анализ влияния структуры красителей ИКЦ1-3 на их оптические свойства. Установлено что константы связывания для красителей разных классов с БСА и ЧСА находятся в диапазоне от  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^6$  М [9],[10]. Они также указывают на низкий вклад кулоновского взаимодействия между молекулами красителя и местами комплексообразования в альбумине. Об этом свидетельствует тот же порядок величины константы связывания для всех красителей ИКЦ1 - 3.

### 3.2. Комплексообразование БКЦ1 с альбумином и спектральные свойства

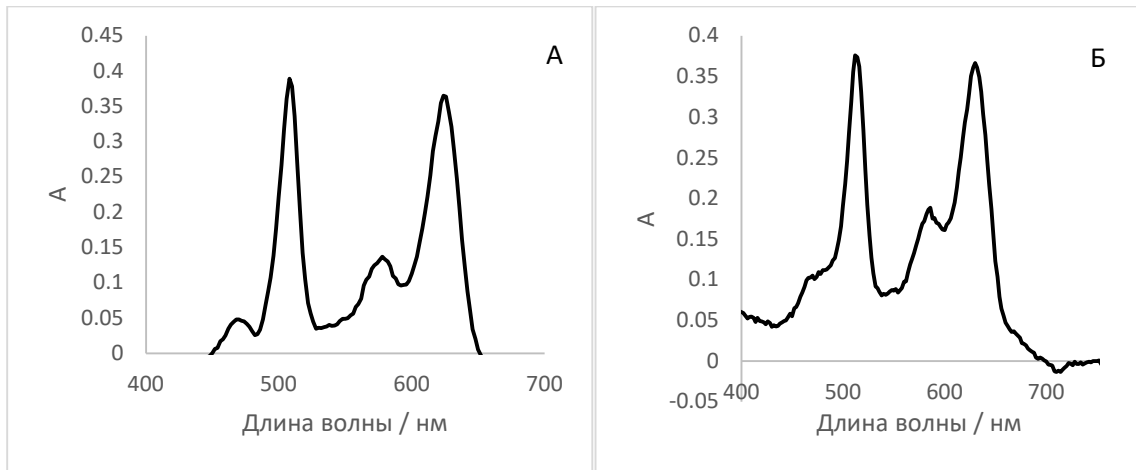
Важным элементом механизма доставки фотосенсибилизатора в раковую

клетку при проведении фотодинамической терапии является процесс комплексообразования между фотосенсибилизатором и различными белками крови [81].

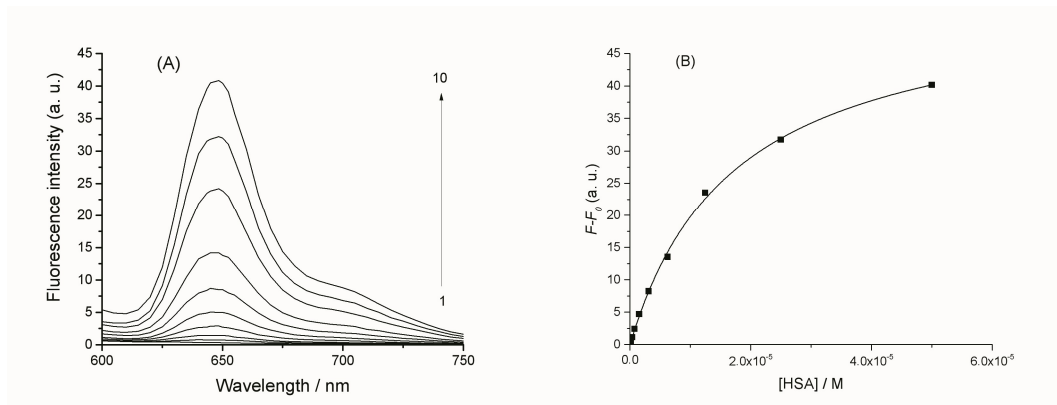
Спектр поглощения БКЦ1 (1 мкМ) в этаноле характеризуется максимумами при 510 нм и 625 нм (Рисунок 17). В PBS максимумы поглощения смещены в коротковолновую область на 5 нм относительно спектра в этаноле, и форма спектра существенно не изменилась, за исключением увеличения колебательных плеч. Связывание с ЧСА (25 мкМ) вызывает батохромный сдвиг полос поглощения на 514 нм и 630 нм. Пик флуоресценции БКЦ1 в этаноле локализован при 636 нм. Квантовый выход флуоресценции БКЦ1 был измерен относительным методом (относительно Родамина 6Ж) и составил в этаноле и PBS составляют  $(0,037 \pm 0,007)$  и  $<0,01$ , соответственно.

ЧСА, добавленный к 1 мкМ БКЦ1 в PBS, увеличивает интенсивность флуоресценции красителя (Рисунок 17). Этот эффект характерен для молекул с гибкой структурой, таких как цианиновые красители. Связывание со структурами биополимеров увеличивает жесткость красителя, а также снижает вероятность деградации энергии путем фотоизомеризации [10] и других неизлучательных процессов перехода в основное синглетное состояние, тем самым увеличивая квантовый выход флуоресценции красителя [10, 99, 101–103].

Зависимость интенсивности флуоресценции БКЦ1 ( $\lambda_{\text{рег}} = 650$  нм) от концентрации ЧСА была использована для расчета  $K_b = (1,7 \pm 0,1) \times 10^5$  М БКЦ1 с ЧСА по формуле [100] (Рисунок 18)). Константа диссоциации сходна со значениями  $K_b$ , наблюдаемых для связывания альбумина с другими цианиновыми красителями в диапазоне от  $10^{-4}$  до  $10^{-7}$  М [103, 104].



**Рисунок 17 - Спектры поглощения БКЦ1 (1 мкМ); А спектр поглощения БКЦ1 в этаноле, Б в фосфатном буфере с 10 мкМ ЧСА.**



**Рисунок 18 - Флуоресценция БКЦ1. А. Спектры флуоресценции БКЦ1 (1 мкМ) в присутствии ЧСА. Б. Интенсивность флуоресценции при БКЦ  $\lambda_{\text{em}} = 650$  нм ( $\lambda_{\text{ex}} = 515$  нм) в зависимости от концентрации ЧСА.**

### **Организация предварительного комплекса между БКЦ и модифицированным белком.**

Ключевым моментом ФДТ является доставка фотосенсибилизатора в раковую клетку. Основной вклад в этот механизм имеет процесс комплексообразования между фотосенсибилизатором и различными белками крови [100]. Альбумин является основным компонентом крови, который участвует в доставке фотосенсибилизатора в [105]. При связывании происходит встраивание молекулы красителя в белок, сопровождающееся перестройкой конформации белка. Реакция образования анион-радикала красителя, благодаря фотопереносу электрона от ароматических аминокислот на возбужденное

состояния фотосенсибилизатора, является одним из основных механизмов действия фотосенсибилизаторов. Таким образом, расстояние от ароматических аминокислот (триптофан, аргинин), входящих в структуру внутриклеточных белков до молекулы фотосенсибилизатора оказывает существенное влияние на вероятность протекания реакции фотопереноса электрона [105]. Образование активных форм кислорода становится результатом фотоактивации комплекса фотосенсибилизатор–белок. Воздействие таких частиц как супероксид-анион, приводит к повреждению внутриклеточных структур, что запускает процессы гибели опухолевых клеток путем некроза или апоптоза. Поскольку бискарбоцианиновые красители обладают низкой растворимостью в водной фазе, необходимо повысить ее, образованием предварительного комплекса БКЦ с белком. Помимо этого, организация комплекса между фотосенсибилизатором и специфичным к определенным видам клеток белком могла бы повысить с одной стороны растворимость фотосенсибилизатора и с другой стороны улучшить процесс доставки фотосенсибилизатора в клетку. В качестве белка-доставщика использован химерный белок, содержащий модифицированный третий домен альфа-фетопротейна человека, строение которого позволяет образовывать комплексы с различными красителями-фотосенсибилизаторами: рекомбинантный белок-носитель (АФП). АФП является продуктом конструкции рAFP28D3PolyGlu, представляющий собой изолированный домен 3 альфа-фетопротейна человека (остатки с 376 по 609 полноразмерного альфа-фетопротейна человека), несущий на С-конце аффинную метку 6His-таг и 22 искусственно добавленных остатков глутаминовой кислоты. АФП был получен с помощью процедуры ренатурации телец включения *in vitro* [106]. Бискарбоцианиновый краситель 2,6-бис-(3,7-ди-N-метил-бенз[1,2-d:4,3-d']бистиазол-)-[N-метил-3,3'-диметил-индокарбоцианина] перхлорат (БКЦ2) и цианиновый краситель 3,3'-диэтил-6'-нитро-4-кето-5(3''-этил-бензтиазолинилиден-2''-этилиден)тиазолинотиацианин хлорид (БКЦ3) были взяты из коллекции ГОСНИИХИМФОТОПРОЕКТ и очищены переосаждением. Спектры флуоресценции комплексов и времена жизни флуоресценции при

фотовозбуждении светодиодом 510 нм (70 пс) измеряли на приборе «PicoQuant FluoTime 300» на длине волны флуоресценции 640 нм.

В присутствии альбумина в водном растворе наблюдается изменение спектров поглощения и сильное возрастание флуоресценции, что обусловлено, тем что происходит торможение характерных для бискарбоцианинов процессов фотоизомеризации за счет образования «замороженной структуры» в ходе комплексообразования молекул карбоцианиновых красителей с молекулами белков [104].

На поверхности альбумина под действием термодинамических факторов происходит переход димеров и агрегатов красителя в мономолекулярный вид. Согласно [100] на основании изменения спектров флуоресценции красителей в присутствии ЧСА и АФП рассчитаны характеризующие связывание константы (Таблица 3) с альбумином и АФП для БКЦ2 и для БКЦ3.

**Таблица 3 - Константы связывания красителей БКЦ2,3 с ЧСА и АФП.**

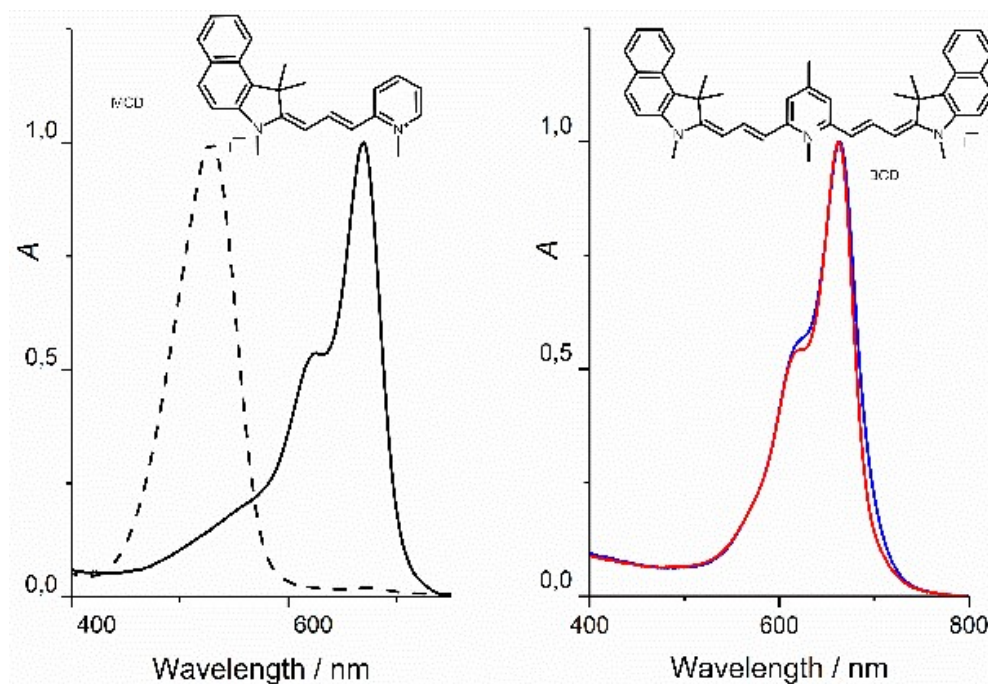
Белок	БКЦ2 (Заряд 2+)	БКЦ3 (Заряд 1+)
	$K, M^{-1}$	$K, M^{-1}$
ЧСА	$5.8 \times 10^4$	$5.4 \times 10^4$
АФП	$1.9 \times 10^5$	$7.0 \times 10^4$

Образование жесткого комплекса между БКЦ2 и АФП уменьшает возможность фотоизомеризации и других безызлучательных переходов деградации энергии возбужденного синглетного состояния и приведет к увеличению квантового выхода интеркомбинационной конверсии [104]. Таким образом, кулоновское взаимодействие определяет образование жесткой молекулярной структуры комплекса БКЦ с  $\alpha$ -фетопротеином и может способствовать как эффективной доставке фотосенсибилизатора в клеточные структуры, так и процессу фотопереноса электрона при тесном взаимодействии фотосенсибилизатора с ароматическими аминокислотами, входящими в структуру белка. В экспериментах по флуоресценции получено среднее значение константы связывания  $K$  для двух комплексов. Комплекс БКЦ2 с АФП более

прочный, как это следует из более высокого значения константы связывания  $K$ . Это подтверждается увеличением времени жизни флуоресценции  $\tau_2$  для второго комплекса БКЦ с АФП, что соответствует образованию более жесткой структуры комплекса и блокированию возможных процессов фотоизомеризации молекулы бискарбоцианина, которые вносят основной вклад в безызлучательную деградацию энергии для цианиновых красителей.

### 3.3. Спектральные характеристики БКЦ4

Спектр поглощения БКЦ4 в EtOH имеет две полосы поглощения в диапазоне VIS-NIR (300-720 нм), первый при  $\lambda_1 = 356$  нм ( $\varepsilon_1 = 3,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), который относится ко второму синглетному терму из-за эффекта электронного расщепления полиметиновой цепи. Второй пик поглощения при  $\lambda_2 = 668$  нм ( $\varepsilon = 2,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Рисунок 20, черная сплошная линия) [107]. В растворе PBS присутствует основная полоса поглощения, расположенная при  $\lambda = 661$  нм ( $\varepsilon = 1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Рисунок 20, красная сплошная линия). Сопряжение хромофоров оказывает существенное влияние на спектральные и кинетические характеристики синглетного и триплетного состояний красителей с двумя хромофорными системами [108]. Сдвиг основной полосы поглощения наблюдается вследствие  $\pi$ -электронной связи между хромофорами через центральный гетероциклический фрагмент. Взаимодействие хромофоров вызывает появление двух полос в спектре поглощения красителя с двумя хромофорами, как показано ранее [108–111]. Первая полоса смещена в коротковолновую область (480 нм), а вторая - в более длинноволновую (668 нм), по сравнению с положением пика поглощения монохромофорного красителя (MCD) (Рисунок 20, черная пунктирная линия). Плечо при 630 нм, связанное со вторым колебательным подуровнем  $S_0 \rightarrow S_1$  перехода, типичное для бискарбоцианиновых красителей [63]. Взаимодействие с ЧСА сдвигает пик поглощения БКЦ4 до  $\lambda = 669$  нм соответственно.

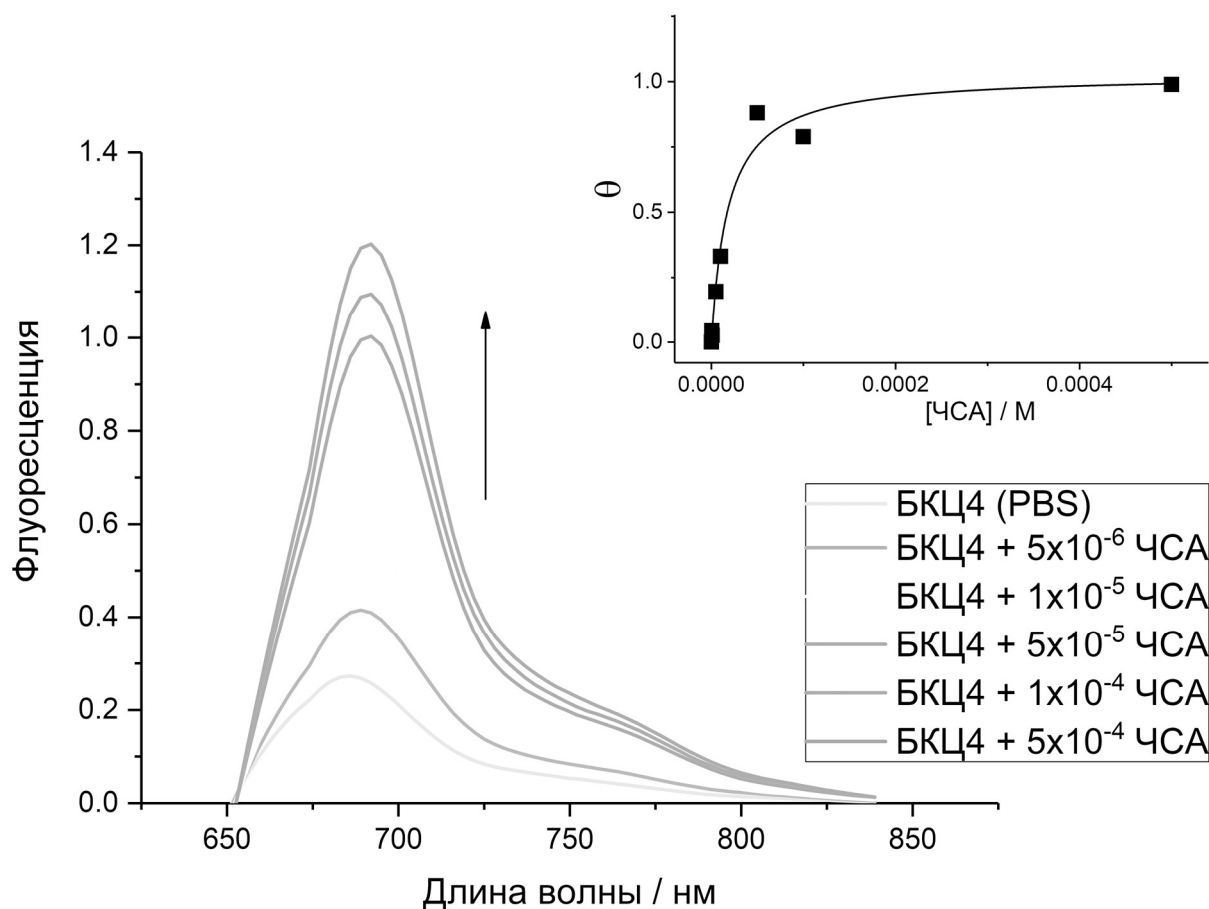


**Рисунок 19 - Нормированные спектры поглощения БКЦ4 В этаноле ( $\lambda_{\text{макс}}$  668 нм; черная линия), моно-краситель MCD - ( $\lambda_{\text{макс}}$  528 нм; пунктирная линия). нормализованные спектры БКЦ4 в PBS растворе ( $\lambda_{\text{макс}}$  661 нм; красная линия) и в комплексе с ЧСА  $10^{-4}$  М ( $\lambda_{\text{макс}}$  669 нм; синяя линия).**

### **Константа связывания БКЦ4 с ЧСА**

БКЦ4 имеет максимум флуоресценции в этаноле на длине волны 690 нм (Рисунок 21). Добавление ЧСА значительно увеличивает интенсивность флуоресценции. (Рисунок 21) Рост интенсивности флуоресценции в присутствии ЧСА указывает на то, что дезактивация энергии синглетного возбужденного состояния происходит более эффективно благодаря торможению процессов колебательной релаксации. Данный процесс объясняется повышением жесткости красителя в комплексе с белком. Константу связывания оценивали по изменению интенсивности флуоресценции по формуле [100]. Расчетная константа связывания, определенная по изменениям интенсивности флуоресценции, составляет  $1,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ .





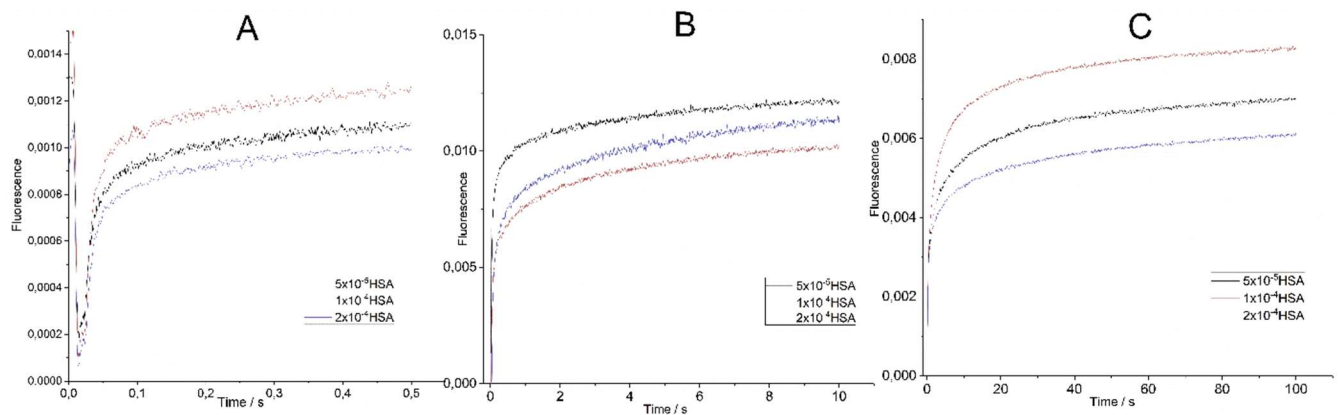
**Рисунок 20 - Спектры флуоресценции БКЦ4 ( $1 \times 10^{-7}$  М) в PBS и в комплексе БКЦ4 ( $1 \times 10^{-7}$  М) с ЧСА ( $1 \times 10^{-7}$ - $1 \times 10^{-4}$  М). На вставке показаны экспериментальные значения  $\theta$  как функции концентрации белка.**

Почти 10-кратное увеличение флуоресценции демонстрирует, что связывание красителя с белком приводит к более жесткой, замороженной структуре красителя. Таким образом, значение для константы связывания для БКЦ4  $K_b = 1,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  сопоставимо со значениями, которые мы наблюдали ранее для трикарбоцианиновых красителей [10].

#### **Исследование комплексообразования БКЦ4-альбумин методом остановленного потока**

Наиболее важной особенностью альбумина является способность связывать большое количество различных химических веществ и транспортировать их в кровотоки [112]. Альбумин имеет несколько участков

связывания, перераспределение красителя между ними является распространенным явлением для цианиновых красителей с высокими константами связывания [113]. Увеличение в интенсивности флуоресценции во время образования комплекса БКЦ4 с ЧСА было использовано в измерениях кинетики образования комплекса с помощью техники остановленного потока. Эксперименты по быстрому смешиванию показали наличие нескольких стадий образования комплекса. Начальный процесс взаимодействия альбумина с красителем определяется константой диффузии, этот процесс происходит быстрее, чем 1 мс, и наблюдается образование трех комплексов. Установлено, что комплексы образуются в результате взаимодействия красителя с двумя характерными сайтами связывания альбумина, которыми являются субдомены IV и IIIA, а третий тип комплексов может быть сформирован за счет взаимодействия красителя с поверхностью альбумина. Комплексы образуются в результате кулоновских и гидрофобных взаимодействий между положительно заряженной молекулой красителя и аминокислотами, образующими поверхность молекулы альбумина.

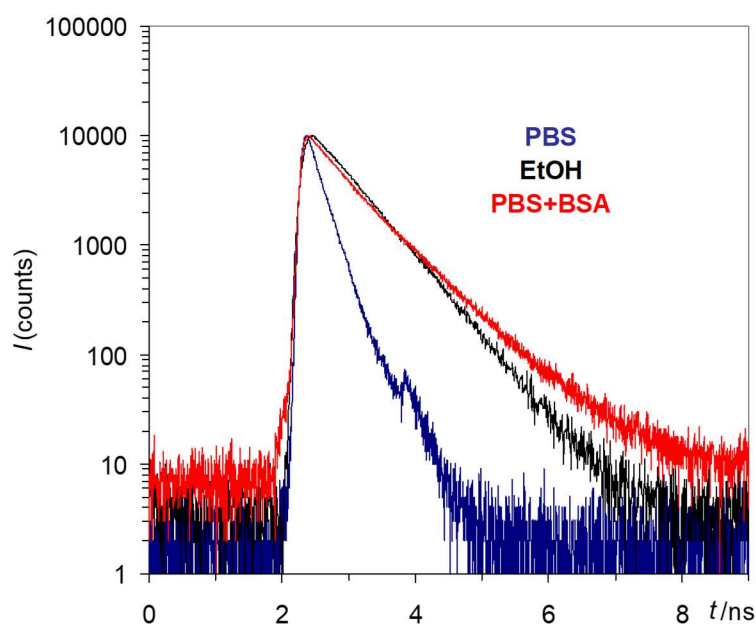


**Рисунок 21 - Кинетики образования комплекса БКЦ4 с альбумином на развертке 0,5с; 10с; 100с; Концентрация ЧСА: Черным -  $5 \times 10^{-5}$  М; Красным  $1 \times 10^{-4}$  М; Синим  $2 \times 10^{-4}$  М.**

## Исследование деградации энергии в фотовозбужденных комплексах ЦК и альбумина

### Время жизни флуоресценции для комплексов красителей ИКЦ 2, 3 с БСА.

Методом времязрешенного счета единичных фотонов были охарактеризованы процессы деградации энергии синглетно-возбужденного состояния комплексов красителей ИКЦ2, 3 в комплексах с альбумином. Концентрации красителя составили  $(0,45-1,7) \times 10^{-6}$  М, концентрации БСА от  $2 \times 10^{-6}$  до  $2 \times 10^{-4}$  М. Кинетики гибели флуоресценции для свободного красителя в PBS кинетика описывается моноэкспоненциальной функцией. Кинетика гибели флуоресценции для красителей в комплексах с БСА характеризуются двух-экспоненциальной функцией (Рисунок 23) с двумя различными временами жизни флуоресценции (Таблица 4).



**Рисунок 22 - Кинетики затухания флуоресценции для комплекса красителя ИКЦ2 в PBS (синий), EtOH (черный) и в растворе PBS с БСА (красный),  $\lambda_{ex} = 755,9$  нм,  $\lambda_{em} = 805$  нм.**

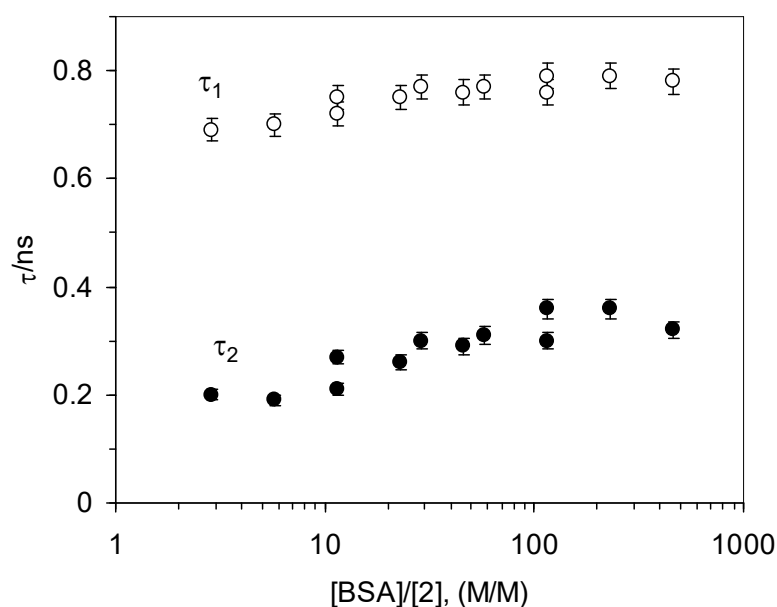
Флуоресценция красителя в комплексе с белком имеет существенно большее время жизни, в отличие от свободного красителя в растворе. Это связано с торможением процессов безизлучательной деградации энергии

синглетного возбуждения и ростом квантового выхода флуоресценции (Таблица 4).

