

Державна наукова установа «Науково-технологічний комплекс  
«Інститут монокристалів»  
Національна академія наук України  
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна  
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Говор Ірина Вікторівна**

УДК 577.336+543.426+543.428

## **ДИСЕРТАЦІЯ**

**«Флуоресцентні системи на основі комбінацій чутливих до  
мікрооточення барвників для раціометричного визначення  
конформаційних змін протеїнів»**

Спеціальність 02.00.04 – Фізична хімія  
(Хімічні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук  
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

І. В. Говор

Науковий керівник:  
Татарець Анатолій Леонідович,  
кандидат хімічних наук,  
старший дослідник

Харків – 2021

## АНОТАЦІЯ

*Говор І. В.* Флуоресцентні системи на основі комбінацій чутливих до мікрооточення барвників для раціометричного визначення конформаційних змін протеїнів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.04 – фізична хімія (Хімія). – Державна наукова установа «Науково-технологічний комплекс «Інститут монокристалів» Національна академія наук України; Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків, 2021.

*Актуальність теми.* Раціометричні флуоресцентні методи використовують відношення сигналів на двох довжинах хвиль. До цих методів, зокрема, відносяться методи на основі ферстерівського резонансного переносу енергії (FRET), який є популярним інструментом для вивчення конформацій протеїнів. Для виявлення FRET застосовують нечутливі до оточення флуоресцентні барвники, які ковалентно зв'язують з аналітом. Маркування протеїнів донорними та акцепторними барвниками відбувається на специфічних ділянках протеїнів і часто є складним та вимагає розробки певної стратегії маркування для кожного типу протеїнів. Такий підхід обмежує використання методу FRET у гетерогенних біологічних системах та може призводити до заниження фактичної ефективності FRET, якщо більшість молекул буде промарковано лише донором. Явище, на якому основана дія флуоресцентних зондів (барвників, які взаємодіють з протеїном нековалентно), а саме залежність спектральних характеристик та інтенсивності флуоресценції від оточення, повинно приводити до додаткових змін в ефективності FRET. Таким чином, чутливість барвника-донора та/або барвника-акцептора до мікрооточення може покращити чутливість флуоресцентних біоаналітичних методів, які основані на раціометричних вимірюваннях та FRET. У той же час, раціометричні системи та донорно-акцепторні FRET пари, в яких обидва барвники були б чутливими до

мікрооточення та не зв'язані ковалентне між собою раніше не використовувались для визначення змін конформацій протеїнів.

Актуальність теми визначається необхідністю розробки та покращення флуоресцентних методів аналізу в медичній діагностиці та медико-біологічних дослідженнях, зокрема для визначення конформаційних змін у протеїнах, а також одержання нових діагностичних матеріалів з поліпшеними експлуатаційними характеристиками для цих застосувань, а саме раціометричних систем флуоресцентних барвників, дія яких основана на визначенні FRET.

*Дисертація присвячена.* Встановленню закономірностей щодо зв'язку між структурою та спектрально-люмінесцентними і фотофізичними властивостями барвників для створення раціометричних систем з резонансним переносом енергії для розробки нового, чутливого методу визначення конформаційних змін у протеїнах.

На підставі аналізу літературних даних було зроблено припущення, що поєднання двох відомих флуоресцентних методів, а саме комбінація методу визначення FRET, але з використанням двох чутливих до мікрооточення флуоресцентних барвників-зондів у донорно-акцепторних парах, дозволить покращити чутливість флуоресцентних біоаналітичних методів, а саме визначення змін конформації протеїнів.

Було розроблено схему відбору барвників для використання у запропонованому методі, яка включає оцінку розчинності та схильності до агрегації, спектральних та фотофізичних властивостей барвника у водному фосфатному буфері з рН 7.4 (PB) (полярному розчиннику) та хлороформі (неполярному розчиннику), а також у присутності бичачого сироваткового альбуміну (БСА) як модельного протеїну.

Пошук барвників здійснювався серед класів сквараїнових, норсквараїнових та стирилових барвників. Ці барвники були обрані з огляду на те, що деякі з них вже були запропоновані у літературі для визначення концентрації або наявності протеїнів у розчинах, але інформації про їх

взаємодію з протейнами було недостатньо для використання у запропонованому методі.