**Таблица 4 - Время ( $\tau_1$  и  $\tau_2$ ) жизни флуоресценции комплексов красителей ИКЦ1–3 с БСА (ошибка 10%, в скобках приведен вклад соответствующего комплекса во флуоресценцию) и растворов красителей ( $\tau$ ) в  $H_2O$  и EtOH.**

Соединение	$\tau_1$ , (пс)	$\tau_2$ , (пс)	$\tau$ ( $H_2O$ ), (пс)	$\tau$ (EtOH), (пс)
ИКЦ 1	808 (62%)	365 (38%)	245	540
ИКЦ 2	742 (79%)	212 (21%)	264	590
ИКЦ 3	741 (72%)	213 (22%)	260	590

При изменении концентрации альбумина происходило незначительное изменение времен жизни флуоресценции (Рисунок 24), так также происходил рост вклада интенсивности долгоживущей компоненты кинетики гибели флуоресценции [113].



**Рисунок 23 - Зависимость времени жизни флуоресценции от соотношения концентраций БСА и красителя 2.**

По результатам анализа времен жизни флуоресценции красителя ИКЦ2 сделаны выводы о роли концентрации альбумина в строении комплексов. Отмечено возрастание времени жизни флуоресценции с 690 до 770 пс для долгоживущей компоненты и с 200 до 340 пс для короткоживущей. Соотношение вкладов компонент с различными временами жизни флуоресценции изменилось с 70% до 90% для долгоживущей компоненты и с 30 до 10% для короткоживущей. Эти результаты свидетельствуют о том, что в растворе одновременно присутствует два вида комплекса красителя с альбумином. Один из которых можно отнести к гидрофильному сайту связывания, а второй к гидрофобному. Такой характер взаимодействия возможен, когда более гидрофобный сайт взаимодействует с красителем в мономерной форме и образует более жесткую структуру, тем самым снижая вклад процессов внутренней конверсии. Экспериментально ужесточение структуры красителя доказано по сравнению времени жизни флуоресценции в комплексе с альбумином с растворами красителя в этаноле и PBS.

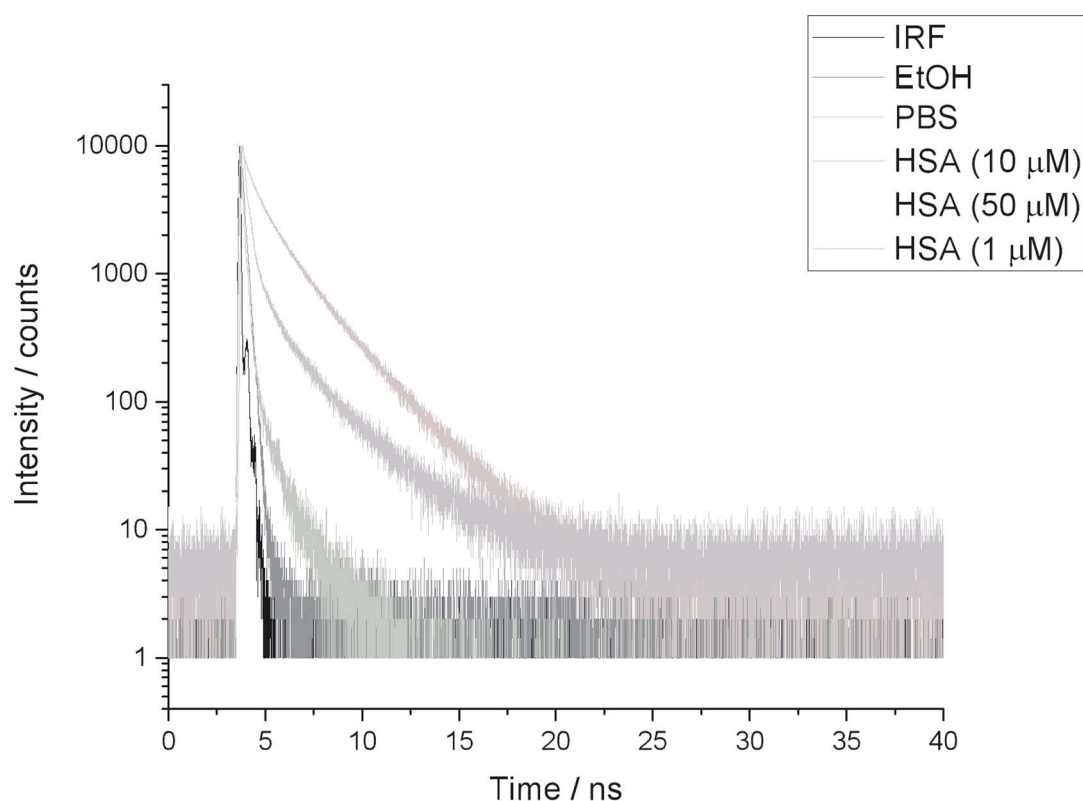
### **Спектрально-кинетические характеристики бискарбоцианиновых красителей**

Особое место среди цианиновых красителей занимают красители, молекулы которых содержат два сопряженных хромофора, у которых проявляются два эффекта: диполь-дипольное взаимодействие и туннелирование электронов через центральный гетероцикл.[111] Результатом этих эффектов является расщепление возбужденных уровней, что приводит к сильному батохромному смещению в спектре поглощения.

### **Время жизни флуоресценции БКЦ1 в отсутствие и в присутствии ЧСА**

Кривые затухания флуоресценции БКЦ в этаноле, PBS и в присутствии ЧСА (в PBS) показаны на Рисунке 25. Установлено что кинетика гибели флуоресценции в этаноле является моноэкспоненциальной, в то время как в PBS это би-экспоненциальный процесс. В присутствии 1 мкМ и 10 мкМ ЧСА, кинетика описывается тремя экспонентами. Времена жизни флуоресценции

показаны в таблице 5.



**Рисунок 24 - Кривые затухания флуоресценции БКЦ1 (2 мкМ). В этаноле (синий), в PBS в отсутствие ЧСА (зеленый). В присутствии: 1 мкМ ЧСА (пурпурный), 10 мкМ ЧСА (красный) и 50 мкМ ЧСА (голубой); IRF (черный),  $\lambda_{ex} = 510$  нм,  $\lambda_{рег} = 640$  нм.**

**Таблица 5 - Время жизни флуоресценции БКЦ1 (2 мкМ) в этаноле, PBS и в присутствии ЧСА в PBS,  $\lambda_{возб} = 510$  нм,  $\lambda_{рег} = 640$  нм.**

	Этанол	PBS	ЧСА, 1 мкМ	ЧСА, 10 мкМ	ЧСА, 50 мкМ
$\tau_1, \text{нс}$	$0,15 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,01$	-
$I_1, \%$	100	91	39	9	-
$\tau_2, \text{нс}$	-	$1,02 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,03$	$1,00 \pm 0,02$
$I_2, \%$	-	9	27	35	29
$\tau_3, \text{нс}$	-	-	$2,64 \pm 0,04$	$2,50 \pm 0,06$	$2,50 \pm 0,03$

$I_3, \%$	-	-	34	56	71
$\chi^2$	1,03	1,09	1,04	1,05	1,08

Наименьшее время жизни флуоресценции компонента  $\tau_1$  одинаково во всех трех растворах, оно характерно для свободных молекул БКЦ1 и исчезает при самой высокой концентрации ЧСА (50 мкМ). Принимая во внимание значение  $K_b$  в присутствии ЧСА при высоких концентрациях, практически все молекулы БКЦ должны быть связаны с ЧСА. Поэтому мы предполагаем, что существование двух компонентов БКЦ, связанных с ЧСА и характеризующихся временем жизни  $\tau_2$  и  $\tau_3$ , связано с двумя типами комплексов БКЦ-ЧСА. Вклад компонент с различным временем жизни флуоресценции изменяется в зависимости от концентрации ЧСА. Амплитуда  $\tau_3$  возрастает с 34% до 71% с увеличением концентрации белка. Это изменение связано с наиболее стабильным комплексом с наибольшим временем жизни флуоресценции. Комплекс, характеризуемый  $\tau_3$ , вероятно, связан с гидрофобными взаимодействиями между ЧСА и молекулами красителя. В этом случае расположение молекулы БКЦ в структуре ЧСА стабилизируется, что увеличивает их жесткость и, следовательно, увеличивает время жизни флуоресценции. Электростатическое взаимодействие между молекулами красителя и поверхностью альбумина является причиной второго типа комплексов, характеризующихся  $\tau_2$ . Увеличение жесткости структуры БКЦ увеличивает вероятность образования триплетного состояния красителя по пути интеркомбинационной конверсии из возбужденного синглетного состояния молекулы красителя. Образование триплета БКЦ является существенным для фотодинамического эффекта. При прямом фотовозбуждении триплетное состояние БКЦ принимает электрон от донора (аминокислоты Trp или Tyr в альбумине) и превращается в анион-радикал, который представляет собой долгоживущую химически активную частицу, образующую супероксид анион-радикал в взаимодействие с кислородом, а также запускает каскад свободнорадикальных реакций окисления биомакромолекул в клетке. Сайт

связывания в субдомене ПА ЧСА содержит ароматическую кислоту Trp-212, которая также может отдавать электрон для образования анион-радикала красителя. Таким образом, после фотоактивации БКЦ в гидрофобном кармане субдомена ПА способен как к прямому окислению ароматических аминокислот в составе белка, так и к косвенному разрушению биомакромолекул за счет образования активных форм кислорода внутри клетки.

### **Регистрация комплексов БКЦ4 методом времяразрешенной флуориметрии**

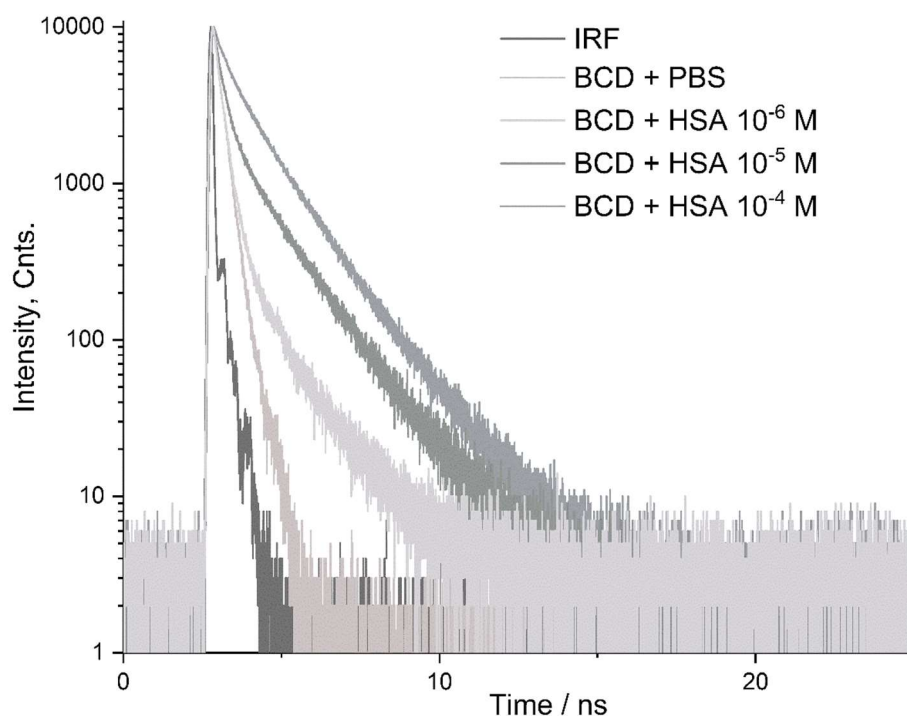
В большинстве случаев цианиновые красители представляют собою положительно заряженные молекулы, если не были введены отрицательно-заряженные заместители, такие как сульфогруппы. Структура ЦК включает в себя сопряженные  $2p_z$ -орбитали с чередованием кратных связей и делокализованной электронной плотностью. Следовательно, взаимодействие цианиновых красителей с биомакромолекулами является сложным процессом. Вклад кулоновских и гидрофобных взаимодействий в комплексообразование трудно оценить по отдельности, поскольку белок имеет разные сайты связывания. Упомянутые выше факторы серьезно влияют на молекулярную динамику комплексообразования. В предыдущем разделе, было показано с помощью метода остановленного потока, что образуются несколько комплексов БКЦ4 с ЧСА и что равновесное состояние достигается в течение одной-двух минут.

Методика TCSPC с регистрацией кинетики затухания флуоресценции на разных длинах волн позволяет различать различные комплексы с разным временем жизни флуоресценции. Растворы БКЦ4 в этаноле показывают однокомпонентное экспоненциальное затухание флуоресценции с характерным временем жизни 0,6 нс во всем диапазоне длин волн излучения (660–790 нм) ( $\chi^2 = 0,92$ ,  $\lambda_{\text{рег}} 690$  нм).

В PBS флуоресценция БКЦ4 затухает по моноэкспоненциальному закону с характерным временем жизни 0,21 нс ( $\lambda_{\text{рег}} 660-790$  нм). Данное время жизни флуоресценции соответствует затуханию растворенных мономеров или



слабосвязанных молекул БКЦ4 на поверхности белка. Компонента с наименьшим временем жизни флуоресценции (0,18–0,21 нс) существует при всех концентрациях альбумина, но его вклад уменьшается при увеличении концентрации ЧСА. Добавление ЧСА приводит к появлению двух- и трехэкспоненциального сигнала кинетики затухания флуоресценции в зависимости от добавленной концентрации белка. Появляются компоненты с временем жизни флуоресценции 0,80–1,20 нс и 1,65–1,80 нс с разным вкладом компонентов на разных длинах волн. Характерное время жизни флуоресценции  $\sim 1,0$  нс относится к молекуле БКЦ4, которая неспецифически связана с сайтами белка. Компонента 1 нс флуоресценции наблюдается при всех концентрациях ЧСА, в то время как компонент 1,7–1,8 нс наблюдается только при  $[\text{ЧСА}] \geq 10^{-5}$  М. Таким образом 1,8 нс компонента принадлежит к комплексу БКЦ4, наиболее сильно связанным с альбумином в гидрофобном кармане между субдоменами ПА и ПИА. Вклад самого долгоживущего компонента возрастает с увеличением концентрации альбумина. Интересно, что вклады различных компонентов зависят от длины волны регистрации, что указывает на то, что измеренные времена жизни принадлежат разным типам комплексов с различными спектрами флуоресценции. Комплекс с наибольшим временем жизни имеет максимум флуоресценции при 690 нм.



**Рисунок 25 - Кинетики затухания флуоресценции БКЦ4 при различных концентрациях ЧСА,  $\lambda_{\text{возб}}$  640 нм,  $\lambda_{\text{рег}}$  690 нм.**

Данные TCSPC подтверждают, что образуются три типа комплексов с различными флуоресцентными свойствами.

**Таблица 6 - Время жизни флуоресценции  $\tau_i$  (нс) БКЦ4 с различными концентрациями ЧСА на разных длинах волн, относительные амплитуды компонентов в% приведены в скобках.**

[ЧСА] / М	$\tau_1$ / нс ( $A_1$ %)	$\tau_2$ / нс ( $A_2$ %)	$\tau_3$ / нс ( $A_3$ %)	$\chi^2$
660 нм				
$10^{-6}$	0,20 (97)	0,87 (3)	-	1,56
$10^{-5}$	0,18 (71)	0,80 (16)	1,75 (13)	1,02
$10^{-4}$	0,19 (32)	0,83 (31)	1,79 (37)	1,37
690 нм				
$10^{-6}$	0,20 (96)	1,26 (4)	-	1,44
$10^{-5}$	0,19 (40)	0,92 (22)	1,68 (38)	1,09

$10^{-4}$	0,22 (13)	0,96 (36)	1,65 (51)	1,25
740 нм				
$10^{-6}$	0,20 (82)	1,21 (18)	-	1,35
$10^{-5}$	0,19 (43)	0,95 (24)	1,65 (33)	1,17
$10^{-4}$	0,20 (15)	0,96 (40)	1,65 (45)	1,38
790 нм				
$10^{-6}$	0,20 (77)	1,23 (23)	-	1,32
$10^{-5}$	0,20 (37)	1,11 (40)	1,80 (23)	1,39
$10^{-4}$	0,24 (15)	1,03 (45)	1,68 (40)	1,27

Квантовые выходы флуоресценции ( $\phi$ ) БКЦ4 в этаноле и водной фазе измеряли сравнительным методом с метиленовым синим (МВ) в качестве стандарта.

Оптическая плотность была не выше, чем 0,07 для всех образцов, чтобы избежать эффекта внутреннего фильтра. Оптическую плотность была подобрана для образцов и эталонного зонда при возбуждении длины волны  $\lambda_{\text{возб}} = 633$  нм. Полученные значения для флуоресценции  $\phi$  БКЦ4 составили:  $\phi$  (EtOH) =  $(4,3 \pm 0,4)$  %,  $\phi$  (PBS) =  $(2 \pm 0,2)$  %.

### **Время жизни флуоресценции БКЦ2 и БКЦ3 в комплексе с альбумином и АФП.**

**Таблица 7 - Время жизни флуоресценции красителей БКЦ2,3 с ЧСА/АФП.**

Белок	БКЦ2 (Заряд 2+)		БКЦ3 (Заряд 1+)	
	$\tau_1$ , нс	$\tau_2$ , нс	$\tau_1$ , нс	$\tau_2$ , нс
ЧСА	2,42	0,58	2,60	1,13
АФП	2,72	0,98	2,87	0,59

Практически весь краситель БКЦ2 находится в мономерной форме в виде комплекса с альбумином при достаточно высокой концентрации ЧСА. Рассмотрение кинетики гибели флуоресценции комплексов БКЦ2 ( $1 \times 10^{-7}$  М) с ЧСА ( $3 \times 10^{-5}$  М) и с АФП ( $1,1 \times 10^{-5}$  М) в водном фосфатном буфере показало, что этот процесс описывается двухэкспоненциальной зависимостью с временами жизни флуоресценции  $\tau_1$  и  $\tau_2$ . Полученные результаты по связыванию БКЦ2 с белками согласуются с результатами по экспериментальному доказательству образования двух различных комплексов между альбумином и индотрикрабоцианиновыми красителями методом регистрацией двух времен жизни флуоресценции этих комплексов [9, 101]. Образование двух комплексов обусловлено наличием у альбумина двух центров связывания [114] и, вероятно, у АФП также сохраняется способность образовывать два различных комплекса. Связывание возможно за счет взаимодействия липофильных низкомолекулярных биоактивных лигандов с имеющимся у АФП центрами связывания гидрофобных соединений (в естественных условиях, липидов).

Возможными кандидатами на центры связывания АФП с БКЦ2 являются: FBS3 (fatty acid-binding site) один из трех участков связывания жирных кислот (419–438), HEBS1 (human estrogen-binding site) основной эстрогенсвязывающий участок АФП человека (а.о. 428–449); HEBS2 (human estrogen-binding site) дополнительный эстрогенсвязывающий участок АФП человека (а.о. 458–471). Также дополнительным центром связывания может служить искусственно введенный в состав белка конструкции rAFP28D3PolyGlu элемент в виде 22 тандемно-расположенных остатков глутаминовой кислоты, способных взаимодействовать с положительными зарядами красителей БКЦ2 и БКЦ3 за счет кулоновского взаимодействия. Сильное кулоновское взаимодействие приводит к образованию более стабильного комплекса с  $\alpha$ -фетопротеином по сравнению с ЧСА для БКЦ2, у которого имеется двойной положительный заряд на молекуле красителя.

Для комплексов молекул цианинового красителя с одним положительным зарядом ЦК (Таблица 7) увеличение константы связывания при переходе от ЧСА

к АФП также подтверждает важную роль кулоновского взаимодействия при комплексообразовании. Однако вследствие того, что у ЦК только один положительный заряд, возрастание константы связывания при переходе от ЧСА к АФП не столь велико.

## Молекулярный докинг

### Моделирование связывания красителя ИКЦ2,3 с альбумином.

Возможные взаимодействия между молекулами ИКЦ1 и его фосфонатными аналогами (ИКЦ 2 и 3) с ЧСА (PDB: 4F5S и 4L9Q) были проанализированы с помощью полужесткого молекулярного докинга. Их молекулы расположены в широком умеренно полярном кармане между субдоменами альбумина ПА и ПИА (Рисунок 27). Один из замещенных бензоиндольных фрагментов ориентирован внутри кармана, а другой направлен наружу. Несмотря на некоторое отличие положения и конформации лиганда, представленный механизм связывания сходный с аналогичным для полиметиновым красителя, предложенным в [86]. Серия проведенных исследований показала, что несмотря на существование нескольких вариантов связывания, преимущество в выборе сайта определяется гидрофобными взаимодействиями. Таким образом, наши экспериментальные результаты с красителями различной гидрофобности и зарядами полярных групп, а также теоретический докинг этих красителей в структурах белковых молекул подтверждают принципиальную роль гидрофобных взаимодействий в связывании, принятую в литературе [86].

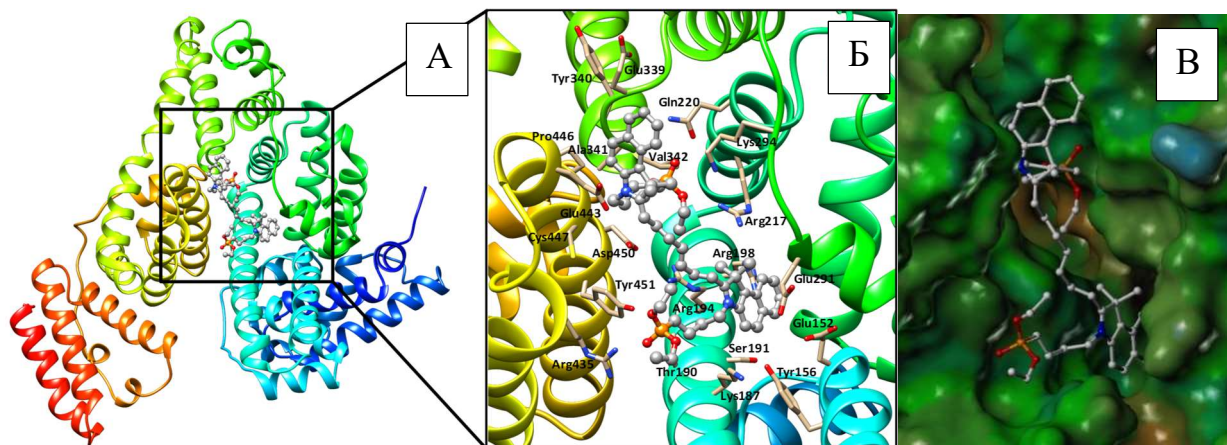


Рисунок 26 - Молекулярный докинг ИКЦ2 и ЧСА. А - общий вид структуры ЧСА и положения сайта связывания полиметинового красителя ИКЦ2. Б - детализированная структура сайта связывания и полиметинового красителя. Молекула лиганда 2 представлена серой шаровой моделью. Аминокислотные остатки, расположенные в пределах 4 Å от него, показаны в виде моделей бежевых палочек. В - вид гидрофобного

**кармана для красителя ИКЦ2 в структуре ЧСА. Поверхность белка Конолли окрашена в соответствии с молекулярным липофильным потенциалом от коричневых (гидрофобных) до синих (гидрофильных) областей. Молекула лиганда представлена серой шаровой моделью.**

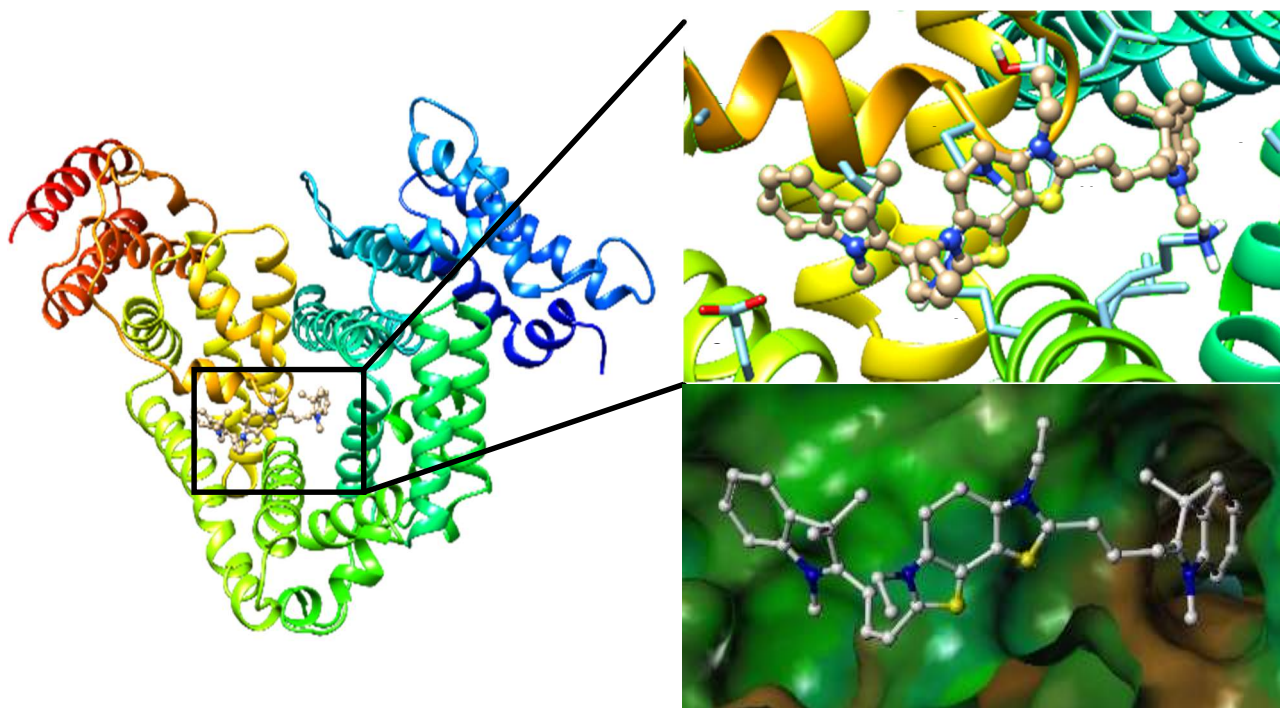
Результаты докинга [115, 116] указывают на значительное сходство оптимальных связанных конформаций исследуемых соединений (Рисунок 27). Их молекулы располагаются в обширном умеренно полярном кармане между поддоменами альбумина IIА и IIIА. При этом один из замещенных бензоиндольных фрагментов ориентирован вглубь кармана, а второй бензоиндольный фрагмент и более полярные сульфатные или фосфонатные группы наружу [117]. В то же время для каждого из соединений возможен также целый ряд других способов связывания, мало отличающихся по энергии от оптимального, что хорошо согласуется со свойствами сывороточных альбуминов как неспецифических транспортных белков [118].

Таким образом, основной вклад в комплексообразование вносят именно гидрофобные взаимодействия между молекулой красителя и белка. Величины констант связывания для красителей различных классов с БСА и ЧСА находятся в диапазоне от  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ . Это также указывает на незначительное влияние кулоновского взаимодействия между молекулами красителя комплексообразования в альбумине.

#### **Моделирование связывания красителя БКЦ1 с альбумином.**

Лиганд связывается с белком (ЧСА и БСА) на одинаковом участке: между субдоменами IIА & IIIА. Разница в энергиях связывания (-8,8 ккал/моль для ЧСА и -10,2 ккал/моль для БСА) для различных режимов связывания и в геометрии лиганда, а также относительно расположении БКЦ1 внутри кармана.

В основе организации комплекса лежат гидрофобные взаимодействия, лиганды находятся в широком умеренно полярном кармане.



**Рисунок 27 - Моделирование докинга красителя БКЦ1 Между субдоменами IIIA и IIIB**

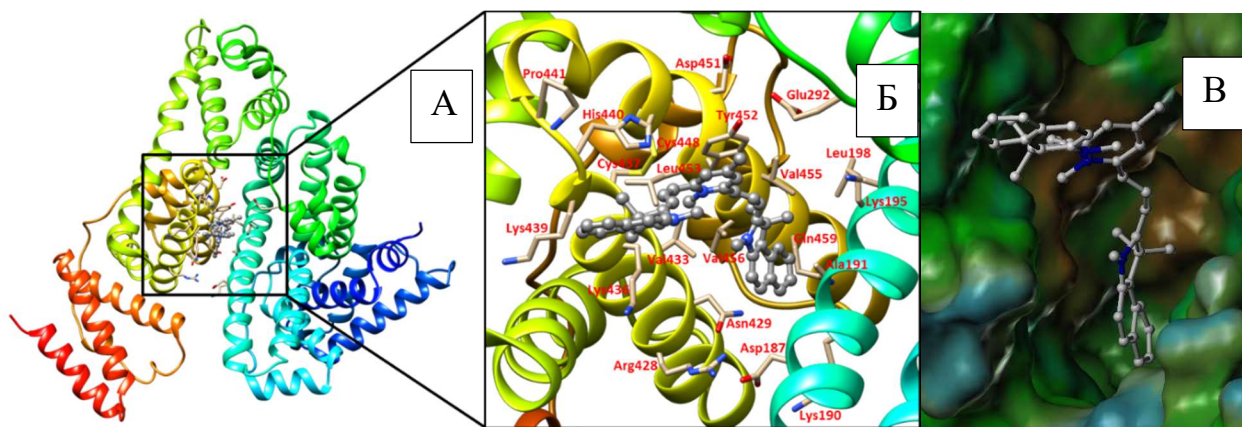
#### **Моделирование связывания красителя БКЦ4 с альбумином.**

Возможные взаимодействия между молекулой БКЦ4 и ЧСА (PDB: 4L9Q) были проанализированы с использованием методов молекулярного докинга и молекулярной динамики [119]. Положение молекулы БКЦ4 в структуре ЧСА показывает существенное сходство с оптимальным режимом связывания для трикарбоцианиновых красителей, найденным ранее путем молекулярного докинга, хотя точное положение и конформация лиганда несколько отличаются [120]. Молекула БКЦ4 расположена в широком, умеренно полярном кармане между субдоменами альбумина IIА и IIIА (Рисунок 29) [121]. Один замещенный бензоиндолиновый фрагмент вводится глубоко в карман, в то время как другой фрагмент ориентирован на внешнюю поверхность белка [122].

Оптимальная позиция молекулы БКЦ4, полученная путем молекулярного докинга, была использована в качестве исходной структуры для моделирования молекулярной динамики комплекса БКЦ4-ЧСА. Конформация белка достаточно стабильна на протяжении всей динамики движения в 50 нс, в то время как положение и конформация лиганда быстро (в течение 9 нс) достигает

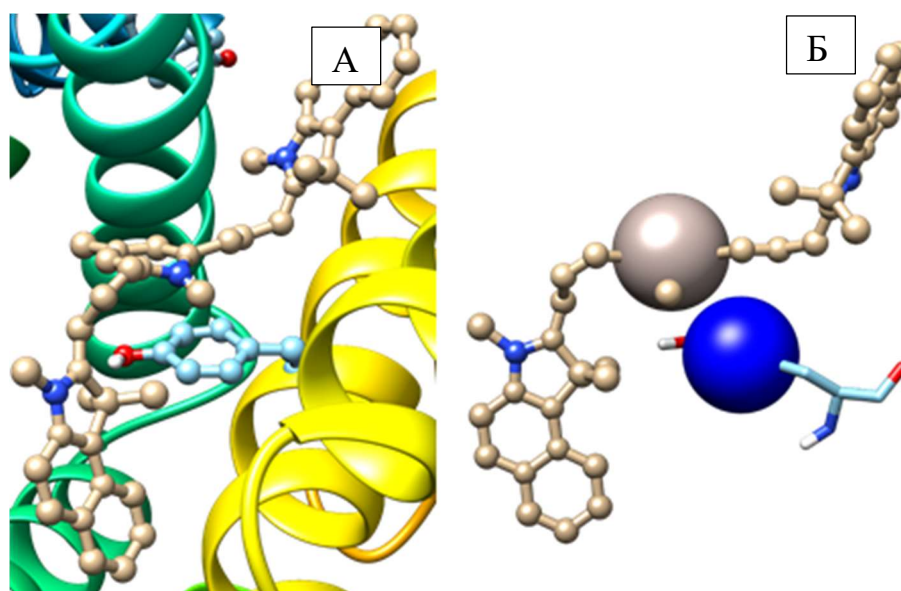


равновесия. Положение молекулы БКЦ4 в структуре ЧСА демонстрирует существенное сходство с оптимальным режимом связывания трикарбоцианиновых красителей, обнаруженных ранее путем молекулярного докинга [113], хотя точное положение и конформация лиганда несколько отличаются. Молекула БКЦ4 расположена в широком, умеренно полярном кармане между субдоменами альбумина IIА и IIIА (Рисунок 29). Один замещенный бензоиндолиновый фрагмент помещается вглубь гидрофобного кармана, тогда как другой фрагмент ориентирован по направлению к внешней поверхности белка. Как обычно для лигандов альбумина, связывание имеет преимущественно неспецифическую природу главным образом на основе гидрофобных взаимодействий, с дополнительным вкладом от  $\pi$ - $\pi$  стекинга, происходящего при взаимодействии между остатком Tyr452 и центральным пиридиновым кольцом. Этот сайт связывания является наиболее вероятным. Однако следует отметить, что связывание в других сайтах альбумина также возможно. Конформация связанной формы БКЦ4 несколько искажена по сравнению с ожидаемой конформацией свободной молекулы, чтобы учесть расположение молекулы в сайте связывания ЧСА. Такое искажение также обычно наблюдается в кристаллических структурах белковых комплексов других молекул, содержащих полиметиновые фрагменты, такие как ретиноидные, мероцианиновые и цианиновые красители (PDB: 4FJR, 4PON, 4QGV, 5L79). Фактически, именно фиксация красителя в сайте связывания вызывает увеличение времени жизни флуоресценции комплекса. Хотя полиметиновые цепи в молекуле БКЦ4 претерпевают значительные внутренние вращения, их общая конформация остается очень стабильной во время моделирования молекулярной динамики. Длина внутренней полиметиновой цепи составляет  $4,8 \pm 0,1 \text{ \AA}$  (среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение), тогда как длина внешней цепи составляет  $4,4 \pm 0,1 \text{ \AA}$ . Угол между хромофорами (измеряется между бензоиндолинином и азотом пиридина ауксохромных атомов) составляет  $120 \pm 7^\circ$ .



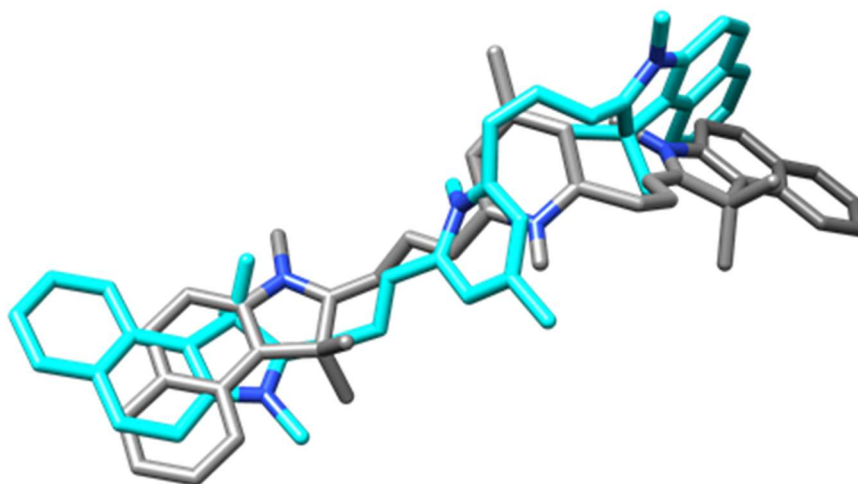
**Рисунок 28 - Связывание БКЦ4 с ЧСА. А - общий вид структуры ЧСА и положение сайта связывания полиметинового красителя. Б - детальная структура сайта связывания полиметинового красителя. Молекула лиганда представлена серой шариковой моделью. Аминокислотные остатки, расположенные в пре делах 4 Å от него, показаны в виде моделей бежевых палочек. В - вид кармана для связывания красителя в структуре ЧСА. Поверхность белка Connolly окрашена в соответствии с молекулярным липофильным потенциалом от коричневых (гидрофобных) до синих (гидрофильных) областей. Молекула лиганда представлена серой моделью.**

Для альбумина связывание имеет в основном неспецифическую природу, основанную главным образом на гидрофобных взаимодействиях. Кроме того, существует дополнительный вклад в связывание от слабого нековалентного взаимодействия за счет  $\pi$ - $\pi$ -стекинга между остатком Tyr452 и центральным пиридиновым кольцом (Рисунок 30). Моделирование позволяет оценить расстояние между двумя ароматическими кольцами, которые взаимодействуют через  $\pi$ - $\pi$  стекинг. Полученное значение равно 4,241 Å. Согласно работе [123] полученные значения для расстояния между двумя ароматическими кольцами 4,1 4,4 Å, возникающие при параллельно-смещенном  $\pi$ - $\pi$  взаимодействии, рассчитанные для центроидов, являются обоснованными.



**Рисунок 29 - А. - $\pi$ - $\pi$ - стэкинговое взаимодействие между пиридиновым кольцом красителя и остатком Tyr452. Б. Совмещение геометрических центров бензольного кольца Tyr452 и пиридинового кольца БКЦ4 для вычисления расстояния между двумя ароматическими кольцами. Молекула лиганда представлена серым шаром, остаток Tyr452 представлен синим шаром.**

Полученные в системе докинга Autodoc данные показывают, что исследуемые два режима докинга имеют незначительные различия в энергии связи, которая составила 0,3 ккал/моль. Это позволяет сделать вывод, молекула красителя может незначительно изменять свою конформацию в пределах связывающего узла, переходя из одного режима связывания в другой. Кроме того, наложение двух конформеров с наименьшей энергией в соответствующих им конформациях в месте связывания предполагает необходимость незначительного вращения определенных структурных фрагментов для перехода молекулы из одного состояния в другое (Рисунок 31). Предположение о таких энергетически низких переходах не противоречит механизму, полученному в результате спектральных исследований.



**Рисунок 30 - Наложение структур двух режимов докинга. Молекулы конформеров представлены серыми и голубыми моделями, атомы азота окрашены в темно-синий цвет.**

Данный сайт связывания является наиболее вероятным. Однако следует отметить, что связывание в других участках альбумина также возможно. Таким образом, анализ результатов молекулярного докинга позволяет предложить механизм образования комплекса между молекулой БКЦ4 и ЧСА, который хорошо коррелирует с механизмом, полученным в спектральном и флуоресцентном экспериментах.

Был охарактеризован бискарбоцианиновый краситель ранее неопisanного подтипа с интегрированным гетероциклическим фрагментом в полиметиновой цепи, комплексообразование красителя с ЧСА было показано методами спектрофотометрии, спектрофлуориметрии и TCPSC. Комплексообразование БКЦ4 и альбумина изменяет спектр поглощения и увеличивает интенсивность флуоресценции. Экспериментально определенное значение константы связывания ( $\sim 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) указывает на высокую аффинность связывания красителя с альбумином. Комбинация различных методов, основанных на флуоресценции красителя, позволяет нам предложить существование по меньшей мере трех типов комплексов между БКЦ4 и ЧСА, которые образуются в результате перегруппировок первично образованного комплекса перераспределением между сайтами связывания ЧСА. Формирование наиболее стабильного

комплекса происходит в течение нескольких минут. В уравновешенных растворах красителя с различными концентрациями ЧСА были зарегистрированы комплексы с различным временем жизни флуоресценции и спектрами флуоресценции, что указывает на образование нескольких комплексов, возникающих в результате различного сродства красителя к доступным сайтам связывания в белке. Ясно, что комплекс с наибольшим временем жизни флуоресценции и смещенным спектром флуоресценции в NIR образует более жесткую структуру. Комплекс с более длительным временем жизни флуоресценции демонстрирует увеличение флуоресценции и, следовательно, уменьшение внутренней конверсии путем *цис-транс* изомеризации. Предпочтительная структура комплекса и выводы о его более жесткой природе были подтверждены с помощью молекулярного докинга и молекулярной динамики. Результаты работы служат основой для дальнейших экспериментов по оценке клеточного накопления и распределения БКЦ4-ЧСА с помощью флуоресцентной визуализации и конфокальной микроскопии.

### **Проблема оксигенации фотосенсибилизатора.**

Цианиновые красители (ЦК) широко применяются в биологии, как флуоресцентные маркеры ввиду их высокой молярной экстинкции и интенсивной флуоресценции в видимой области спектра и высоком сродстве к клеточным структурам [124, 125]. Спектры поглощения ЦК могут быть легко смещены в красную и ближнюю инфракрасную области спектра путем изменения их химической структуры, например, путем увеличения длины  $\beta$ -сопряженной хромофорной цепи. Это стимулирует интерес к применению ЦК в качестве фотосенсибилизаторов (ФС) в фотодинамической терапии рака (ФДТ) и флуоресцентных маркеров в флуоресцентной диагностике рака (ФДД) [126–128]. К сожалению, значительное увеличение длины  $\beta$ -сопряженной хромофорной цепи, которая смещает поглощение в желаемую область спектра, одновременно увеличивает гибкость цепи, тем самым уменьшая квантовые выходы флуоресценции и триплетного состояния, а также химическую и

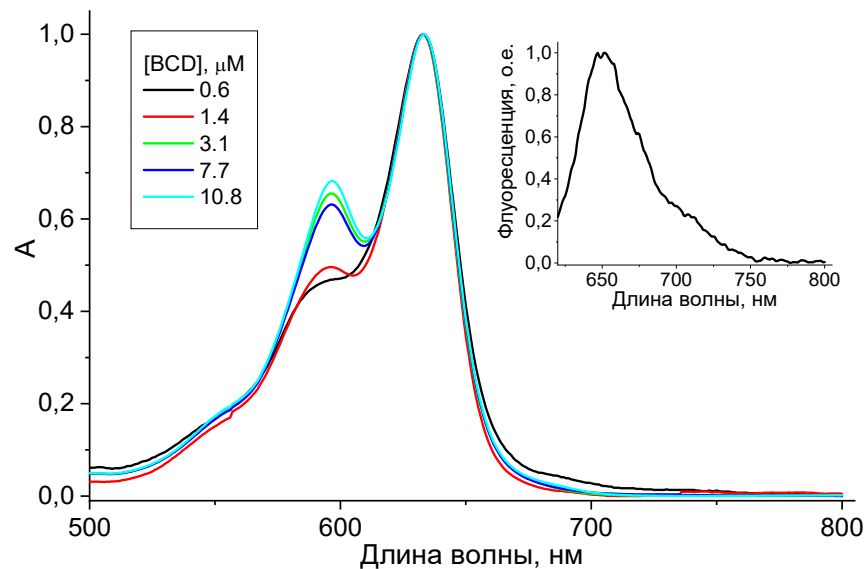
фотохимическую стабильность молекулы. Кроме того, фотоизомеризация, характерная для ЦК [129–131], открывает еще один канал для рассеивания энергии возбуждения, еще больше сокращая время жизни возбужденного состояния и квантовые выходы и, таким образом, снижая эффективность ЦК в ФДТ и ФДД. Класс цианиновых красителей с двумя хромофорами, связанными центральным гетероциклом (бисцианиновые красители, БКЦ), лишен этих недостатков, поскольку смещение спектров поглощения в красную область достигается за счет диполь-дипольного взаимодействия хромофоров и туннелирования электронов через центральный гетероцикл [95, 132], а не увеличение длины цепи хромофора. БКЦ обладают коэффициентами молярного поглощения  $\varepsilon > 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  в области спектра 600–700 нм, высоким сродством к клеточным мембранам и биомолекулам, а также высоким триплетным квантовым выходом [104].

При применении красителя в ФДТ он может деградировать от фототрансформации. Этот процесс может конкурировать с фотодинамическим эффектом при медицинском применении, уменьшая концентрацию ФС, тем самым снижая эффективность лечения. Кроме того, образующиеся фотопродукты могут быть токсичными, что может оказывать негативное влияние. Фототрансформация происходит параллельно с фотодинамической терапией, и этот процесс можно контролировать, вызывая фототрансформацию ФС и/или образование фотопродуктов [99].

Один из механизмов фотоактивности ФС в ФДТ связан с образованием синглетного кислорода. Синглетный кислород может атаковать собственные молекулы ФС, вызывая тем самым его деградацию. Другим важным фактором является агрегация ФС, характерная для большинства органических ФС в водных средах. Агрегация уменьшает время жизни и квантовые выходы возбужденных состояний ФС, тем самым снижая их фотоактивность и, в частности, образование синглетного кислорода [133].

Спектр поглощения БКЦ в водных растворах при концентрации ниже  $10^{-6} \text{ M}$  характеризуется интенсивным поглощением в диапазоне 450 - 700 нм, с

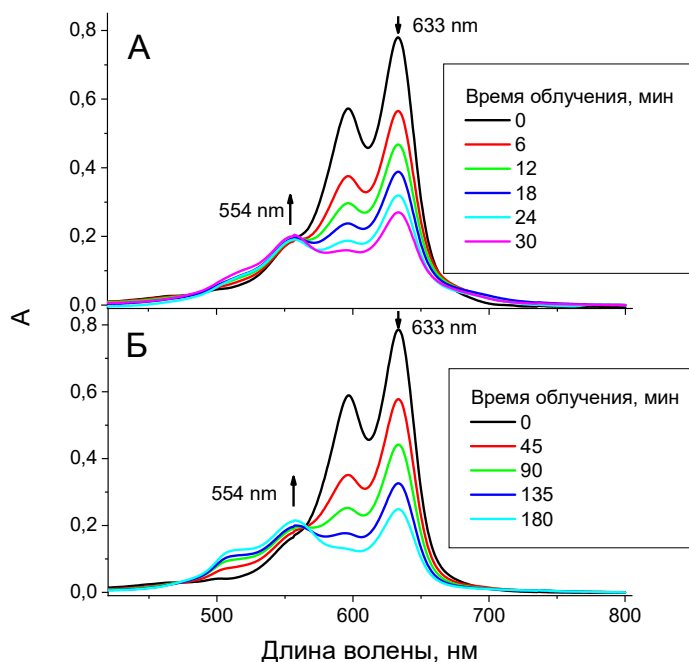
максимумом с центром в точке 633 нм (Рисунок 31). В этом диапазоне концентраций поглощение БКЦ4 пропорционально его концентрации, причем профиль спектров поглощения практически не изменяется, что относится к мономерной форме красителя. При более высоких концентрациях спектр изменяется, и новая полоса поглощения появляется с максимумом при 597 нм (Рисунок 32), который сопоставим с образованием агрегатов красителя. Положение этой полосы поглощения в более коротковолновой области длин волн, чем у мономера, подтверждает предположение об образовании Н-агрегатов [134, 135]. Полученные результаты соответствуют результатам, полученным в [136].



**Рисунок 31 - Нормализованные спектры поглощения БКЦ в воде при различных концентрациях белка. Вставки: БКЦ - спектр флуоресценции,  $\lambda_{ex} = 600$  нм.**

В гомогенных водных растворах БКЦ обладает квантовым выходом флуоресценции  $\phi_{фл} \approx 0,02$  [13]. Увеличение концентрации не влияет на профиль спектра флуоресценции БКЦ, в то время как  $\phi_{фл}$  уменьшается с увеличением концентрации БКЦ. Облучение растворов БКЦ, как в присутствии кислорода, так и после его удаления под вакуумом, уменьшает оптическую плотность раствора

в области поглощения БКЦ и индуцирует образование новой полосы поглощения с центром в области 554 нм.



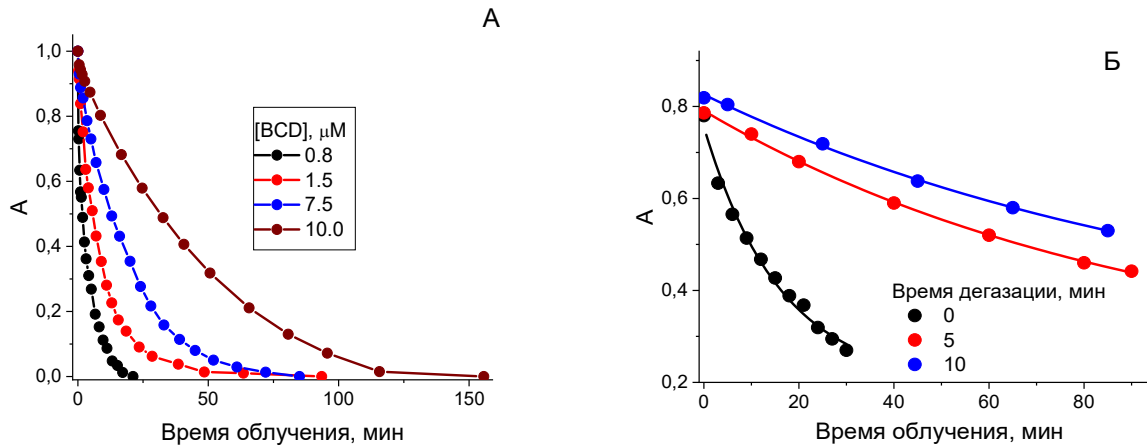
**Рисунок 32 - Спектр поглощения [БКЦ] = 5,9 мкМ как функция времени облучения в присутствии кислорода (А) и после удаления кислорода (В).**

При одних и тех же условиях облучения уменьшение абсорбционной способности раствора  $A$  в зависимости от времени облучения при любой концентрации БКЦ, как в присутствии, так и в отсутствии кислорода, соответствует моноэкспоненциальному закону,

$$A = A_0 e^{-t/\tau} \quad (1)$$

где  $A_0$  - начальная оптическая плотность раствора, а  $\tau$  - характерное время затухания.





**Рисунок 33 - А. Нормализованные кривые затухания оптического поглощения БКЦ при различных концентрациях БКЦ в присутствии кислорода; Б. Кривые деградации поглощения растворов [БКЦ] = 6,0 М при различных временах удаления кислорода.**

В соответствии с законом Ламберта-Бера уравнение (1) можно представить в виде:

$$\varepsilon[\text{БКЦ}]l = \varepsilon[\text{БКЦ}_0]le^{-t/\tau}$$

Или

$$[\text{БКЦ}] = [\text{БКЦ}_0]e^{-t/\tau} \quad (2)$$

где  $\varepsilon$  является коэффициентом молярной экстинкции БКЦ,  $[\text{БКЦ}]$  и  $[\text{БКЦ}_0]$  являются текущей и начальной концентрациями БКЦ и  $l$  - длина оптического пути кюветы.

Скорость фототрансформации  $V$  составляет:

$$V = \frac{d[\text{БКЦ}]}{dt} = -\frac{[\text{БКЦ}_0]}{\tau}e^{-t/\tau} \quad (3)$$

Начальная скорость  $V_0$  ( $t = 0$ ) составляет:

$$V_0 = -\frac{[\text{БКЦ}_0]}{\tau} \quad (4)$$

Таким образом, начальная скорость фототрансформации зависит от начальной концентрации БКЦ, также как период  $\tau$  или константа скорости фототрансформации  $k$ :

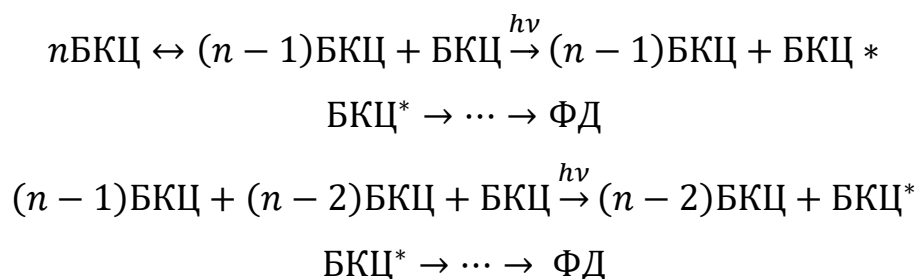
$$\frac{V_0}{[\text{БКЦ}_0]} = \frac{1}{\tau} = k \quad (4)$$

При одинаковых условиях облучения эффективность фототрансформации должна характеризоваться независимо от начальной концентрации БКЦ. Однако увеличение концентрации БКЦ сильно снижает значение  $k$  (Рисунок 34, Таблица 8).

**Таблица 8 - Константа скорости фотопреобразования БКЦ  $k \times 10^3$  при различных концентрациях БКЦ в присутствии кислорода.**

(БКЦ), $\mu\text{M}$	0,8	2,0	4,0	6,0	7,5	9,0	10,0
$k \times 10^3, \text{s}^{-1}$	$3,3 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,04$	$0,6 \pm 0,02$	$0,4 \pm 0,01$

При концентрации БКЦ выше  $1 \mu\text{M}$  в водных растворах существует равновесие между БКЦ в мономерной форме и агрегатами, которые с ростом концентрации красителя увеличивают свою долю. Агрегация уменьшает время жизни возбужденных состояний БКЦ, тем самым уменьшая их участие в фотопреобразовании БКЦ. Следовательно, только мономеры БКЦ могут быть фототрансформированы, таким образом снижая общую концентрацию БКЦ и вызывая ее дезагрегацию. В этом случае агрегаты БКЦ можно считать источником мономеров БКЦ в соответствии со схемой:



где  $n$  - число агрегатов,  $\text{БКЦ}^*$  - мономер в возбужденном состоянии БКЦ, а ФД - продукт фототрансформации БКЦ.