Сквараїнові та норсквараїнові барвники, містять циклобутеновий фрагмент (похідні квадратної кислоти) в поліметиновому ланцюзі та термінальні гетероциклічні фрагменти. Норсквараїни відносяться до сквараїнів та містять фрагменти незаміщених за атомом азоту індоленінових циклів, через що мають здатність до оборотного депротонування в лужному середовищі. Сквараїни та норсквараїни у сквараїновому циклі містили атом кисню, залишки барбітурової кислоти або малондинітрилу. В гідрофобних сквараїнах та норсквараїнах атоми азоту та атоми вуглецю в третьому положенні індоленінового циклу були заміщені метильними групами. Гідрофільність барвників збільшували введенням двох сульфогруп в положенні п'ять індоленінових циклів та/або однією чи двома карбоксипентильними групами у третьому положенні індоленінового циклу. Серед стирилових барвників був обраний (тозилат 4-(4-диметиламінофеніл)-1-етеніл)-1-тридецилпіридинію) з довгим алкільним (тридецильним) замісником.

Гідрофобні барвники, які не містять сульфогруп, значно агрегують у водному середовищі, що спектрально підтверджується уширенням смуги поглинання та/або появою додаткової смуги, розташованої на 40-50 нм у більш короткохвильовій області. Через агрегацію квантові виходи флуоресценції сквараїнів у водному буферному розчині є дуже низькими, а у аналогічних за структурою норсквараїнів флуоресценція взагалі відсутня. Сквараїни більш чутливі до полярності оточення, що виявляється у зниженні їх квантового виходу у 3.2-6.3 разів при переході від розчину у неполярному розчиннику (хлороформі) до полярного середовища (метанолу), в той час як квантовий вихід норсквараїнів майже не залежить від полярності середовища. Введення сульфогруп підвищує розчинність барвників у водному розчині, але водночас зменшує чутливість барвників до полярності оточення. Наявність однієї карбоксильної групи також сприяє розчинності барвників у водному розчині, проте зберігає чутливість барвників до полярності середовища.

Для стирилового барвника максимуми поглинання та флуоресценції істотно залежать від полярності розчинника та при переході від РВ до хлороформу максимум поглинання зсувається у довгохвильову область на 32 нм, а флуоресценція – у короткохвильову на 30 нм. Через значну агрегацію, у водних середовищах стирил не флуоресціює.

Для отримання стабільних комплексів барвників з БСА необхідний час, протягом якого відбувається поступове зміщення максимуму спектра флуоресценції. При цьому спектральні властивості комплексів залежать від концентрації БСА. Норсквараїни є менш чутливими до присутності протеїну (БСА), ніж сквараїнові барвники. На відміну від барвників з сульфогрупами, що не змінюють своїх спектральних властивостей у присутності БСА, при утворенні комплексів з БСА спектральні смуги сквараїнів зсуваються у довгохвильову частину спектра на 10–36 нм відносно максимумів у водних розчинах, при цьому квантові виходи зростають до 47 разів.

Відповідно до схеми відбору барвників, для використання у запропонованого методу найліпшими виявилися несиметричні сквараїни з атомом кисню та диціанометиленовою групою у сквартному фрагменті та карбоксипентильною групою у третьому положенні індоленінового циклу і стирил. Ці барвники дослідили в комплексі з шістьма модельними протеїнами: бичачим сироватковим альбуміном (БСА) і сироватковим альбуміном людини (САЛ), що не містять жирних кислот, а також бичачим сироватковим альбуміном і сироватковим альбуміном людини з жирними кислотами (відповідно БСАж і САЛж), пероксидазою хрому (ПХ) та лізоцимом.

Сквараїни мають більші квантові виходи у комплексах з альбумінами людини, який залежить від наявності в ньому жирних кислот. Стирил, навпаки, більші квантові виходи має в комплексах з альбумінами бика, який знижується при наявності в альбуміні жирних кислот. Найменші квантові виходи барвники мають з ПХ, а з лізоцимом взагалі не утворюють комплексів.

Денатурацію протеїнів ініціювали сечовиною в концентрації до 7 М, яка безпосередньо майже не впливає на властивості барвників. В якості одиночних зондів, при денатурації протеїнів, оксосквараїн виявляє найбільшу чутливість до

змін САЛ, стирил до БСА, у той час як диціанометиленовий сквараїн не проявляє явної селективності до певного протеїну. Найменшу чутливість до конформаційних змін барвники мають у комплексі з ПХ.