Удаление кислорода резко снижает значение  $k$ , демонстрируя его участие в фотопреобразовании БКЦ. Тем не менее, ФД по-прежнему возникает после удаления кислорода из раствора. Это означает, что существует другой способ фототрансформации БКЦ, не связанный с присутствием кислорода. Вместе с тем значение  $k$  продолжает постепенно уменьшаться, когда увеличивается время вакуумирования кислорода (Рисунок 35, Таблица 9)

**Таблица 9 - Зависимость скорости  $k \times 10^3$  фототрансформации БКЦ от времени вакуумирования образцов  $t$  для [БКЦ] 6.0  $\mu\text{M}$ .**

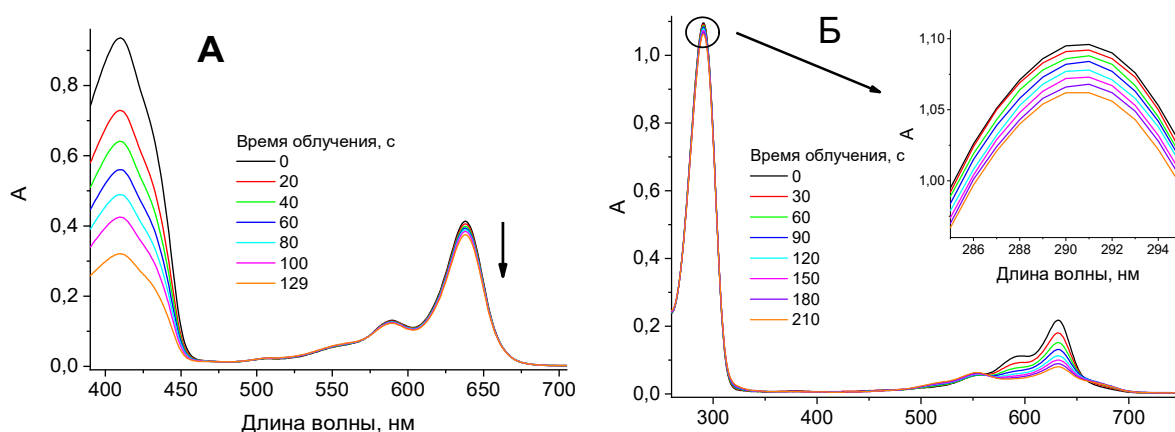
$t$ , мин	0	5	10	15	20	25	30
$k \times 10^3, \text{s}^{-1}$	$1,0 \pm 0,1$	$0,19 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$

Полученные данные позволяют связать это значение  $k$  с остатком кислорода, который продолжает растворяться после процедуры дегазации.

Ранее было продемонстрировано, что фотоактивация БКЦ переводит краситель возбужденное триплетное состояние [104]. Поэтому мы можем связать влияние кислорода при фототрансформации БКЦ с синглетным кислородом, образующимся при передаче энергии от молекул БКЦ в триплетных состояниях к кислороду. Синглетный кислород может реагировать с молекулами БКЦ, трансформируя их структуру.

Чтобы подтвердить эту гипотезу, было показано образование синглетного кислорода при облучении раствора БКЦ и определен его квантовый выход ( $\Delta \phi$ ) в этаноле и PBS.

Облучение БКЦ в присутствии 1,3-дифенилизобензофурана (DPBF) или мочевиной кислоты (UA) вызывает снижение оптической плотности красителя (Рисунок 35), что указывает на образование синглетного кислорода.



**Рисунок 34 - Спектры поглощения А. DPBF + БКЦ в этаноле и Б. UA + БКЦ в PBS зависимость оптической плотности от времени облучения.**

$\Phi_{\Delta S \Delta s}$  были вычислены с помощью уравнения [24]:

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta}^0 \frac{\gamma_{\Delta}}{\gamma_{\Delta}^0} \quad (5)$$

где  $\Phi_{\Delta}^0$  квантовый выход синглетного кислорода стандарта (метиленового синего), который составляет 0,52, как в этаноле, так и в PBS  $\gamma_{\Delta}^0$  и  $\gamma_{\Delta}$  являются химической фотодинамической эффективностью стандарта и соединения, соответственно. Химическая фотодинамическая эффективность была оценена уравнением:

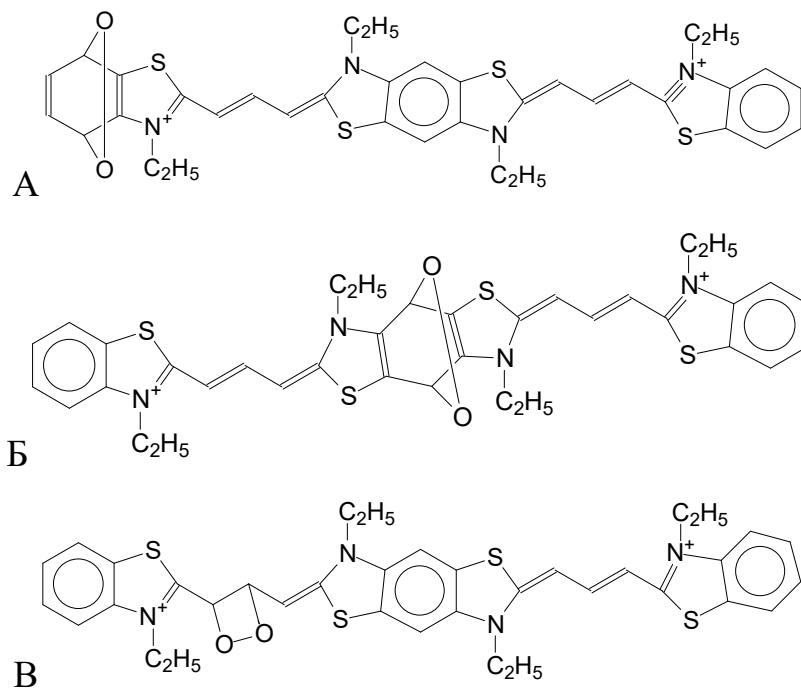
$$\gamma_{\Delta} \propto \frac{k_1}{N_{Abs}} \quad (6)$$

где  $k_1$  уровень потребления синглетного кислорода (мочевая кислота или 1,3-дифенилбензофуран) в присутствии фотосенсибилизатора (ФС);  $N_{abs}$  является скорость поглощения света оптической PS, которая была рассчитана по уравнению:

$$N_{Abs} = \frac{1}{N_a h c} \int_0^t \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} P_{(\lambda)} I_0 (1 - 10^{-bc\epsilon}) e^{-k_{PT}t} d\lambda dt \quad (7)$$

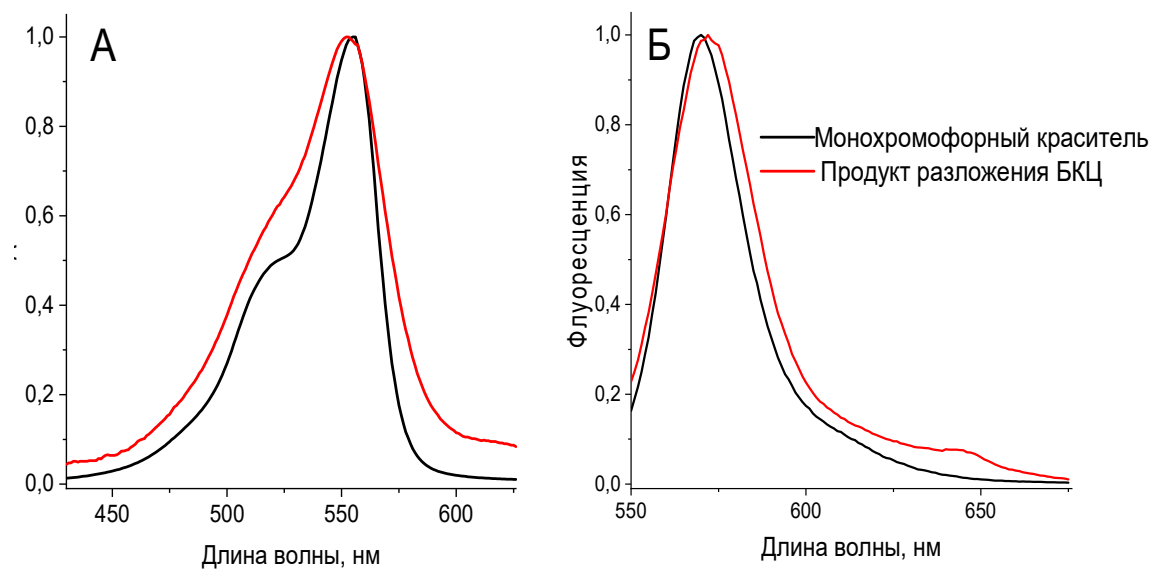
где  $P_{(\lambda)}$  представляет активность источника света на каждой длине волны; Параметр  $I_0 (1 - 10^{-bc\epsilon})$  показывает интенсивность света, поглощаемого системой; и величина  $e^{-k_{PT}t}$  является коррекцией оптической плотности ФС из-за его фотопреобразования (ФТ). Расчетные значения БКЦ  $\Phi_{\Delta}$  составили 0,043 в этаноле и 0.061 в PBS.

Высокая реакционная способность синглетного кислорода по отношению к двойным связям хорошо показана в [137]. Структура БКЦ позволяет реакции оксигенации БКЦ протекать по нескольким путям. несколькими вариантами этой реакции. Среди них наиболее вероятным является взаимодействие кислорода с концевым гетероциклом БКЦ (Рисунок 36 А), с его центральным гетероциклом (Рисунок 36 Б) и / или с  $\pi$ -конъюгированной хромофорной цепью (Рисунок 36 В).



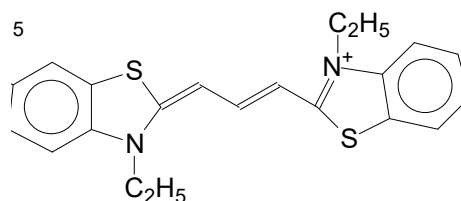
**Рисунок 35 - Возможные структуры продукта фототрансформации БКЦ**

Спектр поглощения и флуоресценции (Рисунок 37) продукта фототрансформации БКЦ аналогичен симметричным монохроморным цианиновым красителем с той же длиной хромофорной цепи (Рисунок 32).



**Рисунок 36 - Спектры поглощения (А) и флуоресценции (Б) монохроморного цианинового красителя и продукта фотопреобразования БКЦ после 3-часового облучения.**

Облучение бихромофорного цианинового красителя видимым светом в фосфатном буфере вызывает его фототрансформацию, связанную с оксигенацией хромофора красителя синглетным кислородом. Синглетный кислород образуется при передаче энергии из возбужденного красителем триплетного состояния, которое, в свою очередь, образуется при облучении красителя. Увеличение концентрации красителя снижает скорость его фототрансформации из-за агрегации красителя, что уменьшает время жизни и квантовый выход триплетного состояния красителя, тем самым снижая вероятность образования синглетного кислорода и, следовательно, оксигенации красителя [138].



**Рисунок 37 - Монохромофорная структура цианинового красителя**

Окисление концевых гетероциклов (Рисунок 36а) может изменить полосу поглощения хромофора из-за разрушения симметрии хромофора. Данное явление должно уменьшить диполь-дипольное взаимодействие между хромофорами красителя. Окисление центрального гетероцикла (Рисунок 36б) должно снизить вероятность туннелирования электронов между хромофорами из-за разрушения сопряжения в центральном гетероциклическом кольце. Однако диполь-дипольное взаимодействие между хромофорами должно оставаться неизменным. Окисление хромофорной цепи (Рисунок 36в) должно разрушить ее  $\pi$ -сопряжение, исключая как электронное туннелирование, так и диполь-дипольное взаимодействие между хромофорами. В действительности в этом случае продукт будет содержать только один хромофор, и его спектр должен совпадать с монохромофорным красителем, который наблюдался экспериментально.

### 3.4. Фотохимия возбужденных состояний ИКЦ1-3.

Процессы деградации синглетного и триплетного возбужденных состояний молекулы являются определяющим параметром при определении фотоактивности соединения. Если вещество обладает высоким квантовым выходом интеркомбинационной конверсии, возможно фотоповреждение клеточных структур за счет участия молекулы в триплетном состоянии в реакции фотопереноса электрона, а также триплет-триплетной аннигиляции с образованием синглетного кислорода. При разработке флуорофоров для ангиографии одним из определяющих факторов является отсутствие фотосенсибилизирующего действия при прямом фотовозбуждении. Поскольку время жизни триплетного состояния на 5 порядков длиннее (до нескольких миллисекунд) по сравнению с синглетно-возбужденным состоянием, то вероятность вступления в химическую реакцию существенно выше.

Использование кардиолина в качестве флуорофора предполагает низкое значение квантового выхода триплетного состояния этого красителя, с целью избежать нежелательных фотосенсиблированных процессов. В литературе [128] предлагается два механизма действия фотосенсибилизатора, в которых реакционноспособными частицами рассматриваются синглетный кислород или супероксид анион-радикал. В образовании этих двух промежуточных продуктов важную роль играют процессы переноса энергии и процессы фотопереноса электрона с участием триплетного состояния, что и обуславливает интерес к спектрально-кинетическим характеристикам триплетных состояний фотосенсибилизаторов.

Имеются данные [78] об эффективной фотосенсибилизации различных фотобиологических процессов при использовании в качестве фотосенсибилизатора ИКЦ1 и его аналогов, что также требует изучения реакционной способности триплетного состояния. Также сообщалось, что краситель ИКЦ1 способен оказывать токсический эффект под действием света на клетки сетчатки глаза [84] генерировать синглетный кислород, влияние которого делает ИКЦ1 фотосенсибилизатором [79].

Использование ИКЦ1 и сходных по структуре индотрикарбоцианинов в медицине в качестве флуорофора для ангиографии возможно только при условии отсутствия фотосенсибилизации, так как деструктивные фотопроцессы могут привести к негативным последствиям и разрушению клеточных структур при проведении диагностики. С другой стороны в случае высокого квантового выхода триплетного состояния у красителя это соединение может быть потенциальным фотосенсибилизатором в ФДТ. В литературе отсутствуют прямые исследования спектрально-кинетических характеристик триплетов кардиофина, что затрудняет оценку его реакционной способности. Данные по оценке квантового выхода триплетов кардиофина имеют противоречивый характер [79, 86, 87].

Ранее имелись сведения о существовании короткоживущего триплетного состояния [139], а также сведения о наличии более долгоживущего состояния [88], дифференцируемого с цис-транс фотоизомеризацией в водном растворе, и отсутствии триплетного состояния в комплексе с белком [9]. Исходя из одних литературных данных оно оказывает выраженное фотодинамическое действие [89], что согласуется с утверждением [12] о высоком выходе интеркомбинационной конверсии. В то же время имеются сообщения о том, что ИКЦ1 можно использовать в качестве реагента для определения квантового выхода синглетного кислорода на таких фотосенсибилизаторах как Eosin Y [54]. Также производить нейтрализацию активных форм кислорода, генерируемых хлорином Е6 [13]. Одновременно с этим сообщает о применении ИКЦ1 как фотосенсибилизатора [87, 90]. Таким образом регистрируемый окислительный стресс при облучении красителя, находящегося в клетках, могут быть продуктами разложения ИКЦ1 под действием света. Приводимые в литературе данные о квантовом выходе триплетного состояния ИКЦ1 варьируются у одних и тех же авторов от 0.1-0.2 [86] до  $5 \times 10^{-5}$  [91]. Время жизни триплетного состояния оцениваются [86] в 1нс как и время жизни фотоизомера, а [91] регистрируют время жизни триплетного состояния 700 нс, однако время жизни фотоизомера оценивают как 430 нс. Однако, в этих работах не было прямой



регистрации триплетных состояний ИКЦ1, что вызывает критическое отношение к интерпретации экспериментальных данных этих работ. Важно предупреждать фотоионизацию при импульсном фотолизе [14], необходимо отсекалть светофильтрами жесткое УФ-излучение.

Важную роль в процессе безизлучательной деградации энергии электронного возбуждения для цианиновых красителей играет процесс транс-цис фотоизомеризации. Для некоторых производных бензотиа- и бензоксокарбоцианиновых красителей процесс фотоизомеризации является основным процессом деградации энергии электронного возбуждения, в то время как вклад флуоресценции для красителей с незакрепленной полиметиновой цепью составляет несколько процентов[92]. Вследствие высокого значения константы фотоизомеризации и константы флуоресценции вклад запрещенного процесса интеркомбинационной конверсии чрезвычайно мал (квантовый выход триплетов близок к нулю). В процессе фотоизомеризации при отсутствии стерических препятствий поворот вокруг полиметиновой цепи осуществляется на угол  $180^\circ$  с образованием достаточно долгоживущего фотоизомера с временем жизни от 10 до 100 мс [140]. В случае стерических препятствий, когда полный поворот не может быть осуществлен, происходит образование затрудненного короткоживущего (100 нс - 1 нс) фотоизомера и при этом угол поворота может составлять  $60^\circ$ – $120^\circ$ , величину значительно меньшую  $180^\circ$ . Энергия активации для обратной темновой цис-транс изомеризации для этих затрудненных короткоживущих фотоизомеров значительно меньше (4–8 ккал /моль) по сравнению с энергией активации реакции для полиметиновых красителей без стерических препятствий при полном повороте вокруг полиметиновой цепи (16 ккал /моль) [140]. Такая быстрая фотоизомеризация является доминирующим процессом деградации энергии и запрещенный процесс интеркомбинационной конверсии, для которого характерны невысокие значения констант скорости, не вносит существенного вклада в процесс деградации энергии, что и приводит к чрезвычайно низким значениям квантового выхода триплетного состояния.

С использованием триплет-триплетного переноса энергии методом импульсного фотолиза ранее были зарегистрированы спектры поглощения триплетных состояний для ряда бензтиазольных и оксазольных карбоцианиновых красителей с различной длиной полиметиновой цепи [1, 38, 97]. Образование триплетного состояния для ИКЦ1 было показано по выцветанию основной полосы поглощения в процессе переноса энергии методом импульсного радиолиза [25] и методом импульсного фотолиза [9]. В настоящей работе методом импульсного фотолиза установлены спектральные и кинетические характеристики триплетного состояния ИКЦ1 в широком спектральном диапазоне (видимой и ближней ИК области спектра).

Для определения фотосенсибилизирующей активности красителя ИКЦ1-3 были охарактеризованы методом импульсного фотолиза. Эксперименты проводились при различных концентрациях красителя:

Прямое фотовозбуждение на установке импульсного фотолиза в основную полосу поглощения при 790 нм ИКЦ1 (светофильтр КС-17, интервал концентраций ИКЦ1  $10^{-6}$  -  $10^{-5}$  М) в растворе этанола в отсутствие кислорода в диапазоне времен 10 мксек - 10 мсек не приводило к появлению в спектре наведенного поглощения во всем интервале от 500 до 1200 нм, которое можно было бы отнести к поглощению короткоживущих промежуточных продуктов. Таким образом, прямое фотовозбуждение ИКЦ1 не приводит к образованию триплетных состояний, что свидетельствует о чрезвычайно низком квантовом выходе интеркомбинационной конверсии.

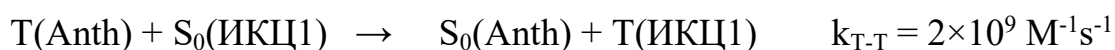
*Импульсный фотолиз обескислороженного раствора ИКЦ1 большой оптической плотности в EtOH при прямом фотовозбуждении.*

Проводили фотовозбуждение светом ксеноновой лампы, энергией 50 дж и использовании светофильтров КС-17, обескислороженный раствор ИКЦ1 в EtOH помещенный в 20 см кювету и имеющий оптическую плотность 2 на длине волны 790нм. После этого повторили опыт в тех же условиях, поместив в кювету обескислороженный раствор ИКЦ1 оптической плотностью 40 по длине в 20 см кюветы диаметром 1см на длине волны 790нм (таким образом оптическая

плотность на возбуждение была не более 2). Не было зарегистрировано образования наведенного поглощения во всем интервале от 830 до 1200 нм.

При проведении импульсного фотолиза раствора ИКЦ1 в глицерине при прямом фотовозбуждении не было зарегистрировано образование наведенного поглощения во всем диапазоне длин волн, также как и не было зарегистрировано кинетики выцветания полосы поглощения красителя. После фотолиза было замечено изменение спектра поглощения, соответствующее выгоранию красителя.

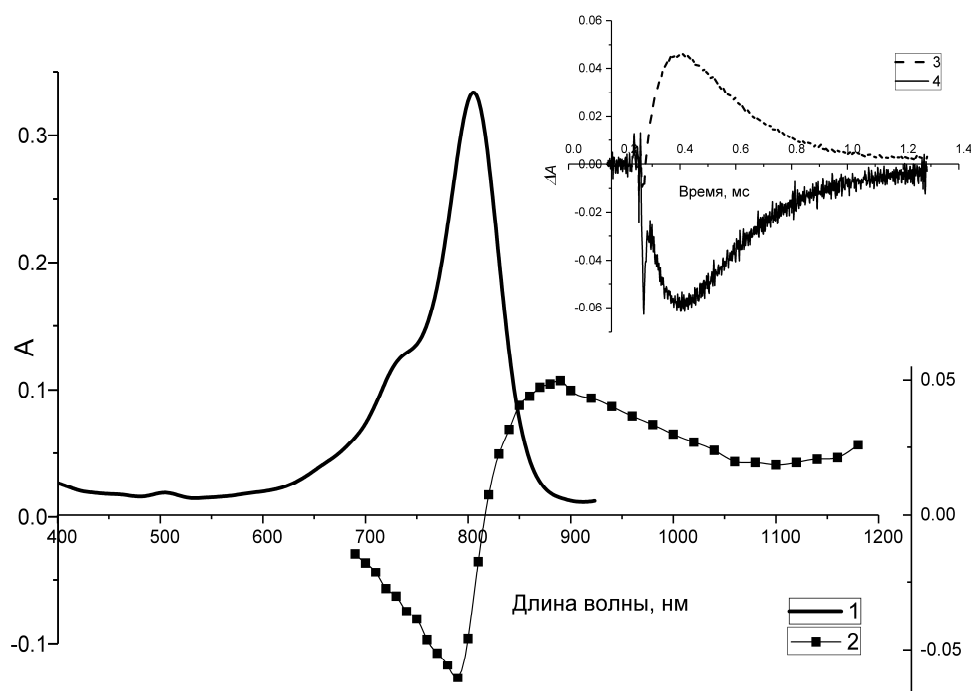
Фотовозбуждение на установке импульсного фотолиза в области 310 - 390 нм (фильтры УФС-6) растворов ИКЦ1 в этаноле в отсутствие кислорода в диапазоне времен 10 мкс - 10 мс также не приводило к появлению наведенного поглощения короткоживущих промежуточных продуктов в интервале видимой и ближней ИК области спектра. Однако, при тех же условиях фотовозбуждения в области 310 -390 нм раствора ИКЦ1 ( $10^{-5}$  М) в присутствии антрацена ( $5 \cdot 10^{-6}$  М) наблюдается тушение триплетного состояния антрацена и образование триплетного состояния ИКЦ1 в результате триплет-триплетного переноса энергии от триплета антрацена на ИКЦ1.



Уровень триплетной энергии для антрацена ( $14700 \text{ см}^{-1}$ ) значительно выше триплетного уровня ИКЦ1, который можно оценить, как  $11\,000 \text{ см}^{-1}$  ( $12600 - 1000 = 11600 \text{ см}^{-1}$ ). Константа триплет-триплетного переноса энергии близка к диффузионной константе, что свидетельствует о том, что энергия триплета антрацена значительно выше, чем триплетная энергия ИКЦ1. В экспериментах по T-T переносу энергии нами была впервые обнаружена новая интенсивная полоса поглощения триплетного состояния красителя ИКЦ1 в ближней ИК-области 850–1100 нм ( $\epsilon(900 \text{ нм}) \sim 2 \times 10^5 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ ). При прямом импульсном фотовозбуждении обескислороженных водных растворов комплексов красителя и альбумина ( $[\text{ИКЦ1}] = 3 \times 10^{-7} \text{ М}$ ,  $[\text{ЧСА}] = 5 \times 10^{-5} \text{ М}$ ) не зарегистрировано спектров поглощения промежуточных продуктов в области 500–1150 нм и не наблюдалось

выцветание полосы поглощения комплекса красителя при 780 нм. Таким образом, увеличение жесткости молекулярной структуры красителя в комплексе с альбумином недостаточно для увеличения вероятности интеркомбинационного перехода. Оценочное значение верхнего предела квантового выхода триплетного состояния комплекса ИКЦ1 и ЧСА составляет  $\phi_T < 1 \times 10^{-6}$ . При фотовозбуждении (780 нм) раствора комплекса ИКЦ1 и ЧСА не было зарегистрированного люминесценции при 1275 нм, характерной для синглетного кислорода. Используя эозин в качестве стандарта, было установлено оценочное значение квантового выхода синглетного кислорода для комплекса ИКЦ1 с ЧСА, которое составляет  $\phi_S < 1 \times 10^{-4}$ , что значительно меньше опубликованного в [86].

Поскольку имеющиеся в литературе данные расходятся, было принято целесообразным используя метод импульсного фотолитза установить существование триплетного состояния у красителя ИКЦ1 при прямом фотовозбуждении, оценить его положение используя сенсibilизированное заселение триплетного состояния, зарегистрировать спектр триплетного состояния [113].



**Рисунок 38 - Дифференциальный спектр красителя ИКЦ1 в EtOH. 1 синглетный. 2 спектр триплетного состояния ИКЦ1 при сенсibilизации**

антраценом. 3 кинетика образования наведенного поглощения на длине волны 860 нм, 4 кинетика выцветания красителя на длине волны 760 нм.

Квантовые выходы флуоресценции красителей ИКЦ1-3 в этаноле были определены при фотовозбуждении растворов красителей при 760 нм и оптической плотности 0,07. В качестве стандарта был использован раствор ИКЦ1, квантовые выходы составили менее 1%.

### 3.5. Фотохимия возбужденных состояний БКЦ1.

Появление новой интенсивной полосы поглощения в красном и ближнем ИК диапазоне, в сочетании с высоким квантовым выходом интеркомбинационной конверсии (ИКК), открывает возможность использовать бискарбоцианины как перспективные фотосенсибилизаторы в ФДТ.

Относительно высокий квантовый выход триплетного состояния отличает бискарбоцианиновые красители от многих цианиновых красителей, для которых низкий квантовый выход триплетного состояния обусловлен эффективно протекающим процессом внутренней конверсии (ВК) по механизму быстрой фотоизомеризации вокруг длинной полиметиновой цепочки.