Були дослідженні дві FRET-пари: сквараїнова та стирил-оксосквараїн. При дослідженні барвників в якості FRET-пар при денатурації протеїнів, розраховували два параметри, а саме уявну ефективність переносу енергії  $E_{\text{FRET}}$ , за зміною флуоресценції донора у присутності та відсутності акцептора та FRET ratio, що є співвідношенням флуоресценції донора і акцептора у сумісному спектрі. Перенос енергії між барвниками залежить від типу протеїну, з яким FRET пара барвників утворює комплекс та за різними методами розрахунку досягається різна чутливість пар до конформаційних змін протеїнів. Однак, при використанні барвників в парі є більш чутливим методом визначення конформаційних змін протеїнів, ніж використання барвників в якості одиночних зондів. Для сквараїнової пари більша чутливість спостерігається при обчислюванні за методом  $E_{\text{FRET}}$ , а для пари стирил-сквараїн більша чутливість за методом FRET ratio. Водночас, для обох пар за допомогою раціометричного параметра FRET ratio стає можливою реєстрація малих конформаційних змін протеїнів.

На прикладі БСА та сквараїнової пари також були перевірені і можливі способи зв'язку барвників з протеїном. При ковалентному зв'язуванні донора до протеїну та не ковалентному зв'язку акцептора обидва визначених параметра зменшуються, а при ковалентному зв'язуванні як донора так і акцептора,  $E_{\text{FRET}}$  становить лише 10%.

Розроблений метод був випробуваний для визначення стану зразків плазми крові. Досліджено три типи зразків: нативна плазма (зразки, що не були заморожені), зразки, що заморожували до  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  та зразки з вичерпаним терміном придатності (негативний контроль). При використанні барвників як зондів, їх інтенсивність флуоресценції у кожному з типів зразків змінюється незначним чином. Для FRET-пар: у зразках, що не були заморожені та заморожувалися до  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , зі зниженням температури заморожування для обох пар раціометричний параметр FRET ratio майже не

змінюється, а ефективність переносу енергії зростає у 1.3 рази для сквараїнової пари та зменшується у 1.2 рази для пари стирил-сквараїн.

Відносно зразків нативної плазми до зразків з вичерпаним терміном придатності ефективність переносу енергії та FRET ratio змінюються однаково: у 1.6 разів для сквараїнової пари та 1.3 рази для пари стирил-сквараїн, що дозволяє визначати придатність плазми крові для використання.

У роботі *вперше*: (1) з'ясовано вплив полярності середовища та наявності протеїнів на спектрально-люмінесцентні властивості ряду норсквараїнових і сквараїнових барвників; (2) розроблено новий флуоресцентний метод визначення зміни конформації протеїнів із застосуванням ферстерівського резонансного переносу енергії між барвниками, чутливими до мікрооточення та не зв'язаних з аналітом ковалентним зв'язком; (3) оцінено чутливість методу виявлення конформаційних змін у протеїні, ініційованих розчинами сечовини різної концентрації (0—7 М); (4) визначено залежність ефективності переносу енергії в комплексах донорно-акцепторних пар барвників з протеїнами від структури та молекулярної маси протеїнів; (5) продемонстровано можливість використання нового методу у системі гетерогенного протеїнового складу (плазма крові людини) для визначення змін, що викликані заморожуванням та довгостроковим низькотемпературним зберіганням.

*Практичне значення одержаних результатів* полягає у дослідженні комплексів [барвник–донор]–[протеїн]–[барвник–акцептор] та змін ефективності переносу енергії між барвниками при зміні конформації протеїну, що дозволило розробити новий флуоресцентний метод виявлення конформаційних змін в протеїнах. Показано можливість використання нових флуоресцентних матеріалів (донорно-акцепторні пари барвників) для визначення змін плазми крові людини, викликаних дією низьких температур. Новий метод є перспективними флуоресцентними засобом для медицини та біології.

**Ключові слова:** раціометричне детектування, ферстерівський резонансний перенос енергії (FRET), сквараїнові барвники, норсквараїнові барвники, стириловий барвник, протеїни, зміни конформації протеїнів, ефективність переносу енергії, FRET ratio.

## ABSTRACT

*Hovor I. V.* The fluorescent systems based on combinations of microenvironment-sensitive dyes for ratiometric determination of conformational changes of proteins. – Qualifying scientific work, the manuscript.

Thesis for the Candidate of Science degree in Chemistry, specialty 02.00.04 Physical Chemistry (Chemistry). – State Scientific Institution «Institute for Single Crystals» of National Academy of Science of Ukraine; V. N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2021.