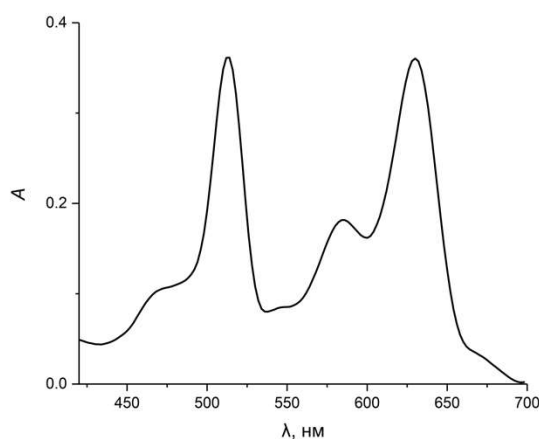
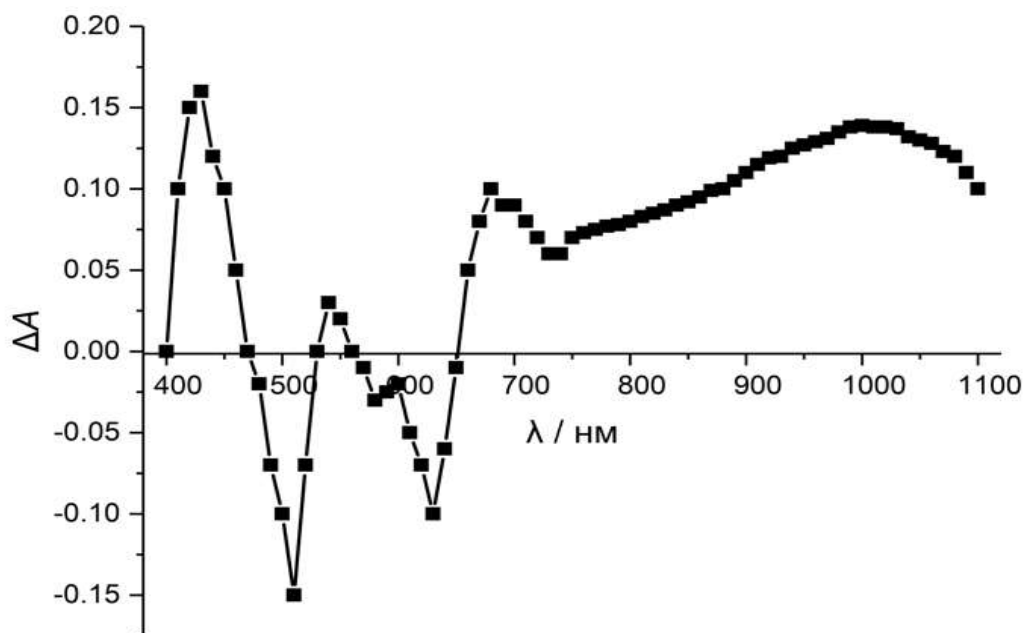


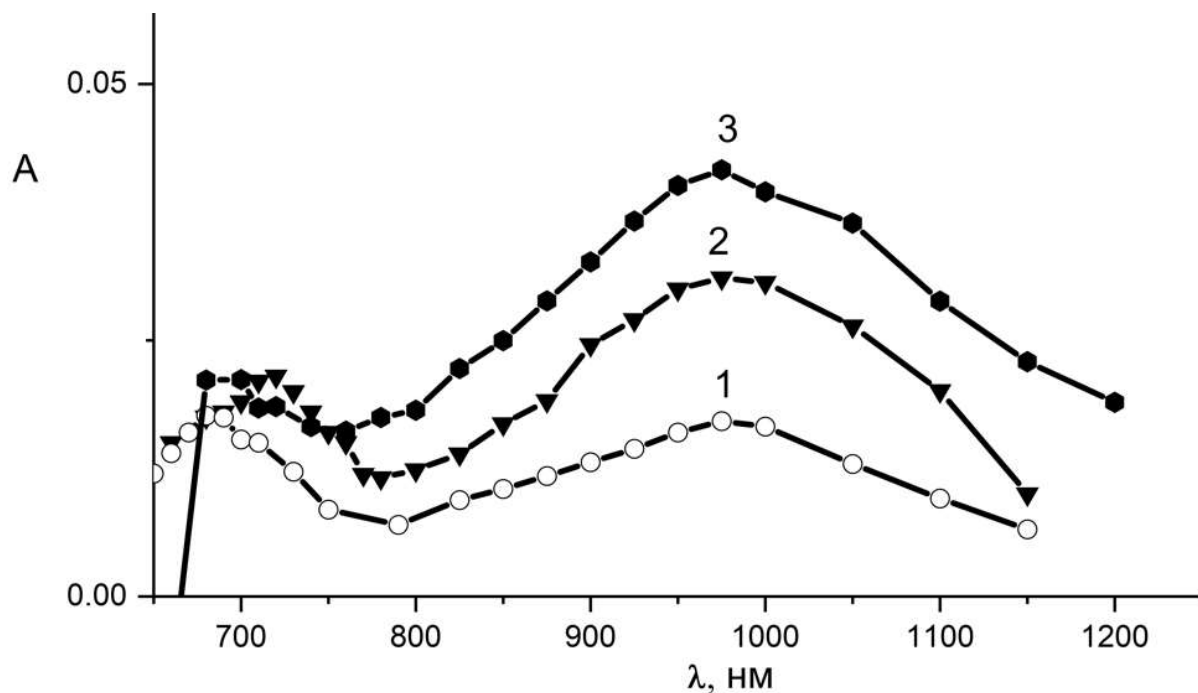
Рисунок 39 - Спектр поглощения красителя БКЦ1



**Рисунок 40 - Спектр триплетного состояния БКЦ1 ( $5 \times 10^{-7}$  М), сенсibilизированное заселение через антрацен ( $5 \times 10^{-5}$  М) возбуждение ксеноновой лампой методом импульсного фотолиза, фильтры УФС-6 (350-390 нм) в EtOH.**

В дифференциальном спектре поглощения промежуточных продуктов наблюдается возникновение полосы поглощения триплета бискарбоцианинового красителя в спектральном интервале 620–800 нм. Одновременно наблюдается выцветание основной полосы поглощения бискарбоцианинового красителя при 580 нм и ускорение кинетической реакции гибели триплетного состояния антрацена в присутствии БКЦ1 в соответствии с реакцией переноса энергии. Кинетика выцветания основной полосы поглощения БКЦ1 при 580 нм (в результате перехода синглетного состояния БКЦ1 в триплетное) и кинетика образования триплета БКЦ1 при 690 нм достигают максимумов с запаздыванием через 150 мкс после импульса фотовозбуждения, что при длительности импульса фотовозбуждения 15 мкс указывает на участие в этом процессе промежуточного триплетного состояния антрацена. Кинетики процессов тушения триплетов антрацена и возникновения триплетов БКЦ1 практически совпадают и характеризуются константой скорости переноса энергии  $k_{\text{ТТ}} = 2.2 \times 10^9 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ , что соответствует значениям констант скорости бимолекулярного процесса триплет-

триплетного переноса энергии в EtOH. Таким образом, данный эксперимент доказывает триплетную природу промежуточного состояния БКЦ1 и дает возможность более точно оценить уровень триплетной энергии бискарбоцианинового красителя, который может лежать в интервале  $10250\text{ см}^{-1}$  и  $14700\text{ см}^{-1}$ .



**Рисунок 41 - Спектр триплетного состояния БКЦ1**

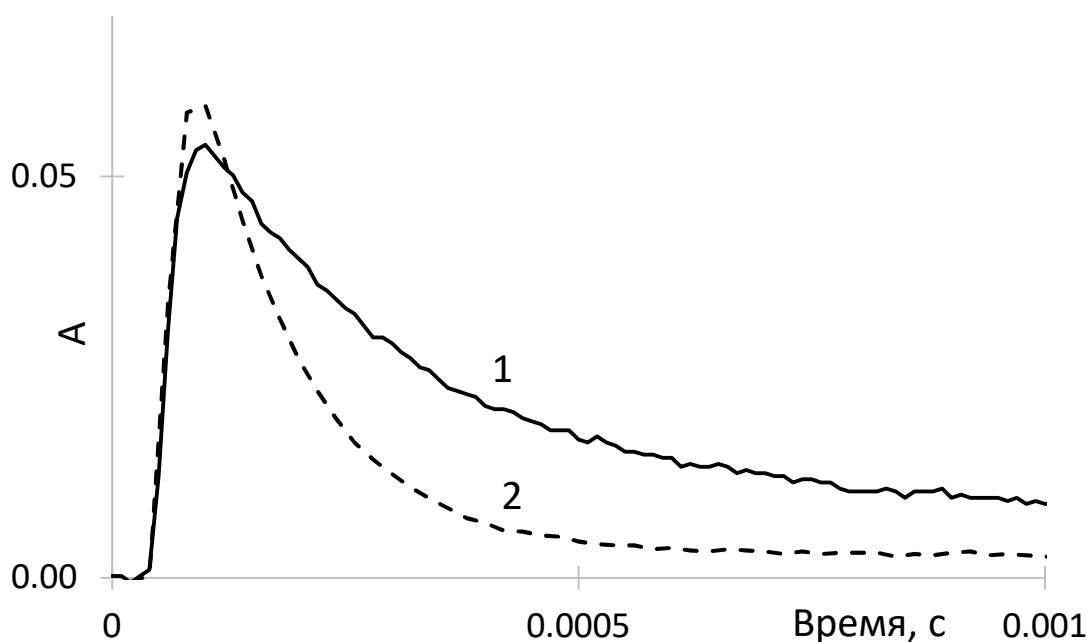
- 1. Спектр триплетного состояния красителя БКЦ1 в EtOH.**
- 2. Спектр триплетного состояния красителя БКЦ1 (90 градусов) в комплексе с альбумином  $c = 5 \times 10^{-4}$  моль/л при прямом фотовозбуждении (ЖС-10+СЗС-23).**
- 3. Спектр триплетного состояния красителя в комплексе с ДНК ( $5 \times 10^{-5}$  моль/л) при прямом фотовозбуждении (ЖС-10+СЗС-23).**

Методом глобального кинетического анализа данных, полученных при импульсном фотолизе красителя БКЦ1 в EtOH, показано наличие двух компонент триплетного состояния с различным спектром и вычислены константы скорости процессов их гибели:  $1,1 \times 10^3\text{ с}^{-1}$  и  $34\text{ с}^{-1}$ . Прямое фотовозбуждение раствора БКЦ1 ( $5 \times 10^{-5}$  М) в этаноле в отсутствие кислорода приводит к образованию короткоживущего триплетного состояния красителя с

максимумами T–T поглощения от 680 до 1200 нм. Гибель триплета подчиняется закону кинетики для реакции первого порядка, время жизни триплетного состояния составляет  $(600 \pm 60)$  мкс.

#### Тушение триплетного состояния БКЦ1 кислородом.

Кислород является эффективным тушителем возбужденных состояний красителя. Зарегистрирована кинетика триплетного состояния красителя БКЦ1 ( $8 \times 10^{-6}$  М) в EtOH на длине волны 690 нм при концентрации кислорода ( $3 \times 10^{-6}$  М).



**Рисунок 42 - Тушение T-состояния красителя БКЦ1 кислородом; 1. Кинетика гибели триплета красителя БКЦ1 ( $8 \times 10^{-6}$  М) без кислорода воздуха. Раствор в EtOH. 2. Кинетика гибели триплета красителя БКЦ1 ( $8 \times 10^{-6}$  М) в присутствии кислорода ( $3 \times 10^{-6}$  М).**

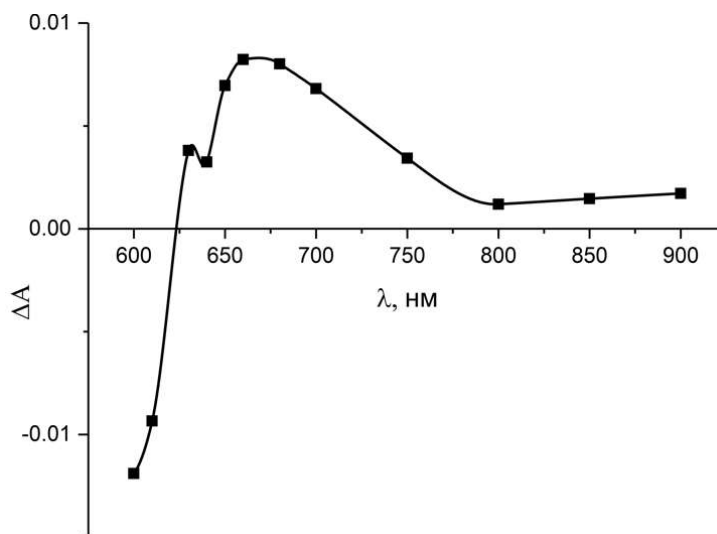
Была определена константа тушения триплетного состояния красителя БКЦ1 кислородом в спирте:  $k_q = 2,1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ .

#### Тушение триплета БКЦ ароматическим амином.

Охарактеризовано тушение триплетного состояния бискарбонаминового красителя (БКЦ1) в EtOH с N,N-диметиланилином (ДМА), 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксилом (ТЕМРО). Импульсное фотовозбуждение



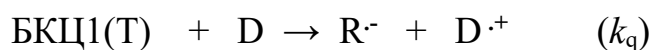
растворов бискарбоцианиновых красителей  $2 \times 10^{-6}$  М в органических растворителях приводит к заселению триплетного состояния с максимум Т-Т поглощения в области 1000 нм. Гибель Т является экспоненциальной с константой  $k = 1,15 \times 10^3 \text{ с}^{-1}$  только при очень малой концентрации Т. Отклонение от кинетики первого порядка при более высоких концентрациях обусловлено дезактивацией триплетного состояния в результате Т-Т аннигиляции, происходящей со скоростью, сопоставимой с диффузионной константой.



**Рисунок 43 - Спектр анионрадикала красителя при добавлении N,N-диметиланилина в EtOH.**

Фотовозбуждение раствора БКЦ1 ( $6 \times 10^{-7}$  М) в EtOH в отсутствие кислорода приводит к образованию короткоживущего триплетного состояния красителя с максимумом при 660 нм и временем жизни около 200 мкс. В присутствии N,N-диметиланилина (D) в концентрациях  $10^{-6}$ – $10^{-5}$  М наблюдается ускорение гибели триплетного состояния. Из зависимости кинетики гибели триплета от концентрации N,N-диметиланилина была вычислена константа скорости фотопереноса электрона на триплет БКЦ1 ( $k_1$ ). Значение константы фотопереноса электрона  $k_1 = 2,4 \times 10^9 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$  близко к значению диффузионной константы скорости для EtOH, что свидетельствует об эффективности этого процесса в жидкой фазе. N,N-диметиланилин необратимо реагирует с триплетом красителя.





Тушение триплетного состояния БКЦ(T) донором электрона приводит к появлению в дифференциальном спектре поглощения новой полосы с максимумом при 670 нм, которая соответствует полувосстановленной форме красителя  $\text{R}^-$  (анион-радикала) образовавшегося в результате переноса электрона от аскорбиновой кислоты на триплет красителя.

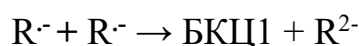
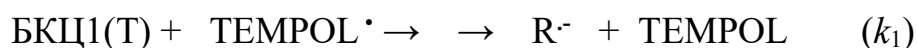
В результате фотопереноса электрона происходит разрушение одной из полиметиновых цепей в БКЦ1, что проявляется в исчезновении расщепления синглетного уровня БКЦ1.

Процесс разрушения хромофорной системы БКЦ1 в присутствии донора электрона, происходящий с участием триплетного состояния красителя, моделирует образование анион-радикала красителя в комплексе с белками при использовании БКЦ1 в качестве фотосенсибилизатора в процессах фотодинамической терапии. В качестве донора электрона в этих процессах могут выступать ароматические аминокислоты (тирозин, триптофан), входящие в структуру белка (например, альбумина). Одним из путей гибели полувосстановленной формы БКЦ1 может быть реакция с молекулярным кислородом, в результате которой при переносе электрона образуется супероксид анион радикал, который участвует в механизме фотодинамической терапии. Этот интермедиат может взаимодействовать с различными клеточными структурами и приводить к гибели раковых клеток в результате процессов некроза и апоптоза.

### **Тушение триплетных состояний БКЦ1 нитроксильным радикалом (ТЕМРО).**

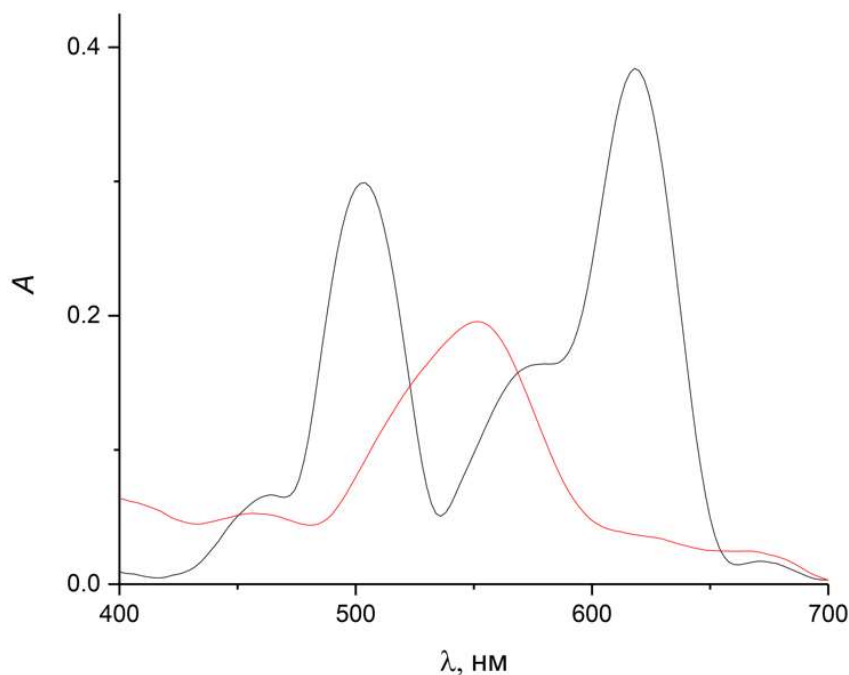
Обескислороженный раствор БКЦ1 ( $1.5 \times 10^{-6} \text{M}$ ) в этаноле в присутствии избытка ТЕМРОЛ ( $1 \times 10^{-3} \text{M}$ ) был охарактеризован методом импульсного фотолиза. Была оценена реакционная способность триплетных состояний БКЦ1 и процессы образования стабильных фотопродуктов красителя при взаимодействии с нитроксильным радикалом 4-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпипери-1-оксидом (ТЕМРОЛ).

Прямое фотовозбуждение раствора БКЦ1 ( $5 \times 10^{-5} \text{M}$ ) в этаноле в отсутствие кислорода приводит к образованию короткоживущего триплетного состояния красителя с максимумами T–T поглощения при 680 и 1000 нм. Гибель триплета происходит по реакции первого порядка, время жизни триплетного состояния составляет  $(600 \pm 60)$  мкс. При добавлении нитроксильного радикала в концентрациях  $(1-100) \times 10^{-6} \text{M}$  наблюдали уменьшение выхода триплетного состояния, при этом время жизни триплетного состояния уменьшается.

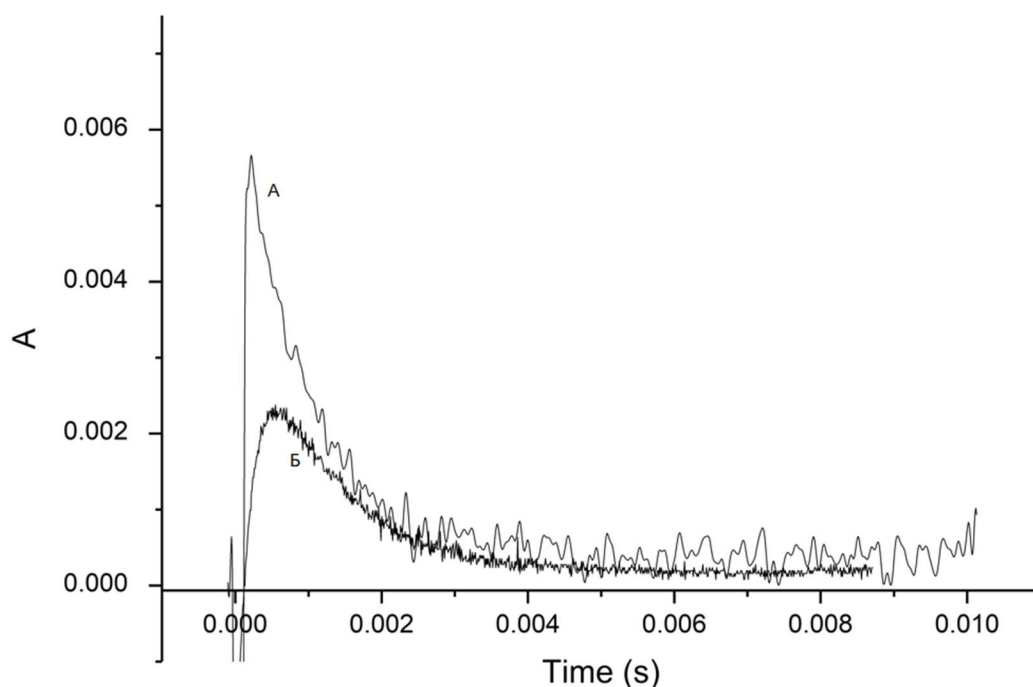


Из зависимости наблюдаемой константы скорости первого порядка гибели триплета от концентрации радикала была вычислена константа скорости взаимодействия триплета с радикалом  $(1,0 \pm 0.1) \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ . Обращает на себя внимание наблюдаемое увеличение времени образования триплета и уменьшение его максимальной концентрации в присутствии радикала (Рисунок 45). Это является следствием того, что TEMPO реагирует необратимо с триплетом красителя с момента его генерации в процессе ИКК. Это может означать или разрушение одной из полиметиновых цепей в БКЦ1, или исчезновение сопряжения между хромофорами в БКЦ1. После фотооблучения системы в спектре поглощения полностью исчезает спектр БКЦ1 с двумя максимумами при 502 и 618 нм (*БИС*), и появляется спектр с одним максимумом при 544 нм (*М*), который характерен для поглощения карбоцианиновых красителей (Рисунок 44). Разрушение хромофорной системы БКЦ1 в присутствии нитроксильного радикала происходит только при облучении, т.е. в этот процесс вовлечены возбужденные состояния красителя. В результате переноса электрона между нитроксильным радикалом и триплетом БКЦ1 происходит необратимая окислительно-восстановительная реакция, которая приводит в конечном счете к образованию структуры несимметричного (индол-бензтиазол) карбоцианинового красителя, который характеризуется спектром поглощения с максимумом при 544 нм и плечом колебательной структуры при 510 нм. Это может означать или разрушение одной из полиметиновых цепей в

БКЦ1, или исчезновение сопряжения между хромофорами в БКЦ1. Разрушение хромофорной системы БКЦ1 в присутствии нитроксильного радикала происходит только при облучении, т.е. в этот процесс вовлечены возбужденные состояния красителя. Таким образом, впервые установлено разрушение хромофорной структуры бискарбоцианинового красителя с образованием карбоцианина при взаимодействии возбужденного триплетного состояния БКЦ1 с нитроксильным радикалом [141].



**Рисунок 44 - Спектры поглощения БКЦ1 ( $1 \times 10^{-6}$  М) в присутствии TEMPOL ( $1 \times 10^{-3}$  М) в этаноле: до облучения импульсной лампой (черный) и после облучения импульсной лампой (красный).**



**Рисунок 45 - Кинетические кривые гибели триплета БКЦ1 при 1000 нм. А. - без добавок; Б. с добавками нитроксильного радикала, [TEMPO].**

#### **Фотохимия БКЦ1 в комплексе с альбумином.**

Комплексообразование и образование жесткой молекулярной структуры *бис*-карбоцианина с альбумином приводит к увеличению квантового выхода триплетного состояния фотосенсибилизатора в водном растворе и может способствовать фотохимическому разрушению внутриклеточных белков, что открывает новые возможности для практического использования *бис*-карбоцианинов при разработке фотосенсибилизаторов нового поколения для фотодинамической терапии.

Были проведены эксперименты методом импульсного фотолиза БКЦ1 в комплексе с альбумином. Кинетический анализ полученных данных указывает на наличие двух компонент с различной скоростью гибели триплетного состояния. Быстрая компонента ( $k = 5,9 \times 10^3 \text{ c}^{-1}$ ) ответственна за гибель красителя, находящегося вне комплекса с альбумином, медленная компонента ( $k=1,0 \times 10^3 \text{ c}^{-1}$ ) соответствует гибели комплекса триплетного состояния с альбумином. Различие в скоростях гибели триплетного состояния может быть объяснено наличием стерических затруднений комплекса красителя, что в свою

очередь затрудняет тушение триплетного состояния с альбумином в следствии стерических затруднений.

Сильное взаимодействие внутри комплекса БКЦ1–альбумин и экранирование может значительно уменьшать квантовый выход синглетного кислорода, например в какой-либо органелле клетки, если рассматривать альбумин, как модельный белок для такого рода взаимодействий. Этот эффект экранирования свидетельствует о незначительном вкладе синглетного кислорода в механизм фоторазрушения белковых структур в присутствии бискарбоцианинового красителя как фотосенсибилизатора. Однако сильное взаимодействие с альбумином дает возможность для более плотного контакта триплетного состояния БКЦ и одной из ароматических кислот, входящих в структуру альбумина (или другого белка внутриклеточной структуры). Такой ароматической аминокислотой может быть, например, для альбумина тирозин или аргинин, и в этом случае с учетом достаточно высокого уровня триплетного состояния появляется возможность реализации процесса фотопереноса электрона, в котором в качестве донора выступает ароматическая аминокислота. Образовавшийся при этом радикал красителя может взаимодействовать с кислородом, передавая ему электрон, с образованием супероксид анион радикала, который, в свою очередь, взаимодействуя с органеллами клетки, разрушает их.