*Actuality of theme.* Ratiometric fluorescence methods use the ratio of signals at two wavelengths. These methods include, in particular, methods based on Förster resonance energy transfer (FRET), which is a popular tool for studying the conformations of proteins. Environmentally insensitive fluorescent dyes covalently bound to the analyte are used to detect FRET. Labeling of proteins with donor and acceptor dyes takes place at specific sites of proteins and is rather complicated procedure that requires the development of a specific labeling strategy for each type of protein. This approach limits the use of the FRET method in heterogeneous biological systems and may underestimate the actual efficiency of FRET if most molecules are labeled only by the donor. The phenomenon in which fluorescent probes (dyes that non-covalently interact with the protein) are based, namely the dependence of the spectral characteristics and fluorescence intensity on the environment, should lead to additional changes in the efficiency of FRET. Thus, the sensitivity of the donor dye and / or the acceptor dye to the microenvironment may improve the sensitivity of fluorescent bioanalytical methods, which are based on ratiometric measurements and FRET. At the same time, ratiometric systems and FRET donor-acceptor pairs, in which both dyes would be sensitive to the microenvironment and not covalently bound to each other, have not previously been used to detect changes in protein conformation. The relevance of the topic is determined by the need to develop and improve fluorescent methods of analysis in medical diagnostics and biomedical research, in particular to determine conformational changes in proteins, as well as to



obtain new diagnostic materials with improved performance for these applications, namely ratiometric systems of fluorescent dyes based on the definition of FRET.

*The thesis is devoted to* establishing patterns for the relationship between the structure and spectral, luminescent and photophysical properties of dyes in order to create the ratiometric systems with resonant energy transfer to develop a new, sensitive method for determining the conformational changes in proteins.

Following the analysis of literature data, it was suggested that a combination of two known fluorescent methods, namely a combination of the FRET method, and method which uses two microenvironment-sensitive fluorescent dye probes in donor-acceptor pairs, would improve the sensitivity of fluorescent bioanalytical methods, namely the determination of changes in protein conformation.

A scheme of the dyes selection for use in the proposed method was developed. It includes the evaluation of solubility and tendency to aggregation, spectral and photophysical properties of the dye in aqueous phosphate buffer with pH 7.4 (PB) (polar solvent) and chloroform (nonpolar solvent), as well as in the presence of bovine serum albumin (BSA) as a model protein.

The search for dyes was carried out among the classes of squaraine, norsquaraine and styryl dyes. These dyes were chosen because some of them have already been proposed in the literature to determine the concentration or presence of proteins in solutions, but information about their interactions with proteins was insufficient for use in the proposed method.

Squaraine and norsquaraine dyes contain a cyclobutene moiety (squaric acid derivatives) in a polymethine chain and two terminal heterocyclic moieties. Norsquaraines are squaraines that contain fragments of unsubstituted nitrogen atom within the indolenine cycles, due to which they have the ability to reversible deprotonation in an alkaline environment. Squaraines and norsquaraines contain either an oxygen atom, or barbituric acid residue, or malonodinitrile group in the squarate moiety. In hydrophobic squaraines and norsquaraines, nitrogen atoms and carbon atoms in the third position of the indolenine ring are substituted by methyl groups. The hydrophilicity of the dyes was increased by the introduction of two or more sulfo-groups at 5 and 1 positions of the indolenine moiety and/or one or two carboxypentyl

groups in the indolenine fragment. 4-(4-Dimethylaminophenyl)-1-ethenyl)-1-tridecylpyridinium) with a long alkyl (tridecyl) substituent was chosen among the styryl dyes.

Hydrophobic dyes, that do not contain sulfo-groups, significantly aggregate in an aqueous medium, what is spectrally detectable by the broadening of the absorption band and/or the appearance of an additional band located in 40-50 nm shorter wavelength region. Due to aggregation, the fluorescence quantum yields of squaraines are very low in aqueous buffer solution, and fluorescence of norsquaraines similar by structure is completely absent. Squaraines are more sensitive to the polarity of the environment, what is manifested in a decrease in their quantum yield by 3.2-6.3 times during the transition from a solution in a nonpolar solvent (chloroform) to a polar medium (methanol), while the quantum yield of norsquaraines is almost independent from the polarity. The introduction of sulfo-groups increases the solubility of dyes in aqueous solution, but also it reduces the sensitivity of dyes to the polarity of environment. The presence of one carboxyl group also contributes to the solubility of the dyes in aqueous solution, but retains the sensitivity of the dyes to the polarity of the medium.

The position of absorption and fluorescence maxima of styryl dye significantly depends on the polarity of the solvent and upon transition from PB to chloroform, the absorption maximum shifts to the long-wavelength region by 32 nm and the fluorescence one shifts to the short-wavelength region by 30 nm. Due to the significant aggregation, styryl dye does not fluoresce in aqueous media. Stable complexes of dyes with BSA are formed within some period of time, during which a gradual shift of fluorescence maximum of the spectrum is observed. The spectral properties of the complexes depend on the concentration of BSA. Norsquaraines are less sensitive to the presence of protein (BSA) than squaraine dyes. In contrast to dyes with sulfo-groups, which do not change their spectral properties in the presence of BSA, the spectral bands of squaraines are red-shifted by 10–36 nm relatively to the maxima in aqueous solutions upon formation of complexes with BSA.