В дифференциальном спектре поглощения промежуточных продуктов наблюдается возникновение полосы поглощения триплета бискарбоцианинового красителя в спектральном интервале 620–1000 нм. Одновременно наблюдается выцветание основной полосы поглощения бискарбоцианинового красителя при 580 нм. Реакционная способность красителей определяется, не столько положением триплетных уровней, а редокс-потенциалом красителей в основном состоянии и близостью расположения красителя к ароматическим кислотам в комплексе с альбумином. Расстояния между донором (краситель) и акцептором (ароматические аминокислоты) электрона будут определять эффективность фотопереноса электрона. Кроме того, важную роль в эффективности красителей

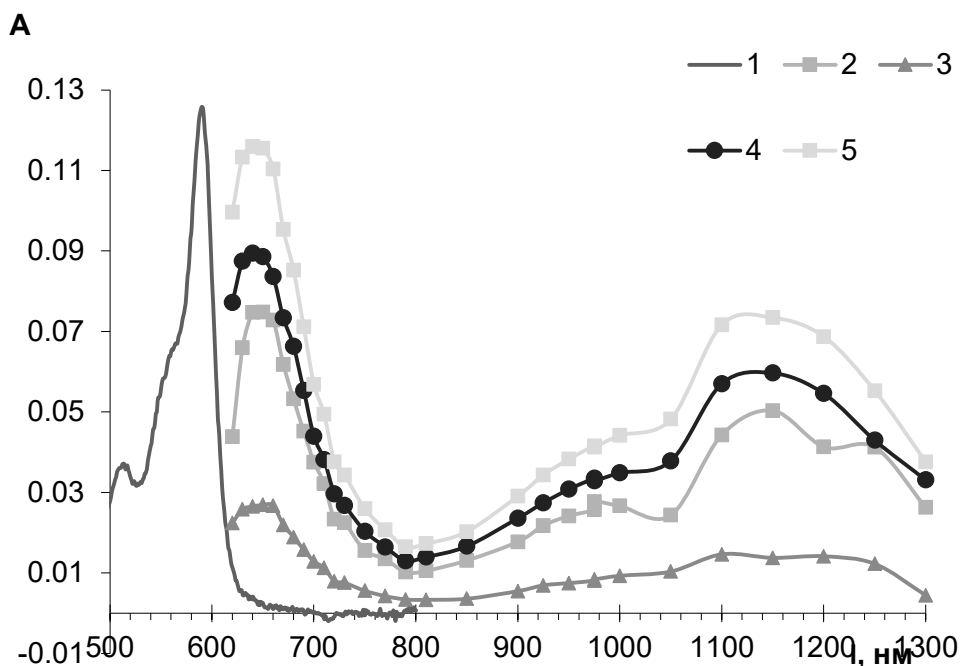
как фотосенсибилизаторов в ФДТ будет оказывать квантовый выход триплетного состояния.

Проведенные эксперименты по тушению триплетного состояния БКЦ1(Т) донором электрона (аскорбиновой кислотой) приводят к появлению в дифференциальном спектре поглощения новой полосы с максимумом при 420 нм, которая соответствует полувосстановленной форме красителя  $R^{\cdot-}$  (анион-радикала) образовавшегося в результате одноэлектронного переноса от аскорбиновой кислоты на триплет красителя. В результате фотопереноса электрона происходит разрушение одной из полиметиновых цепей в БКЦ1, что проявляется в исчезновении расщепления синглетного уровня БКЦ1. Процесс разрушения хромофорной системы БКЦ1 в присутствии донора электрона, происходящий с участием триплетного состояния красителя, моделирует образование анион-радикала красителя в комплексе с белками при использовании БКЦ1 в качестве фотосенсибилизатора в процессах фотодинамической терапии. В качестве донора электрона в этих процессах могут выступать ароматические аминокислоты (тирозин, триптофан), входящие в структуру белка (например, альбумина). Таким образом, на модельной системе установлено разрушение хромофорной структуры бискарбоцианинового красителя с образованием анион-радикала БКЦ1 при фотопереносе электрона от донора (аскорбиновая кислота) на триплетное состояние БКЦ1. При изучении фотохимических процессов, протекающих при прямом фотовозбуждении комплекса красителя с белком, было отмечено, что существенно изменяют спектры поглощения и флуоресценции. Данное явление связано с сокращением процессов фотоизомеризации и внутренней конверсии. Поскольку исследуемый краситель имеет высокое сродство к белку, при комплексообразовании происходит процесс разрушения находящихся в растворе димеров и агрегатов красителей. Оценка процессов комплексообразования кинетики гибели флуоресценции комплексов БКЦ1 ( $1 \times 10^{-7}$  М) с ЧСА ( $3 \times 10^{-5}$  М) в водном фосфатном буфере показала, что этот процесс описывается двухэкспоненциальной зависимостью с временами жизни флуоресценции  $\tau_1 = 1,1$

нс и  $\tau_2 = 2,5$  нс. Известно, что альбумин имеет два основных центра связывания. Полученные результаты по связыванию БКЦ1 и ЧСА согласуются с результатами по экспериментальному доказательству образования двух различных комплексов между альбумином и индотрикрабоцианиновыми красителями методом регистрацией двух времен жизни флуоресценции этих комплексов. Полученные по времязрешенной флуоресцентной спектроскопии данные были подтверждены двухкомпонентной кинетикой интермедиатов при прямом фотовозбуждении растворов альбумина с БКЦ1.

При достаточно высокой концентрации альбумина ( $1 \times 10^{-4}$  М) практически весь краситель находится в мономерной форме в виде комплекса с альбумином. Фотовозбуждение комплексов БКЦ1 и альбумина приводит к образованию короткоживущего (800 мкс) триплетного состояния этого комплекса, спектр поглощения которого был зарегистрирован методом импульсного фотолиза (Рисунок 46), и практически совпадал со спектром T–T поглощения полученным ранее для раствора в этаноле. Была измерена константа тушения триплетного состояния комплекса БКЦ1 с альбумином молекулярным кислородом  $k_{q2} = 2 \times 10^8$  М<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup>, которая оказалась значительно ниже константы, полученной ранее для раствора в этаноле. Это различие в константах тушения, вероятно, обусловлено глубоким проникновением молекулы красителя в карман альбумина и сильным экранированием триплетного состояния БКЦ1 в комплексе с альбумином от прямого взаимодействия триплета с кислородом [142].





**Рисунок 46 - Импульсный фотолиз БКЦ1 в комплексе с альбумином**  
цифрами показаны следующие спектры

1. Спектр синглетного состояния красителя в комплексе с альбумином
2. Спектр триплетного состояния красителя на моменте 100 мкс после вспышки
3. Спектр интермедиата со скоростью гибели триплетного состояния  $1 \times 10^3 \text{ с}^{-1}$
4. Спектр интермедиата со скоростью гибели триплетного состояния  $5,9 \times 10^3 \text{ с}^{-1}$
5. Спектр интермедиатов, полученный методом глобального кинетического анализа

### Характеристики БКЦ1 в комплексе с ДНК методом импульсного фотолиза.

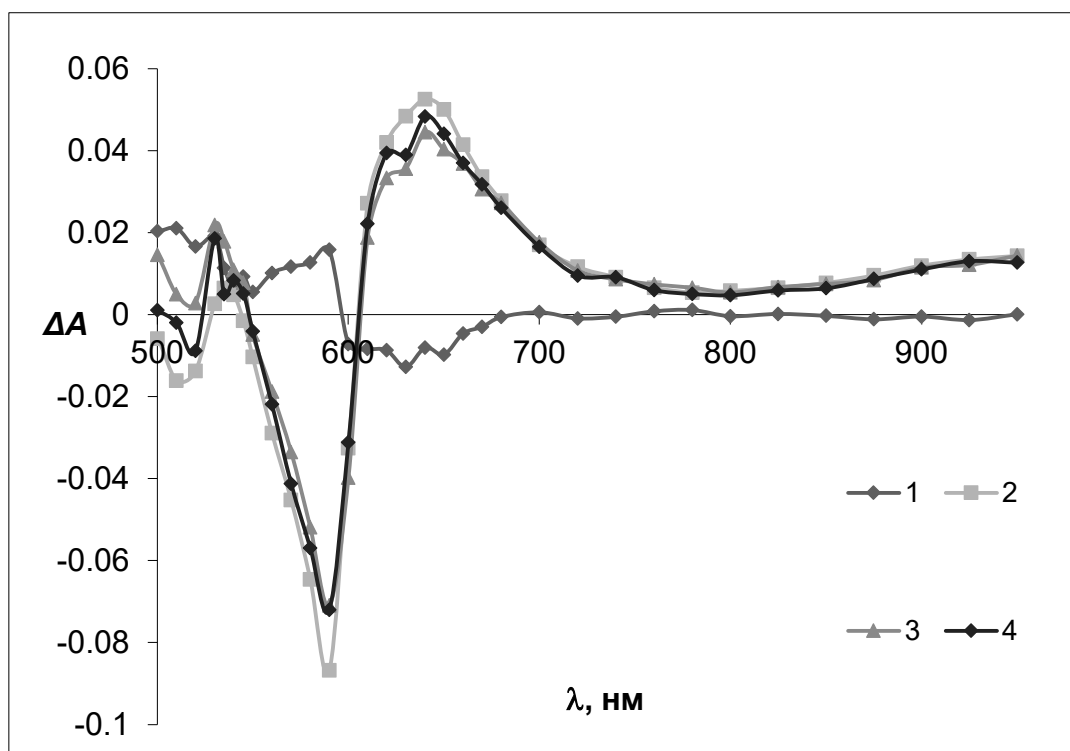


Рисунок 47 - Спектр триплетного состояния БКЦ1 в комплексе с ДНК. Цифрами показаны следующие спектры:

1. Спектр интермедиата с константой скорости гибели триплетного состояния  $8,8 \times 10^3 \text{ c}^{-1}$
2. Спектр интермедиата с константой скорости гибели триплетного состояния  $0,4 \times 10^3 \text{ c}^{-1}$
3. Спектр по сумме двух компонент
4. Экспериментально полученный спектр в момент времени 160 мкс после вспышки

Методом глобального кинетического анализа данных, полученных при импульсном фотолизе красителя БКЦ1 с ДНК (см. Рисунок 47), показано наличие двух компонент триплетного состояния с близким спектром и вычислены константы скорости процессов их гибели:  $2,0 \times 10^3 \text{ c}^{-1}$  и  $5,5 \times 10^3 \text{ c}^{-1}$ .

Существенно больший выход триплетного состояния БКЦ1 зарегистрирован при прямом фотовозбуждении растворов красителя в комплексе с биополимерами.

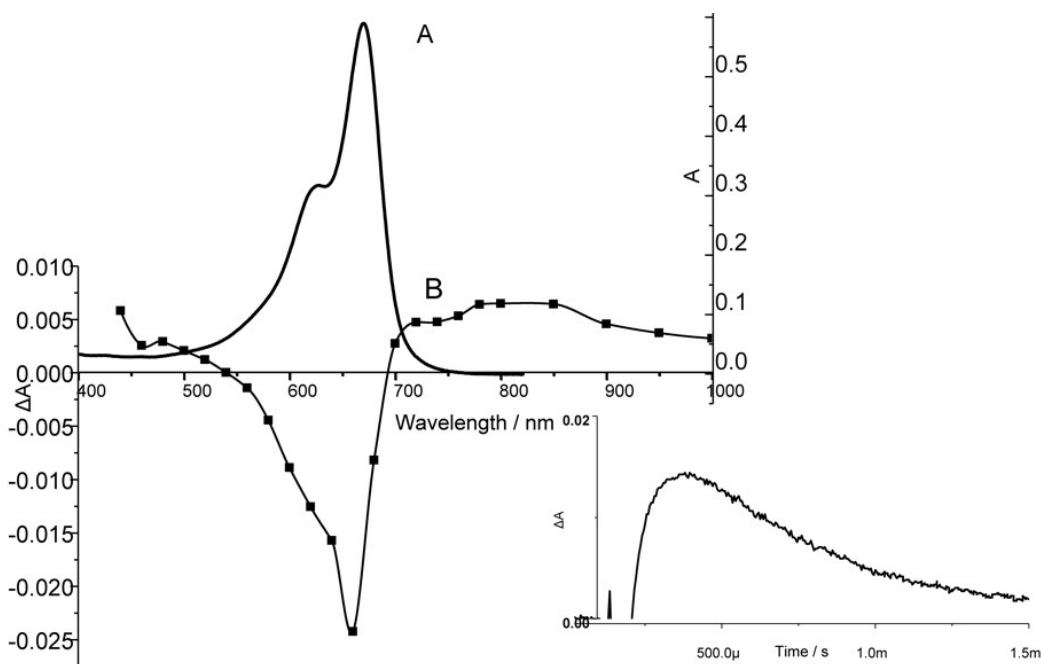
Методом импульсного фотолиза при прямом фотовозбуждении растворенного в EtOH БКЦ, было зарегистрировано образование промежуточного продукта с коротким временем жизни с  $\lambda_{\text{макс}} = 640$  нм в отсутствие кислорода. Интермедиат обладал кинетикой, подчиняющейся моноэкспоненциальному закону с характерным временем жизни 500 мкс. Триpletная природа триpletного состояния была подтверждена экспериментом по эффективному тушению кислородом. В присутствии кислорода образование триpletного состояния не наблюдали, тушение триpletных состояний кислородом происходит с константой скорости  $k_{q1} = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ , которая близка к значению диффузионной константы с учетом спин-статистического фактора [38]. Полученное значение свидетельствует о диффузионном характере механизма тушения, с учетом спин-статистического фактора. Добавление кислорода в кювету с раствором красителя в EtOH ( $2 \times 10^{-3}$  М) приводит к сокращению времени жизни триплета до 1 мкс, что существенно короче времени вспышки установки лампового фотолиза. При выполнении экспериментов по переносу энергии от антрацена (донор) на акцептор (БКЦ) при прямом фотовозбуждении УФ-светом через фильтры УФС-6 (340-390 нм) было зарегистрировано заселение триpletного состояния БКЦ и тушение триpletного состояния антрацена. Данный эксперимент подтверждает, что под действием красного света происходит заселение триpletного состояния БКЦ. В тоже время при прямом фотовозбуждении раствора красителя в фосфатно-солевом буфере не было отмечено образование триpletного состояния триpletной природы. Наблюдаемое различие указывает на возможное образование агрегатов и димеров в растворе.

### **3.6. Фотохимия триpletных состояний БКЦ4.**

При прямом фотовозбуждении БКЦ4 в EtOH образование триpletного состояния красителя не обнаружено, что свидетельствует о более высокой скорости внутренней конверсии в основное состояние по сравнению с процессом интеркомбинационной конверсии. С учетом чувствительности экспериментальной установки была произведена оценка квантового выхода

триплетного состояния БКЦ4 ( $\phi_T \leq 10^{-4}$ ), что подтверждает отсутствие фотодеградации, которая могла бы происходить через триплетное состояние БКЦ4. В результате можно сделать вывод, что БКЦ4 показал высокую фотостабильность при прямом возбуждении красным светом. В отличие от БКЦ красителей, содержащих бензобистиазольный центральный гетероциклический фрагмент, БКЦ4 не образует триплетного состояния при прямом фотовозбуждении. Это можно объяснить большим сродством к быстрой фотоизомеризации молекулы БКЦ4, которая обусловлена компактными размерами центрального гетероциклического фрагмента и эффективностью колебательной релаксацией.

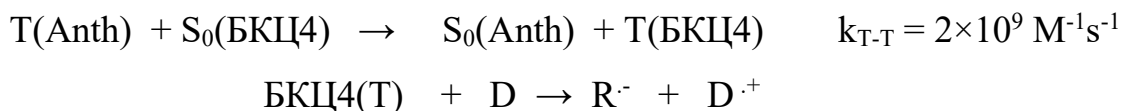
Триплетное состояние БКЦ4 регистрировали методом триплет-триплетного переноса энергии от донора триплетной энергии (антрацен,  $E_T = 14700 \text{ cm}^{-1}$ ). Фотовозбуждение УФ-А светом (320-380 нм) раствора смеси антрацена и БКЦ4 в EtOH приводит к триплет-триплетному переносу энергии и образованию триплета красителя, что сопровождается выцветанием основной полосы поглощения БКЦ4 (500-680 нм) и образованием полосы поглощения триплетного состояния БКЦ4 (700-1000 нм) (Рисунок 49). Величина константы переноса триплет-триплетной энергии в EtOH ( $k_{TT} = 2.2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) близка к значению диффузионной константы с учетом спин-статистического фактора [38]. Это свидетельствует об эффективности процесса передачи энергии в жидкой фазе. Полученная скорость гибели триплетного состояния равна  $k_T = 1.8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ . Прямое лазерное фотовозбуждение не показало выцветания БКЦ4, из чего следует, что процесс внутренней конверсии происходит быстрее, чем разрешающее время источника света (5 нс). В присутствии кислорода происходит тушение сенсibilизированного триплетного состояния БКЦ4 с константой тушения  $k_q = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Фотовозбуждение дегазированного раствора комплекса БКЦ4-альбумин ( $3 \times 10^{-6} \text{ M}$  и  $2 \times 10^{-4} \text{ M}$  соответственно) в PBS не приводило к образованию триплетного состояния, что определялось отсутствием образования промежуточных продуктов в области поглощения триплетного состояния.



**Рисунок 48 - Спектры поглощения синглетного и триплетного состояний БКЦ4. На рисунке буквами обозначены следующие спектры: А-спектр поглощения БКЦ4 ( $3 \times 10^{-6}$  М), В-дифференциальный спектр триплетного состояния БКЦ4 ( $3 \times 10^{-6}$  М) в присутствии антрацена ( $1 \times 10^{-5}$  М) в EtOH, время после вспышки 350 мкс) при УФ-возбуждении. Врезка: Кинетика гибели триплетного состояния при сенсibilизированном заселении на 720 нм.**

Триплетное состояние БКЦ4 может быть заселено в результате триплет-триплетного переноса энергии от донора (антрацена), что позволяет оценить верхний предел уровня триплетной энергии как находящийся ниже  $14700 \text{ см}^{-1}$ . Фотовозбуждение УФ-светом раствора БКЦ4 ( $6 \times 10^{-7}$  М) в водном растворе смеси ЧСА и тетрасульфобензпирена в отсутствие кислорода приводит к образованию короткоживущего триплетного состояния нм (в области 670-1100 нм) красителя с максимумом при 750 нм и временем жизни около 500 мкс. В присутствии аскорбиновой кислоты (D) в концентрациях  $10^{-4}$ – $10^{-3}$  М происходит тушение триплетного состояния. Из зависимости кинетики гибели триплетного состояния красителя от концентрации аскорбиновой кислоты была вычислена константа скорости фотопереноса электрона на триплет БКЦ4 ( $k_1$ ). Значение константы фотопереноса электрона  $k_1 = 7.5 \times 10^4 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ , что существенно

отличается от значения константы скорости для EtOH. Данная величина характеризует процесс тушения триплета красителя в белке, как затрудненный. Это свидетельствует о возникновении эффекта экранирования молекулы красителя от молекулы донора электрона благодаря связыванию БКЦ4 с белком. Аскорбиновая кислота необратимо реагирует с триплетом красителя.



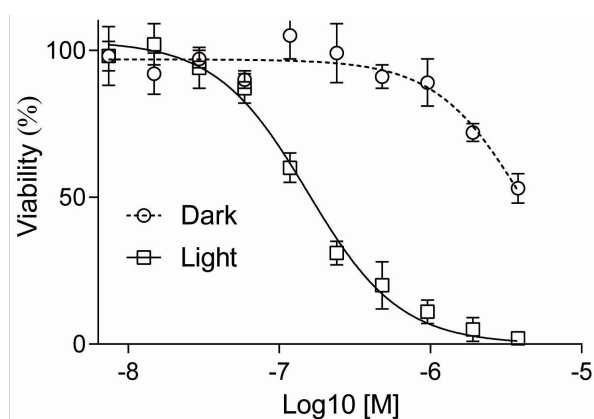
Тушение триплетного состояния БКЦ4(T) донором электрона приводит к появлению в дифференциальном спектре поглощения новой полосы с максимумом при 530 нм, которая соответствует полувосстановленной форме красителя  $R^{\cdot-}$  (анион-радикала) образовавшегося в результате одноэлектронного переноса от аскорбиновой кислоты на триплет красителя. Таким образом, на модельной системе взаимодействия возбужденного состояния красителя в комплексе с белком и донора электрона установлено взаимодействие хромофорной структуры бискарбоцианинового красителя с образованием анион-радикала БКЦ при фотопереносе электрона от донора (аскорбиновая кислота) на триплетное состояние БКЦ.

### 3.7. Внутриклеточное накопление красителей ИКЦ2-3.

Проведено исследование внутриклеточного накопления красителей ИКЦ 2 и 3 на клетках рака прямой кишки. Исследование проводили, проинкубировав 1,3,8 часов краситель с клетками по стандартной методике. Затем клетки отделяли центрифугированием, лизировали и экстрагировали ДМСО. Полученный окрашенный раствор сравнивали с калибровочным графиком. Оба вещества обладали субмикромольной темновой токсичностью. Наибольшее значение внутриклеточного накопления получено для красителя ИКЦ3.

### 3.8. Фотоцитотоксичность БКЦ1.

Способность БКЦ1 ингибировать рост клеток НСТ116 оценивали для светоактивированных образцов, и для темновых образцов с помощью МТТ-теста. Активированные образцы инкубировали с БКЦ1 и освещали светодиодным источником света с максимумом испускания на 630 нм (11,5 Дж / см<sup>2</sup>). Через 24 ч после обработки выживаемость клеток составила 10% (1 мкМ БКЦ1) и 0% (5 мкМ БКЦ1). Было установлено, что увеличение дозы фотодинамического воздействия приводит к повышению эффективности гибели клеток. Цитотоксичность для необлученных образцов при концентрациях до 1 мкМ была незначительной. Цитотоксичность для облученных красным светом образцов  $IC_{50L}$  и для темновых  $IC_{50D}$  для клеток НСТ116 составляла 0,3 мкМ и 5 мкМ соответственно. Эти значения значительно ниже, чем для других фотоактивных цианиновых красителей [143], но сопоставимы с родственным соединением семейства бискарбоцианинов [99]. Опираясь на эти результаты, можно сделать вывод, что БКЦ1 производит эффективное фоторазрушение опухолевых клеток.



**Рисунок 49 - Световая токсичность БКЦ1. Кривые выживания для облученных клеток ( $IC_{50L}$ , 0,3 мкМ) и необлученных ( $IC_{50D}$ , 5 мкМ) для клеток НСТ116 по результатам теста МТТ через 24 часа после обработки. Клетки освещали светодиодом 630 нм (11,5 Дж / см<sup>2</sup>) через 3 ч после инкубации с красителем.**

Эффективность воздействия красителей на клетки зависит от времени предварительной инкубации с действующим веществом. Гибель клеток, инкубированных до облучения в течение 3 ч, на 15-25% выше относительно инкубированных 2 ч. Увеличение фотоцитотоксичности при большем времени предварительной инкубации с красителем указывает на оптимизацию внутриклеточной локализации и связывания с клеточными компонентами. Это подтверждает нашу гипотезу о перераспределении красителя в клетке, в течение 3-4 ч происходит образование устойчивых комплексов с внутриклеточными биомакромолекулами.

Использование бискарбоцианиновых красителей в фотодинамической терапии является ранее неизученной областью. Фотохимические и фотофизические свойства этого класса соединений заслуживают внимания исследователей благодаря необычной геометрии молекулы, которая включает в себя два сопряженных хромофора и определяет наличие полосы поглощения в красной области спектра и высокий выход триплетного состояния. В соответствии с результатами фотохимические и фотобиологические свойства бискарбоцианиновых красителей зависят в значительной мере от геометрии



молекулы и взаимодействия хромофоров. Спектральные характеристики и динамика внутриклеточного накопления БКЦ1 отличаются от родственного соединения [99] с линейным расположением хромофоров и смещением этилзамещенных атомов азота в центральном гетероцикле. Геометрия молекулы, наряду с гидрофобностью полиметиновых цепей и наличием положительных зарядов в бискарбонианиновом красителе, играет решающую роль во взаимодействии с транспортным белком альбумином, клеточными мембранами и структурами.

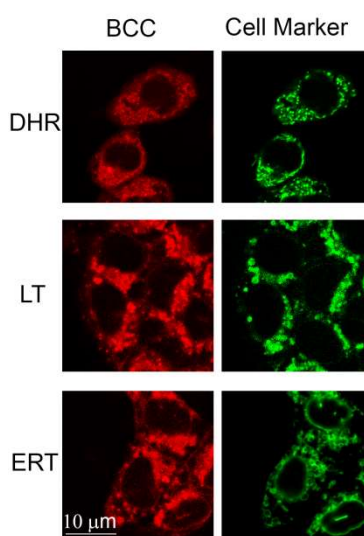
Бихромофорный цианиновый краситель БКЦ1 показывает высокую аффинность к ЧСА в соответствии с полученным  $k_b$ . Показано, что БКЦ, связанный с ЧСА, образует два типа комплексов. Эти комплексы характеризуются временем жизни флуоресценции, что значительно превышает характеристику несвязанного красителя. Время жизни флуоресценции этих двух комплексов отличается более чем в два раза, что указывает на различные свойства сайтов связывания. Это коррелирует с данными о том, что полиметиновое красители часто взаимодействуют с альбумином с двумя центрами связывания, которые характеризуются различной полярности [117,116].

### **3.9. Накопление БКЦ1 и внутриклеточная локализация.**

Оценка накопления БКЦ1 в клетках НСТ116 проводилась по изменению флуоресценции. Спектроскопическое определение концентрации красителя в лизатах клеток позволило определить время накопления красителя. Максимальное содержание красителя в клетках достигалось через 1 ч инкубации. В течение следующих 24 ч количество красителя снижалось до 50% от максимального. Исходя из этих результатов, оптимальное время воздействия на клетки было определено как 1 час и использовалось в дальнейших экспериментах. Причиной постепенного снижения внутриклеточной концентрации красителя может быть активный обратный транспорт. Кроме того, возможна внутриклеточная деградация молекул красителей.

Для характеристики внутриклеточной локализации БКЦ1 в органеллах

был использован метод конфокальной флуоресцентной микроскопии. Интенсивность флуоресценции красителя продолжала расти внутри клетки до 3 ч после удаления БКЦ из питательной среды. Это явление свидетельствует о том, что краситель находится в мономерной форме и эффективно связывается с клеточными компонентами. Принимая во внимание увеличения флуоресценции, инкубировали клетки в течение 3 ч после изменения носителя до воздействия света, чтобы обеспечить наилучшие результаты в дальнейших тестах на цитотоксичность и внутриклеточную локализацию. Тесты на цитотоксичность подтвердили рациональность трехчасовой инкубации, поскольку обеспечивает жизнеспособность клеток для цитометрии. В клетки линии НСТ 116 клеток были введены следующие красители для контрастирования: LysoTracker Green ДНА, ER-Tracker Green, Dihydrorhodamine 123 и Hoechst 33342. Наибольшая концентрация красителя зарегистрирована главным образом в цитоплазме, следовые количества были обнаружены в ядре. Флуоресценция БКЦ1 частично перекрывалась сигналами от всех перечисленных клеточных маркеров. По этой причине был сделан вывод, что краситель проникает в эндоплазматический ретикулум, лизосомы, митохондрии и ядра клеток. Закономерности в распределении внутриклеточного красителя являются важными, поскольку они коррелируют с фотодеградацией на различных участках связывания в клетке.



**Рисунок 50 - Локализация красителя в клетках НСТ116. Конфокальная микроскопия локализации БКЦ1 ( $\lambda_{ex} = 514 \text{ нм} / \lambda_{em} = 650-$**

**700 нм**[ $5 \times 10^{-7}$  М]) с маркером эндоплазматической сети **ER-Tracker Green (ERT)** ( $\lambda_{ex} = 488$  нм /  $\lambda_{em} = 510-570$  нм [ $5 \times 10^{-6}$  М]) и лизосомального маркера **Lysotracker зеленый DNA-26 (LT)** ( $\lambda_{ex} = 488$  нм /  $\lambda_{em} = 500-580$  нм [ $5 \times 10^{-6}$  М]) и митохондриального маркера **дигидрородамин 123 (DHR)** ( $\lambda_{ex} = 488$  нм /  $\lambda_{em} = 510-570$  нм [ $5 \times 10^{-6}$  М]) в живых клетках линии НСТ116;

Известно, что три основных свойства контролируют накопление фотосенсибилизатора, его внутриклеточную локализацию: степень липофильности, тип и количество зарядов, а также степень асимметрии в молекулярной структуре [144–146]. Исследуемый бискарбоцианиновый краситель, БКЦ1, имеет два положительных заряда и характеризуется значительной гидрофобностью благодаря наличию в его структуре двух сопряженных полиметиновых цепей, что характерно для цианиновых красителей [147]. Многочисленные исследования показали, что наличие липофильных боковых цепей вблизи хромофора повышает липофильность фотосенсибилизатора [139, 144, 145]. Кроме того, катионные амфифильные порфирины с двумя близкорасположенными положительными зарядами демонстрируют высокую способность к проникновению и эффективность фотодинамической терапии [148]. Гидрофильные фотосенсибилизаторы, имеющие полярные или заряженные боковые цепи, являются слишком полярными, чтобы проникать через биологические мембраны путем диффузии, и обычно поглощаются эндоцитозом. Однако некоторые заряженные ФС могут диффундировать через плазматическую мембрану при условии, что они достаточно гидрофобны [100]. Оба способа доставки во внутреннюю часть клетки могут быть актуальны для БКЦ1.

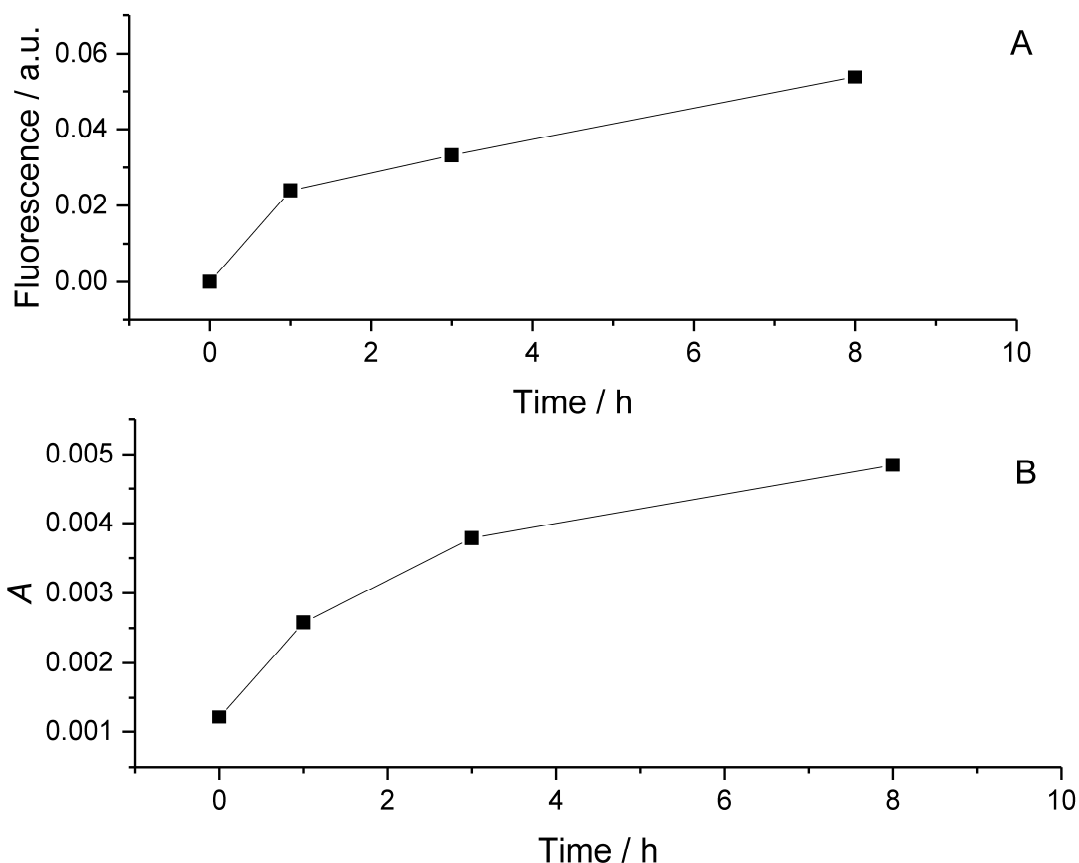
БКЦ1 демонстрирует высокую способность к проникновению и распределения между органеллами в опухолевых клетках. Краситель накапливается в максимальном количестве в клетках НСТ116 клеток менее чем 3 ч, сохраняя свое присутствие, с постепенным понижением концентрации на время до 24 часов. Постепенное удаление фотосенсибилизатора из клетки может

оказать положительное влияние на снижение нежелательной токсичности и светочувствительности клеток после ФДТ. БКЦ1 обладает незначительной темновой цитотоксичностью, но, подвергаясь воздействию света, он проявляет высокую фотоцитотоксичность при концентрациях ниже 1 мкМ. Следует подчеркнуть, что БКЦ1 проникает во все жизненно важные органеллы клетки, включая ядра, митохондрии, лизосомы и эндоплазматический ретикулум, что повышает антипролиферативный потенциал вещества.

Характеристики связывания БКЦ с ЧСА, динамика внутриклеточного накопления и локализации комплекса БКЦ-ЧСА были изучены с помощью оптической спектроскопии и конфокальной флуоресцентной микроскопии. Была проведена оценка фотоцитотоксичности БКЦ по отношению к аденокарциномы кишечника человека НСТ116.

### **3.10. Накопление БКЦ4 и внутриклеточная локализация.**

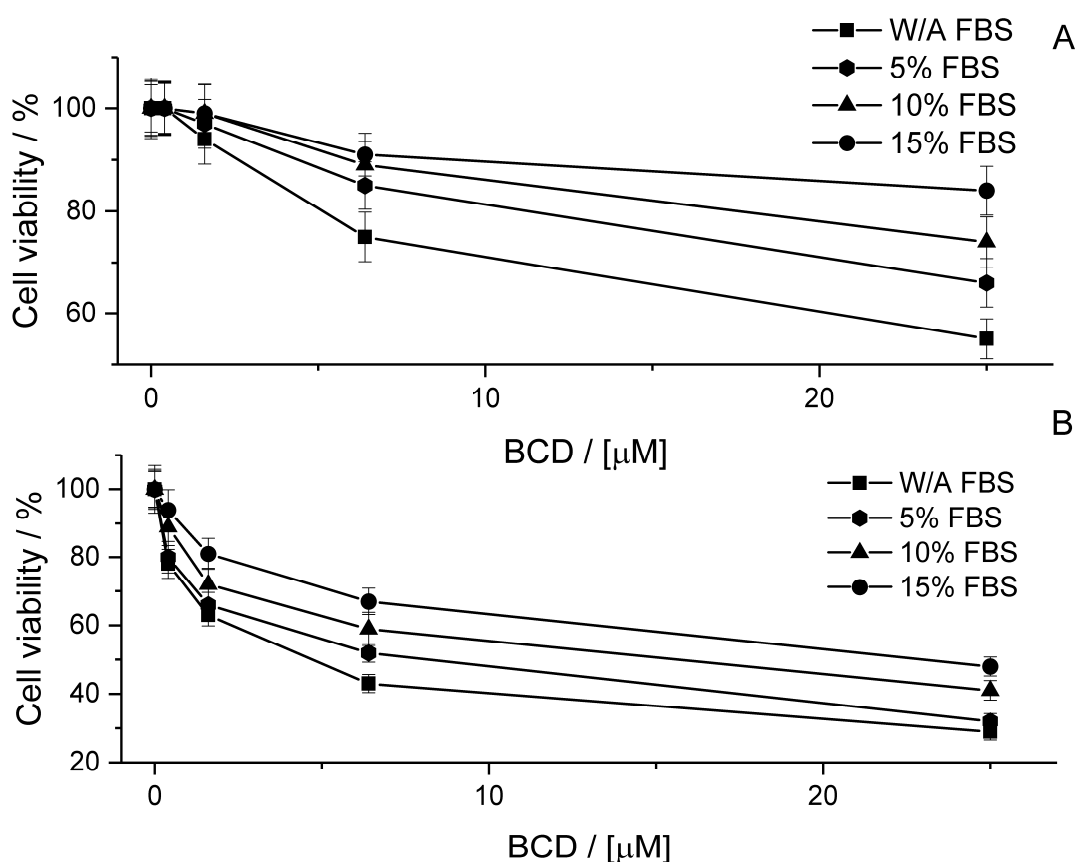
Результаты исследования цитотоксичности на культуре опухолевых клеток. Для экспериментов использована линия НСТ116 (аденокарцинома толстой кишки человека). Для исследования соединения растворяли в ДМСО до концентрации стокового раствора 10 мМ. МТТ-тест для исследования цитотоксичности. Исследуемый краситель (БКЦ4) проявлял низкую темновую и субмикромольную фотоиндуцированную цитотоксичность.



**Рисунок 51 - Внутриклеточное накопление БКЦ4 в клетках линии НСТ116 измерения проводились по поглощению (А) и по флуоресценции (В).**

Цитотоксичность фотосенсибилизатора зависела от количества сыворотки в клеточной среде. При увеличении содержания в сыворотке крови от 5 до 15% цитотоксический эффект фотосенсибилизатора снижался. Это можно объяснить связыванием фотосенсибилизатора с белками сыворотки крови, что, вероятно, препятствует накоплению в клетке и развитию фотодинамического эффекта после фотоактивации. 50%-ная гибель клеток в темноте не была достигнута в исследуемом диапазоне концентраций (0,4-25 мкМ). Контрольным соединением в темновом эксперименте был доксорубин в тех же концентрациях, что и фотосенсибилизаторы. Доксорубин проявляет цитотоксичность в отношении клеток НСТ116 (IC<sub>50</sub> 0,8 мкМ) и является подходящим положительным контролем в эксперименте с темной цитотоксичностью при низких значениях IC<sub>50</sub> экспериментальных соединений. Была охарактеризована фотоиндуцированная цитотоксичность исследуемого красителя БКЦ4; 50%

клеточной гибели в световом эксперименте происходило при субмикромольных концентрациях. Наибольшую фотоиндуцированную цитотоксичность показал фотосенсибилизатор, добавляемый в клеточную среду без сыворотки. При увеличении количества сыворотки от 5 до 15% фотодинамическая активность фотосенсибилизатора снижалась, гибель 50% клеток оставалась в субмилимолярном диапазоне концентраций. По результатам исследования цитотоксичности определены значения  $IC_{50}$ . Ингибирование пролиферации клеток достигалось при концентрации исследуемого красителя 25 мкМ.



**Рисунок 52 Цитотоксичность БКЦ4. А. Темновая токсичность БКЦ4 на клетках НСТ116, В. Световая токсичность БКЦ4.**

Методом конфокальной микроскопии было изучено биораспределение красителя в клетках. Согласно данным флуоресцентной микроскопии, флуоресценция красителя обнаружена в цитоплазме и, в меньшей степени, в ядре. Кроме того, БКЦ4 обнаруживается на поверхностной мембране клеток. Было показано что краситель проникает через мембрану клетки и распределяется

в цитоплазме. Преимущественно локализуется в митохондриях. Вероятно, это является механизмом появления цитотоксичности: после 72 часов накопления в клетках происходит ингибирование жизненно-важных процессов в митохондриях. Тем самым происходит запуск процесса гибели клеток по механизму апоптоза.

**Выводы:**

В рамках диссертационной работы установлены спектрально-кинетические характеристики молекулярно-организованных систем при взаимодействии цианиновых красителей с биомакромолекулами. По результатам работы сделаны следующие выводы:

1. Охарактеризована серия новых гептаметиновых индоцианиновых красителей.:

А) Показано, что комплексообразование с альбумином происходит в основном посредством гидрофобного взаимодействия полиметиновой цепи с гидрофобным сайтом связывания альбумина, преимущественно доменами IA и IIIВ. Установлены квантовые выходы процессов дезактивации синглетно-возбужденного состояния красителей ИКЦ1-3.

Б) Зарегистрирован спектр триплетного состояния исследуемых соединений методом Т-Т переноса энергии. Установлен механизм дезактивации синглетно-возбужденного состояния красителей ИКЦ1-3 в комплексах с белками.

2. Определены константы связывания ЦК с белками крови (альбумин, альфа-фетопроtein). По кинетике гибели флуоресценции установлено существование по меньшей мере двух типов комплекса краситель-белок.

3. Доказано, что образование комплекса с биополимерами приводит к увеличению жесткости структуры молекулы, подавлению колебательной релаксации.

4. Полужестким докингом установлена конформация комплекса краситель-альбумин.

5. Методом молекулярной динамики показана решающая роль гидрофобных взаимодействий в ориентации молекулы между субдоменами альбумина IV и IIIА.

6. Методом импульсного фотолиза доказано, что взаимодействие триплетного состояния БКЦ с тушителями (кислородом, нитроксильными радикалами (TEMPO)) приводит к тушению триплетного состояния с



константой  $k_q = 2.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (по механизму переноса энергии для кислорода) и с константой  $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (по механизму переноса электрона и ускорения интеркомбинационной конверсии для TEMPO).

7. Изучение процессов, протекающих при прямом фотовозбуждении систем, содержащих комплекс красителя и биополимера, показал фотоперенос электрона между молекулой БКЦ и альбумином.

8. На серии БКЦ продемонстрировано образование анион-радикала в присутствии доноров электрона. При добавлении к раствору красителя N,N-диметиланилина, аскорбиновой кислоты, белка происходило образование долгоживущей частицы, а спектр получаемых интермедиатов смещался на 15-20 нм в коротковолновую область.

9. На раковых клетках НСТ116 продемонстрирована локализация фотосенсибилизатора БКЦ, показан фотодинамический эффект по образованию супероксид-аниона после облучения красным светом.

10. Расположение красителя в центре связывания IA и IIIВ альбумина определяет близость красителя к ароматическим аминокислотам белка и эффективность реакции фотопереноса электрона.

**Список использованных сокращений:**

ИМ оптическая медицинская визуализация  
PBS фосфатно-солевой буфер  
ФС фотосенсибилизатор  
ФХТ фотохимиотерапия  
ФДТ фотодинамическая терапия  
ЧСА человеческий сывороточный альбумин  
БСА бычий сывороточный альбумин  
ЛПНП липопротеины низкой плотности  
ДНК дезоксирибонуклеиновая кислота  
ИК инфракрасный  
ЭДТА этилендиаминтетрацетат  
EtOH этиловый спирт  
MeOH метиловый спирт  
DMSO диметилсульфоксид  
TCSPC времяразрешенный счет единичных фотонов  
ЦК цианиновый краситель  
ФДД флуоресцентная диагностика рака  
УФ ультрафиолет  
УФС ультрафиолетовое стекло  
МВ метиленовый голубой  
АФП альфафетопротеин  
DPBF - 1,3-дифенилизобензофуран  
UA - мочевая кислота

**Список литературы.**

1. Dempster D.N. Photochemical characteristics of cyanine dyes. Part 1.—3,3'-diethyloxadicarbocyanine iodide and 3,3'-diethylthiadicarbocyanine iodide / Dempster D.N., Morrow T., Rankin R., Thompson G.F. // J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2 – 1972. – Т. 68 – С.1479.
2. Shershov V.E. Comparative Study of Novel Fluorescent Cyanine Nucleotides: Hybridization Analysis of Labeled PCR Products Using a Biochip / Shershov V.E., Lapa S.A., Kuznetsova V.E., Spitsyn M.A., Guseinov T.O., Polyakov S.A., Stomahin A.A., Zasedatelev A.S., Chudinov A. V // Journal of Fluorescence – 2017. – Т. 27 – № 6 – С.2001.
3. Tian Y. A rapid and convenient method for detecting a broad spectrum of malignant cells from malignant pleuroperitoneal effusion of patients using a multifunctional NIR heptamethine dye / Tian Y., Sun J., Yan H., Teng Z., Zeng L., Liu Y., Li Y., Wang J., Wang S., Lu G. // The Analyst – 2015. – Т. 140 – № 3 – С.750.
4. Bjurlin M.A. Near-Infrared Fluorescence Imaging with Intraoperative Administration of Indocyanine Green for Robotic Partial Nephrectomy / Bjurlin M.A., McClintock T.R., Stifelman M.D. // Current Urology Reports – 2015. – Т. 16 – № 4 – С.20.
5. Fischer T. Detection of Rheumatoid Arthritis Using Non-Specific Contrast Enhanced Fluorescence Imaging / Fischer T., Ebert B., Voigt J., Macdonald R., Schneider U., Thomas A., Hamm B., Hermann K.-G.A. // Academic Radiology – 2010. – Т. 17 – № 3 – С.375.
6. Ishizawa T. Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging / Ishizawa T., Fukushima N., Shibahara J., Masuda K., Tamura S., Aoki T., Hasegawa K., Beck Y., Fukayama M., Kokudo N. // Cancer – 2009. – Т. 115 – № 11 – С.2491.
7. Ogawa M. In vivo Molecular Imaging of Cancer with a Quenching Near-Infrared Fluorescent Probe Using Conjugates of Monoclonal Antibodies and Indocyanine Green / Ogawa M., Kosaka N., Choyke P.L., Kobayashi H. // Cancer Research –

2009. – Т. 69 – № 4 – С.1268.

8. Shi C. Review on near-infrared heptamethine cyanine dyes as theranostic agents for tumor imaging, targeting, and photodynamic therapy / Shi C., Wu J.B., Pan D. // *J Biomed Opt* – 2016. – Т. 21 – № 5 – С.50901.

9. Кузьмин В.А. Процессы деградации энергии в фотовозбужденных комплексах индотрикарбоцианина и альбумина / Кузьмин В.А., Дурандин Н.А., Лисицына Е.С., Литвинкова Л.В., Некипелова Т.Д., Подругина Т.А., Матвеева Е.Д., Проскурнина М.В., Зефирова Н.С. // *Химия высоких энергий* – 2015. – Т. 49 – № 3 – С.240.

10. Кузьмин В.А. Спектрально-кинетические характеристики комплексообразования между индотрикарбоцианином и альбумином / Кузьмин В.А., Дурандин Н.А., Лисицына Е.С., Некипелова Т.Д., Подругина Т.А., Матвеева Е.Д., Проскурнина М.В., Зефирова Н.С. // *Доклады Академии наук* – 2015. – Т. 462 – № 2 – С.182.

11. Rye H.S. Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes: properties and applications / Rye H.S., Yue S., Wemmer D.E., Quesada M.A., Haugland R.P., Mathies R.A., Glazer A.N. // *Nucleic Acids Research* – 1992. – Т. 20 – № 11 – С.2803.

12. Soper S.A. Steady-State and Picosecond Laser Fluorescence Studies of Nonradiative Pathways in Tricarbocyanine Dyes: Implications to the Design of Near-IR Fluorochromes with High Fluorescence Efficiencies / Soper S.A., Mattingly Q.L. // *Journal of the American Chemical Society* – 1994. – Т. 116 – № 9 – С.3744.

13. Yuan A. Activatable photodynamic destruction of cancer cells by NIR dye/photosensitizer loaded liposomes / Yuan A., Tang X., Qiu X., Jiang K., Wu J., Hu Y. // *Chemical Communications* – 2015. – Т. 51 – № 16 – С.3340–3342.

14. Conceicao D.S. Photochemistry and Cytotoxicity Evaluation of Heptamethinecyanine Near Infrared (NIR) Dyes / Conceicao D.S., Ferreira D.P., Ferreira L.F. // *Int J Mol Sci* – 2013. – Т. 14 – № 9 – С.18557.

15. Lee H. Fluorescence lifetime properties of near-infrared cyanine dyes in relation to their structures / Lee H., Berezin M.Y., Henary M., Strekowski L., Achilefu S. //

Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry – 2008. – Т. 200 – № 2–3 – С.438.

16. Ищенко А.А. Структура и спектрально-люминесцентные свойства полиметиновых красителей / Ищенко А.А. // Успехи химии – 1991. – Т. 60 – № 8 – С.1708.

17. Sanchez-Viesca F. A mechanistic deviation in the bischler indole synthesis / Sanchez-Viesca F., Gómez M.R., Berros M. // Heterocyclic Communications – 2003. – Т. 9 – № 4 – С.367.

18. Бугаенко Д.И. Синтез индолов: последние достижения / Бугаенко Д.И., Карчава А.В., Юровская М.А. // Успехи химии – 2019. – Т. 88 – № 2 – С.99–159.

19. Chipon B. Synthesis and post-synthetic derivatization of a cyanine-based amino acid. Application to the preparation of a novel water-soluble NIR dye / Chipon B., Clavé G., Bouteiller C., Massonneau M., Renard P.-Y., Romieu A. // Tetrahedron Letters – 2006. – Т. 47 – № 47 – С.8279.

20. Mojzych M. Synthesis of Cyanine Dyes Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. – 1с.

21. Shershov V.E. Near-infrared heptamethine cyanine dyes. Synthesis, spectroscopic characterization, thermal properties and photostability / Shershov V.E., Spitsyn M.A., Kuznetsova V.E., Timofeev E.N., Ivashkina O.A., Abramov I.S., Nasedkina T. V, Zasedatelev A.S., Chudinov A. V // Dyes and Pigments – 2013. – Т. 97 – № 2 – С.353.

22. Waggoner A.S. Cyanine dyes as labeling reagents for detection of biological and other materials by luminescence methods // – 2000.

23. Heseltine D.W. Tricarbocyanine infrared absorbing dyes // – 1959.

24. Heseltine D.W. Sulfonated cyanine and merocyanine dyes // – 1964.

25. Abraham M.J. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers / Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E. // SoftwareX – 2015. – Т. 1–2 – № 21 – С.19.

26. Emerson E.S. The geometrical structure and absorption spectrum of a cyanine dye

- aggregate / Emerson E.S., Conlin M.A., Rosenoff A.E., Norland K.S., Rodriguez H., Chin D., Bird G.R. // *The Journal of Physical Chemistry* – 1967. – Т. 71 – № 8 – С.2396.
27. Little G.M. Fluorescent cyanine dyes // – 2000.
28. Bertolino C.A. Novel Heptamethine Cyanine Dyes with Large Stokes' Shift for Biological Applications in the Near Infrared / Bertolino C.A., Caputo G., Barolo C., Viscardi G., Coluccia S. // *Journal of Fluorescence* – 2006. – Т. 16 – № 2 – С.221.
29. Tredwell C.J. Picosecond time resolved fluorescence lifetimes of the polymethine and related dyes / Tredwell C.J., Keary C.M. // *Chemical Physics* – 1979. – Т. 43 – № 3 – С.307.
30. Momicchioli F. Theoretical study of trans-cis photoisomerism in polymethine cyanines / Momicchioli F., Baraldi I., Berthier G. // *Chemical Physics* – 1988. – Т. 123 – № 1 – С.103.
31. Dietz F. On the mechanism of photoisomerization and the structure of the photoisomers of cyanine dyes / Dietz F., Rentsch S.K. // *Chemical Physics* – 1985. – Т. 96 – № 1 – С.145.
32. Виноградов А.М. Исследование изомеризации в ряде несимметричных полиметиновых красителей импульсного фотолиза / Виноградов А.М., Кузьмин В.А., Романов Н.Н., Бабичев Ф.С. // *Доклады Академии наук украинской ССРСР* – 1976. – Т. 8 – С.711.
33. Виноградов А.М. Исследование зависимости констант скорости изомеризации короткоживущих фотоизомеров от строения несимметричных полиметиновых красителей / Виноградов А.М., Кузьмин В.А., Романов Н.Н., Бабичев Ф.С. // *Известия академии наук ССРСР* – 1978. – Т. 8 – С.1785.
34. Дарманян А.П. Безызлучательная деградация энергии в пространственно-затрудненных красителях / Дарманян А.П., Кузьмин В.А., Романов Н.Н., Бабичев Ф.С. // *Доклады Академии наук ССРСР* – 1976. – Т. 229 – № 6 – С.1367.
35. Виноградов А.М. Фотоизомеризация в ряду симметричных тиакарбоцианиновых красителей / Виноградов А.М., Кузьмин В.А., Альперович М.А., Левкоев И.И., Зильберман И.И. // *Доклады Академии наук ССРСР* – 1976.

– Т. 227 – № 3 – С.642–.

36. Baraldi I. Electronic spectra and trans—cis photoisomerism of carbocyanines. A theoretical (CS INDO CI) and experimental study / Baraldi I., Carnevali A., Momicchioli F., Ponterini G. // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* – 1993. – Т. 49 – № 4 – С.471.

37. Chibisov A.K. Triplet states of cyanine dyes and reactions of electron transfer with their participation / Chibisov A.K. // *Journal of Photochemistry* – 1976. – Т. 6 – № 3 – С.199.

38. Кузьмин В.А.А. Фотохимия полиметиновых красителей / Кузьмин В.А.А. // *Успехи научной фотографии* – 1984. – Т. 22 – С.90.

39. Dougherty T.J. Photodynamic Therapy / Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Peng Q. // *JNCI Journal of the National Cancer Institute* – 1998. – Т. 90 – № 12 – С.889.

40. Dolmans D.E. Photodynamic therapy for cancer / Dolmans D.E., Fukumura D., Jain R.K. // *Nature Reviews Cancer* – 2003. – Т. 3 – № 5 – С.380.

41. Узденский А.Б. Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии / Узденский А.Б. // М.: -2010.-327с – 2010.

42. Henderson B.W. How does photodynamic therapy work? / Henderson B.W., Dougherty T.J. // *Photochemistry and Photobiology* – 1992. – Т. 55 – № 1 – С.145.

43. Bonnett R. Chemical aspects of photodynamic therapy / R. Bonnett – CRC Press, 2014.

44. Huang L. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria / Huang L., Xuan Y., Koide Y., Zhiyentayev T., Tanaka M., Hamblin M.R. // *Lasers in Surgery and Medicine* – 2012. – Т. 44 – № 6 – С.490.

45. Zimmermann J. A generalization of the Jablonski diagram to account for polarization and anisotropy effects in time-resolved experiments / Zimmermann J., Zeug A., Röder B. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2003. – Т. 5 – № 14 – С.2964.

46. Moan J. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen / Moan J., Berg K. // *Photochemistry and Photobiology* –

1991. – T. 53 – № 4 – C.549.
47. Penning L.C. Fundamentals of photodynamic therapy / Penning L.C., Dubbelman T.M. // *Anti-Cancer Drugs* – 1994. – T. 5 – № 2 – C.139.
48. Li H. High payload delivery of optical imaging and photodynamic therapy agents to tumors using phthalocyanine-reconstituted low-density lipoprotein nanoparticles / Li H., Marotta D.E., Kim S., Busch T.M., Wileyto E.P., Zheng G. // *Journal of Biomedical Optics* – 2005. – T. 10 – № 4 – C.041203.
49. He X.M. Atomic structure and chemistry of human serum albumin / He X.M., Carter D.C. // *Nature* – 1992. – T. 358 – № 6383 – C.209.
50. Sułkowska A. Interaction of drugs with bovine and human serum albumin / Sułkowska A. // *Journal of Molecular Structure* – 2002. – T. 614 – № 1–3 – C.227.
51. Meloun B. Complete amino acid sequence of human serum albumin / Meloun B., Morávek L., Kostka V. // *FEBS Letters* – 1975. – T. 58 – № 1–2 – C.134.
52. Kragh-Hansen U. Structure and ligand binding properties of human serum albumin. / Kragh-Hansen U. // *Danish medical bulletin* – 1990. – T. 37 – № 1 – C.57.
53. Sinden R.R. DNA structure and function / R. R. Sinden – Elsevier, 2012.
54. Tang C.-Y. A Classic Near-Infrared Probe Indocyanine Green for Detecting Singlet Oxygen / Tang C.-Y., Wu F.-Y., Yang M.-K., Guo Y.-M., Lu G.-H., Yang Y.-H. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2016. – T. 17 – № 2 – C.219.
55. Yarmoluk S.. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids / Yarmoluk S., Lukashov S., Losytskyy M.Y., Akerman B., Korniyushyna O. // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* – 2002. – T. 58 – № 14 – C.3223.
56. Armitage B.A. Cyanine Dye–DNA Interactions: Intercalation, Groove Binding, and Aggregation Springer, 2005. – 55.
57. Cosa G. Photophysical Properties of Fluorescent DNA-dyes Bound to Single- and Double-stranded DNA in Aqueous Buffered Solution¶ / Cosa G., Focsaneanu K., McLean J.R.N., McNamee J.P., Scaiano J.C. // *Photochemistry and Photobiology* – 2001. – T. 73 – № 6 – C.585.
58. Lee L.G. Fluorescent DNA-Intercalating cyanine dyes including a positively



charged benzothiazole substituent // – 1998.

59. Larsson A. Characterization of the Binding of the Fluorescent Dyes YO and YOYO to DNA by Polarized Light Spectroscopy / Larsson A., Carlsson C., Jonsson M., Albinsson B. // *Journal of the American Chemical Society* – 1994. – T. 116 – № 19 – C.8459.

60. Neelam S. Interaction Studies of Coumaroyltyramine with Human Serum Albumin and Its Biological Importance / Neelam S., Gokara M., Sudhamalla B., Amooru D.G., Subramanyam R. // *The Journal of Physical Chemistry B* – 2010. – T. 114 – № 8 – C.3005.

61. Sharma A.S. In vitro investigation of domain specific interactions of phenothiazine dye with serum proteins by spectroscopic and molecular docking approaches / Sharma A.S., Anandakumar S., Ilanchelian M. // *RSC Adv.* – 2014. – T. 4 – № 68 – C.36267.

62. Bhattacharya B. Interaction of Bovine Serum Albumin with Dipolar Molecules: Fluorescence and Molecular Docking Studies / Bhattacharya B., Nakka S., Guruprasad L., Samanta A. // *The Journal of Physical Chemistry B* – 2009. – T. 113 – № 7 – C.2143.

63. Kulinich A. V Structure and fluorescence properties of indole cyanine and merocyanine dyes with partially locked polymethine chain / Kulinich A. V, Derevyanko N.A., Ishchenko A.A., Bondarev S.L., Knyukshto V.N. // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* – 2008. – T. 200 – № 2–3 – C.106.

64. Mustroph H. Relationship between the Molecular Structure of Cyanine Dyes and the Vibrational Fine Structure of their Electronic Absorption Spectra / Mustroph H., Reiner K., Mistol J., Ernst S., Keil D., Hennig L. // *ChemPhysChem* – 2009. – T. 10 – № 5 – C.835.

65. Patonay G. Sequencing near infrared and infrared fluorescence labeled DNA for detecting using laser diodes and suitable labels thereof // – 1996.

66. Kovar J. Optical fluorescent imaging // – 2009.

67. Henary M. Stability and Reactivity of Polymethine Dyes in Solution Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. – 221.

68. Wu X. Stability enhancement of fluorophores for lighting up practical application in bioimaging / Wu X., Zhu W. // *Chemical Society Reviews* – 2015. – Т. 44 – № 13 – С.4179.
69. Lipowska M. New Near-Infrared Cyanine Dyes for Labelling of Proteins / Lipowska M., Patonay G., Strekowski L. // *Synthetic Communications* – 1993. – Т. 23 – № 21 – С.3087.
70. Gupta P.K. Single-molecule DNA sequencing technologies for future genomics research / Gupta P.K. // *Trends in Biotechnology* – 2008. – Т. 26 – № 11 – С.602.
71. Hirons G.T. TOTO and YOYO: New very bright fluorochromes for DNA content analyses by flow cytometry / Hirons G.T., Fawcett J.J., Crissman H.A. // *Cytometry* – 1994. – Т. 15 – № 2 – С.129.
72. Yang F. Synthesis and nonlinear optical absorption properties of two new conjugated ferrocene-bridge-pyridinium compounds / Yang F., Xu X.-L., Gong Y., Qiu W.-W., Sun Z.-R., Zhou J.-W., Audebert P., Tang J. // *Tetrahedron* – 2007. – Т. 63 – № 37 – С.9188.
73. Shi C. Cyanine dyes in optical imaging of tumours / Shi C., Zhang C., Su Y., Cheng T. // *The Lancet Oncology* – 2010. – Т. 11 – № 9 – С.815.
74. Sutton E.J. In vivo magnetic resonance imaging and optical imaging comparison of viable and nonviable mesenchymal stem cells with a bifunctional label / Sutton E.J., Henning T.D., Boddington S., Demos S., Krug C., Meier R., Kornak J., Zhao S., Baehner R., Sharifi S. // *Molecular imaging* – 2010. – Т. 9 – № 5 – С.2010–7290.
75. Raabe A. Prospective evaluation of surgical microscope—integrated intraoperative near-infrared indocyanine green videoangiography during aneurysm surgery / Raabe A., Nakaji P., Beck J., Kim L.J., Hsu F.P.K., Kamerman J.D., Seifert V., Spetzler R.F. // *Journal of Neurosurgery* – 2005. – Т. 103 – № 6 – С.982.
76. Глотов А.С. Создание биочипа для анализа полиморфизма в генах системы биотрансформации / Глотов А.С., Наседкина Т.В., Иващенко Т.Э., Юрасов Р.А., Суржиков С.А., Паньков С.В., Чудинов А.В., Баранов В.С., Заседателев А.С. // *Молекулярная биология* – 2005. – Т. 39 – № 3 – С.403.
77. Hagen A. Late-fluorescence mammography assesses tumor capillary permeability

- and differentiates malignant from benign lesions / Hagen A., Grosenick D., Macdonald R., Rinneberg H., Burock S., Warnick P., Poellinger A., Schlag P.M. // *Optics Express* – 2009. – T. 17 – № 19 – C.17016.
78. Cardillo J.A. Experimental selective choriocapillaris photothrombosis using a modified indocyanine green formulation / Cardillo J.A., Jorge R., Costa R.A., Nunes S.M.T., Lavinsky D., Kuppermann B.D., Tedesco A.C., Farah M.E. // *British Journal of Ophthalmology* – 2008. – T. 92 – № 2 – C.276.
79. Abels C. Indocyanine green (ICG) and laser irradiation induce photooxidation / Abels C., Fickweiler S., Weiderer P., Bäuml W., Hofstädter F., Landthaler M., Szeimies R.-M. // *Archives of Dermatological Research* – 2000. – T. 292 – № 8 – C.404.
80. Desmettre T. [Fluorescence properties and metabolic features of fluorescein] / Desmettre T., Devoisselle J.M., Mordon S. // *J Fr Ophtalmol* – 2000. – T. 23 – № 9 – C.821.
81. Ntziachristos V. Current concepts and future perspectives on surgical optical imaging in cancer / Ntziachristos V., Yoo J.S., Dam G.M. van // *Journal of Biomedical Optics* – 2010. – T. 15 – № 6 – C.066.
82. Ogilby P.R. Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun / Ogilby P.R. // *Chemical Society Reviews* – 2010. – T. 39 – № 8 – C.3181.
83. Hayyan M. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications / Hayyan M., Hashim M.A., AlNashef I.M. // *Chemical Reviews* – 2016. – T. 116 – № 5 – C.3029.
84. Sato T. Phototoxicity of Indocyanine Green under Continuous Fluorescent Lamp Illumination and Its Prevention by Blocking Red Light on Cultured Müller Cells / Sato T., Ito M., Ishida M., Karasawa Y. // *Investigative Ophthalmology & Visual Science* – 2010. – T. 51 – № 8 – C.4337.
85. Bäuml W. Photo-oxidative killing of human colonic cancer cells using indocyanine green and infrared light / Bäuml W., Abels C., Karrer S., Weiß T., Messmann H., Landthaler M., Szeimies R.-M. // *British Journal of Cancer* – 1999. – T. 80 – № 3–4 – C.360.
86. Reindl S. Quantum yield of triplet formation for indocyanine green / Reindl S.,

- Penzkofer A., Gong S.-H.H., Landthaler M., Szeimies R.M.M., Abels C., Bäuml W. // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* – 1997. – Т. 105 – № 1 – С.65.
87. Shirata C. Near-infrared photothermal/photodynamic therapy with indocyanine green induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through oxidative stress / Shirata C., Kaneko J., Inagaki Y., Kokudo T., Sato M., Kiritani S., Akamatsu N., Arita J., Sakamoto Y., Hasegawa K., Kokudo N. // *Scientific Reports* – 2017. – Т. 7 – № 1 – С.13958.
88. Nairat M. Investigating the role of human serum albumin protein pocket on the excited state dynamics of indocyanine green using shaped femtosecond laser pulses / Nairat M., Konar A., Kaniecki M., Lozovoy V. V, Dantus M. // *Physical Chemistry Chemical Physics* – 2015. – Т. 17 – № 8 – С.5872.
89. Tamai K. Photodynamic Therapy Using Indocyanine Green Loaded on Super Carbonate Apatite as Minimally Invasive Cancer Treatment / Tamai K., Mizushima T., Wu X., Inoue A., Ota M., Yokoyama Y., Miyoshi N., Haraguchi N., Takahashi H., Nishimura J., Hata T., Matsuda C., Doki Y., Mori M., Yamamoto H. // *Molecular Cancer Therapeutics* – 2018. – Т. 17 – № 7 – С.1613.
90. Hirano T. Singlet Oxygen Generation by Irradiation of Indocyanine Green (ICG) and its Effect to Tissues / Hirano T., Kohno E., Gohto Y., Obana A. // *Nippon Laser Igakkaishi* – 2007. – Т. 28 – № 2 – С.122.
91. Gratz H. Photo-isomerisation, triplet formation, and photo-degradation dynamics of indocyanine green solutions / Gratz H., Penzkofer A., Abels C., Szeimies R.-M., Landthaler M., Bäuml W. // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* – 1999. – Т. 128 – № 1–3 – С.101.
92. Tatikolov A.S. Influence of “Inert” Counterions on the Photochemistry of Some Cationic Polymethine Dyes / Tatikolov A.S., Dzhulibekov K.S., Shvedova L.A., Kuzmin V.A., Ishchenko A.A. // *The Journal of Physical Chemistry* – 1995. – Т. 99 – № 17 – С.6525.
93. Борисевич Ю.Е. Влияние  $\pi$ -электронного сопряжения хромофоров на реакционную способность триплетных состояний красителей с двумя

- хромофорами в реакциях переноса электрона / Борисевич Ю.Е., Кузьмин В.А., Ренге И.В. // Известия академии наук СССР. Серия Химическая – 1981. – Т. 8 – С.1796.
94. Давыдов А.С. Теория молекулярных экситонов / А. С. Давыдов – Наука, 1968.
95. Schaberle F.A. Computational study of steric and spectroscopic characteristics of bi-chromophoric cyanine dyes: Comparison with experimental data / Schaberle F.A., Galembeck S.E., Borissevitch I.E. // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy – 2009. – Т. 72 – № 4 – С.863.
96. Киприанов А.И. Спектры поглощения органических красителей, содержащих в молекуле два хромофора / Киприанов А.И. // Успехи химии – 1971. – Т. 40 – № 7 – С.1283.
97. Борисевич Ю.Е. Триплетные состояния бискарбоцианиновых красителей / Борисевич Ю.Е., Кузьмин В.А., Михайленко Ф.А., Дядюша Г.Г. // Доклады Академии наук СССР – 1976. – Т. 228 – С.375.
98. Альперович М.А. Химические превращения полиметиновых красителей в основном электронном состоянии / Альперович М.А., Райхина Р.Д., Хесин В.Г. // Успехи науч. фотогр – 1984. – Т. 22 – С.65.
99. Conceição D. Photochemistry and Cytotoxicity Evaluation of Heptamethinecyanine Near Infrared (NIR) Dyes / Conceição D., Ferreira D., Ferreira L. // International Journal of Molecular Sciences – 2013. – Т. 14 – № 9 – С.18557.
100. Castano A.P. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization / Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy – 2004. – Т. 1 – № 4 – С.279.
101. Кузьмин В.А. Спектрально-кинетические характеристики фотовозбужденных комплексов альбумина и индотрикарбоцианинового красителя с фосфонатными заместителями / Кузьмин В.А., Головина Г.В., Костюков А.А., Некипелова Т.Д., Подругина Т.А., Кривелева А.С., Матвеева Е.Д., Проскурнина М.В., Зефирова Н.С. // Химия высоких энергий – 2016. – Т. 50 – № 4 – С.331.

102. Tatikolov A.S. Polymethine dyes as spectral-fluorescent probes for biomacromolecules / Tatikolov A.S. // *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* – 2012. – Т. 13 – № 1 – С.55.
103. Radchenko A.S. Photoactivated biscarbocyanine dye with two conjugated chromophores: complexes with albumin, photochemical and phototoxic properties / Radchenko A.S., Kostyukov A.A., Markova A.A., Shtil A.A., Nekipelova T.D., Borissevitch I.E., Kuzmin V.A. // *Photochemical & Photobiological Sciences* – 2019. – Т. 18 – № 10 – С.2461.
104. Костюков А.А. Комплексы альфа-фетопротейна и сывороточного альбумина с бискарбоцианиновым красителем / Костюков А.А., Позднякова Н.В., Шевелев А.Б., Радченко А.Ш., Головина Г.В.В., Климович О.Н., Штиль А.А., Борисевич Ю.Е.Е., Кузьмин В.А.А., Debra C.K.C., Pablo J.G., André L.S.P., Lucimara P.F., Andre M.A., Борисевич Ю.Е.Е., Кузьмин В.А.А. // *Химия высоких энергий* – 2017. – Т. 51 – № 3 – С.248.
105. Ashur I. Photocatalytic Generation of Oxygen Radicals by the Water-Soluble Bacteriochlorophyll Derivative WST11, Noncovalently Bound to Serum Albumin / Ashur I., Goldschmidt R., Pinkas I., Salomon Y., Szewczyk G., Sarna T., Scherz A. // *The Journal of Physical Chemistry A* – 2009. – Т. 113 – № 28 – С.8027.
106. Pozdniakova N. V New Protein Vector ApE1 for Targeted Delivery of Anticancer Drugs / Pozdniakova N. V, Gorokhovets N. V, Gukasova N. V, Bereznikova A. V, Severin E.S. // *Journal of Biomedicine and Biotechnology* – 2012. – Т. 2012 – С.1.
107. Berg R.A. Second-order spectra of symmetric cyanine dyes / Berg R.A., Olson G.M., Pierce R.A. // *The Journal of Physical Chemistry* – 1967. – Т. 71 – № 10 – С.3352.
108. Kiprianov A.I. Absorption Spectra of Organic Dyes Containing Two Chromophores / Kiprianov A.I. // *Russian Chemical Reviews* – 1971. – Т. 40 – № 7 – С.594.
109. Davydov A.S. The theory of molecular excitons / Davydov A.S. // *Soviet Physics Uspekhi* – 1964. – Т. 7 – № 2 – С.145.

110. Ibrayev N.K. Investigation of Conformational and Electron Properties of Biscyanine Dyes / Ibrayev N.K., Yeroshina S.A., Ishchenko A.A., Mushkalo I.L. // *Molecular Crystals and Liquid Crystals* – 2005. – Т. 427 – № 1 – С.139/[451]-147/[459].
111. Borisevich Y.E. Effect of  $\pi$ -electron conjugation of the chromophores on the reactivity of the triplet states of dyes with two chromophores in electron-transfer reactions / Borisevich Y.E., Kuzmin V.A., Renge I. V // *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR Division of Chemical Science* – 1981. – Т. 30 – № 8 – С.14650.
112. Koch-Weser J. Binding of Drugs to Serum Albumin / Koch-Weser J., Sellers E.M. // *New England Journal of Medicine* – 1976. – Т. 294 – № 6 – С.311.
113. Кузьмин В.А. Новые фосфонатзамещенные трикарбоцианины и их взаимодействие с бычьим сывороточным альбумином / Кузьмин В.А., Подругина Т.А., Некипелова Т.Д., Дорошенко И.А., Проскурнина М.В., Головина Г.В., Радченко Е.В., Костюков А.А., Темнов В.В., Матвеева Е.Д., Палюлин В.А., Зефирова Н.С. // *Доклады Академии наук* – 2016. – Т. 470 – № 3 – С.293.
114. Sudlow G. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin / Sudlow G., Birkett D.J., Wade D.N. // *Molecular Pharmacology* – 1975. – Т. 11 – № 6 – С.824.
115. Sybyl-X 2.1 St. Louis, Mo. 2013. No Title / Sybyl-X 2.1 St. Louis, Mo. 2013., Sybyl-X 2.1 St. Louis, Mo., 2013. [www.certara.com](http://www.certara.com) C.L.P.
116. Sybyl-X 2.1 St. Louis, Mo. 2013. [www.certara.com](http://www.certara.com), Certara L P / Sybyl-X 2.1 St. Louis, Mo. 2013.
117. Trott O. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading / Trott O., Olson A.J. // *Journal of Computational Chemistry* – 2009. – Т. 31 – № 2 – С.NA-NA.
118. Lee J. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field / Lee J., Cheng X., Swails J.M., Yeom M.S., Eastman P.K., Lemkul J.A.,

- Wei S., Buckner J., Jeong J.C., Qi Y., Jo S., Pande V.S., Case D.A., Brooks C.L., MacKerell A.D., Klauda J.B., Im W. // *Journal of Chemical Theory and Computation* – 2016. – T. 12 – № 1 – C.405.
119. Huang J. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data / Huang J., MacKerell A.D. // *Journal of Computational Chemistry* – 2013. – T. 34 – № 25 – C.2135.
120. Pettersen E.F. UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis / Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. // *Journal of Computational Chemistry* – 2004. – T. 25 – № 13 – C.1605.
121. Vanommeslaeghe K. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields / Vanommeslaeghe K., Hatcher E., Acharya C., Kundu S., Zhong S., Shim J., Darian E., Guvench O., Lopes P., Vorobyov I., Mackerell A.D. // *Journal of Computational Chemistry* – 2009. – T. 31 – № 4 – C.NA-NA.
122. Roe D.R. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data / Roe D.R., Cheatham T.E. // *Journal of Chemical Theory and Computation* – 2013. – T. 9 – № 7 – C.3084.
123. Avasthi K. Folded conformations due to arene interactions in dissymmetric and symmetric butylidene-linker models based on pyrazolo[3,4- d ]pyrimidine, purine and 7-deazapurine / Avasthi K., Shukla L., Kant R., Ravikumar K. // *Acta Crystallographica Section C Structural Chemistry* – 2014. – T. 70 – № 6 – C.555.
124. Yarmoluk S.M. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. Part 19: new method for the covalent labeling of oligonucleotides with pyrylium cyanine dyes / Yarmoluk S.M., Kostenko A.M., Dubey I.Y. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* – 2000. – T. 10 – № 19 – C.2201.
125. Ogul'chansky T.Y. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. XVII. Towards an aggregation of cyanine dyes in solutions as a factor facilitating nucleic acid detection / Ogul'chansky T.Y., Yashchuk V., Losytskyy M.Y., Kocheshev I., Yarmoluk S.. // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular*



Spectroscopy – 2000. – Т. 56 – № 4 – С.805.

126. Delaey E. A comparative study of the photosensitizing characteristics of some cyanine dyes / Delaey E., Laar F. van, Vos D. De, Kamuhabwa A., Jacobs P., Witte P. de // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* – 2000. – Т. 55 – № 1 – С.27.

127. Licha K. Optical imaging in drug discovery and diagnostic applications / Licha K., Olbrich C. // *Advanced Drug Delivery Reviews* – 2005. – Т. 57 – № 8 – С.1087.

128. Wainwright M. Photodynamic Therapy: The Development of New Photosensitisers / Wainwright M. // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* – 2008. – Т. 8 – № 3 – С.280.

129. Kabatc J. The photophysical and photochemical properties of the oxacarbocyanine and thiocarbocyanine dyes / Kabatc J., Paçzkowski J. // *Dyes and Pigments* – 2004. – Т. 61 – № 1 – С.1.

130. Jia K. Characterization of Photoinduced Isomerization and Intersystem Crossing of the Cyanine Dye Cy3 / Jia K., Wan Y., Xia A., Li S., Gong F., Yang G. // *The Journal of Physical Chemistry A* – 2007. – Т. 111 – № 9 – С.1593.

131. Лифанов Ю.И. Цис-транс-изомеризация полиметиновых красителей при импульсном фотовозбуждении / Лифанов Ю.И., Кузьмин В.А., Карякин А.В., Чибисов А.К., Левкоев И.И. // *Известия академии наук СССР. Серия Химическая* – 1973. – Т. 4 – С.787.

132. Борисевич Ю.Е. Влияние резонансных взаимодействий на спектры погашения красителей с двумя хромофорами / Борисевич Ю.Е. // *Доклады Академии наук СССР* – 1978. – Т. 241 – С.743.

133. Reis E.R. Photodynamic activity of protoporphyrin IX in Harderian glands of Wistar rats: Monitoring by gland fluorescence / Reis E.R., Metze K., Nicola E.M.D., Nicola J.H., Borissevitch I.E. // *Journal of Luminescence* – 2013. – Т. 137 – С.32.

134. Vogelsang J. A Reducing and Oxidizing System Minimizes Photobleaching and Blinking of Fluorescent Dyes / Vogelsang J., Kasper R., Steinhauer C., Person B., Heilemann M., Sauer M., Tinnefeld P. // *Angewandte Chemie International Edition* – 2008. – Т. 47 – № 29 – С.5465.

135. Wang M. Accelerated Photobleaching of a Cyanine Dye in the Presence of a Ternary Target DNA, PNA Probe, Dye Catalytic Complex: A Molecular Diagnostic / Wang M., Holmes-Davis R., Rafinski Z., Jedrzejewska B., Choi K.Y., Zwick M., Bupp C., Izmailov A., Paczkowski J., Warner B., Koshinsky H. // *Analytical Chemistry* – 2009. – Т. 81 – № 6 – С.2043.
136. Schaberle F.A. Spectroscopic studies of the interaction of bichromophoric cyanine dyes with DNA. Effect of ionic strength / Schaberle F.A., Kuzmin V.A., Borissevitch I.E. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* – 2003. – Т. 1621 – № 2 – С.183.
137. Aggarwal L.P.F. Effects of NaCl upon TPPS4 triplet state characteristics and singlet oxygen formation / Aggarwal L.P.F., Baptista M.S., Borissevitch I.E. // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* – 2007. – Т. 186 – № 2–3 – С.187.
138. Pavanelli R. Phototransformation of cyanine dye with two chromophores. effects of oxygen and dye concentration / Pavanelli R., Amado L.S., Mostaço L.B., Schaberle, F.A. Galembeck, S.E. Gonçalves P.J., Silva Costa E., Ferreira R.L., Nekipelova T.D., Kostyukov A.A., Radchenko A.S., Shtil A.A., Kuzmin V.A., Borissevich I.E., Silva É.R., // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* – 2017. – Т. 349 – С.42.
139. Miwa M. *Photodynamic Characteristics of ICG Fluorescence Imaging Tokyo: Springer Japan, 2016. – 3.*
140. Дарманян А.П. Исследование фотоизомеризации полиметиновых красителей при низких температурах методом импульсного лазерного фотолиза / Дарманян А.П., Кузьмин В.А., Панова Л.М. // *Известия академии наук СССР. Серия Химическая* – 1978. – Т. 3 – С.691.
141. Костюков А.А. Взаимодействие триплетного состояния бискарбоцианинового красителя с нитроксильным радикалом / Костюков А.А., Некипелова Т.Д., Борисевич Ю.Е., Кузьмин В.А. // *Химия высоких энергий* – 2019. – Т. 53 – № 1 – С.76.
142. Костюков А.А. Триплетные состояния комплексов бис-карбоцианинового

красителя и альбумина / Костюков А.А., Некипелова Т.Д., Радченко А.Ш., Головина Г.В., Климович О.Н., Штиль А.А., Codognato D.C.K., Goncalves P.J., Борисевич Ю.Е., Кузьмин В.А. // Химия высоких энергий – 2017. – Т. 51 – № 2 – С.161.

143. Atchison J. Iodinated cyanine dyes: a new class of sensitizers for use in NIR activated photodynamic therapy (PDT) / Atchison J., Kamila S., Nesbitt H., Logan K.A., Nicholas D.M., Fowley C., Davis J., Callan B., McHale A.P., Callan J.F. // Chemical Communications – 2017. – Т. 53 – № 12 – С.2009.

144. Gerola A.P. Properties of Chlorophyll and Derivatives in Homogeneous and Microheterogeneous Systems / Gerola A.P., Tsubone T.M., Santana A., Oliveira H.P.M. de, Hioka N., Caetano W. // The Journal of Physical Chemistry B – 2011. – Т. 115 – № 22 – С.7364.

145. Ezzeddine R. Effect of molecular characteristics on cellular uptake, subcellular localization, and phototoxicity of Zn (II) N-alkylpyridylporphyrins / Ezzeddine R., Al-Banaw A., Tovmasyan A., Craik J.D., Batinic-Haberle I., Benov L.T. // Journal of Biological Chemistry – 2013. – Т. 288 – № 51 – С.36579.

146. Pavani C. Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers / Pavani C., Uchoa A.F., Oliveira C.S., Iamamoto Y., Baptista M.S. // Photochem. Photobiol. Sci. – 2009. – Т. 8 – № 2 – С.233.

147. Радченко А.Ш. Супертушение флуоресценции интеркалированного в ДНК цианинового красителя при комплексообразовании с полиакрилатом золота / Радченко А.Ш., Абзаева К.А., Корман Д.Б., Островская Л.А., Костюков А.А., Шибяева А.В., Бирюкова Ю.К., Погонин В.И., Некипелова Т.Д., Кузьмин В.А. // Химия высоких энергий – 2018. – Т. 52 – № 3 – С.242.

148. Engelmann F.M. Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes / Engelmann F.M., Mayer I., Gabrielli D.S., Toma H.E., Kowaltowski A.J., Araki K., Baptista M.S. // Journal of Bioenergetics and Biomembranes – 2007. – Т. 39 – № 2 – С.175.