According to the dye selection scheme, the asymmetric squaraines with an oxygen atom and a dicyanomethylene group in the squarate moiety and one

carboxypentyl group in indolenine cycle as well as styryl dye proved to be the best for use in the proposed method. These dyes were tested in complexes with six model proteins: bovine serum albumin (BSA) and human serum albumin (HSA), which do not contain fatty acids, as well as bovine serum albumin and human serum albumin with fatty acids (BSAf and HSAf, respectively), horseradish peroxidase (HRP) and lysozyme.

Squaraines have the higher quantum yields in complexes with human albumins, which depend on the presence of fatty acids. Styryl dye, on the other hand, has the higher quantum yields in complexes with bovine albumins, which is reduced in the presence of fatty acids in albumin. The lowest quantum yields of dyes were observed in complexes with HRP, while with lysozyme the complexes weren't formed at all.

Protein denaturation was initiated by urea at concentrations of up to 7 M, which directly almost does not have effect on the properties of the dyes. As a single probe, upon the denaturation of proteins, oxosquaraine shows the greatest sensitivity to changes in HSA, styryl dye — to BSA, while dicyanomethylene squaraine does not show clear selectivity towards a particular protein. The lowest sensitivity of the dyes to conformational changes are shown in complexes with HRP.

Two FRET pairs were studied: first one based on two squaraines and styryl-oxosquaraine pair. Two main parameters were calculated to study the efficiency of dyes as FRET pairs upon protein denaturation. The first one is the efficiency of energy transfer  $E_{\text{FRET}}$ , calculated as the change of donor fluorescence in the presence and in the absence of acceptor. The other one is FRET ratio, which is the ratio of donor and acceptor fluorescence in the conjoint spectrum. The energy transfer between dyes depends on the type of protein with which the FRET pair forms a complex, and different calculation methods provide the different sensitivity of pairs towards the conformational changes in proteins. However, the use of dyes in pairs is a more sensitive method for determining the conformational changes in proteins as compared to the use of dyes as single probes. The greater sensitivity when calculated by the  $E_{\text{FRET}}$  method is observed for the squaraine pair, while the styryl-squaraine pair reveals the higher sensitivity when using the FRET ratio method. At the same time,

the FRET ratio parameter makes it possible to register the small conformational changes in proteins for both of the pairs.

On the example of BSA and squaraine pair, there were the possible ways of binding of the dyes to protein also tested. In case of covalent binding of the donor to the protein and non-covalent binding of the acceptor, both defined parameters decrease, and in case of covalent binding of both the donor and the acceptor, the  $E_{\text{FRET}}$  is only 10%.

The developed method has been tested to determine the status of blood plasma samples. Three types of samples were studied: native plasma (samples that weren't frozen), samples that were frozen to  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  or  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and samples after an expiry date (negative control). The fluorescence intensity in each of the sample types is slightly changed if dyes were used as single probes. As for FRET pairs, in samples that have not been frozen and frozen to  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  or  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , with decreasing of freezing temperature the FRET ratio parameter is almost unchanged for both pairs, while the energy transfer efficiency increases by 1.3 times for squaraine pair and decreases by 1.2 times for the styryl-squaraine pair.

Compared to the native plasma samples, the efficiency of energy transfer and FRET ratio in expired samples change equally: 1.6 times for squaraine pair and 1.3 times for styryl-squaraine pair, which allows to determine the suitability of blood plasma for the use.

In the thesis, *for the first time*: (1) the influence of the polarity of the medium and the presence of proteins on the spectral-luminescent properties of a number of nonsquaraine and squaraine dyes was clarified; (2) a new fluorescent method for determining the change in the conformation of proteins using Förster resonant energy transfer between dyes sensitive to the microenvironment and not bound to the analyte by a covalent bond was created; (3) the sensitivity of the method of detecting the conformational changes in protein initiated by urea solutions of different concentrations (0-7 M) was evaluated; (4) the dependence of the structure and molecular mass of proteins on the energy transfer efficiency in complexes of donor-acceptor pairs of the dyes with proteins was determined; (5) the possibility of application of a new method in the system of heterogeneous protein composition

(human blood plasma) to determine the changes caused by freezing and long-term low-temperature storage was demonstrated.

*The practical significance of the obtained results* consists of the study of complexes [dye-donor] - [protein] - [dye-acceptor] and changes in the efficiency of energy transfer between dyes with changing the conformation of the protein, which allowed developing the new fluorescent method for detecting the conformational changes in proteins. The possibility of using the new fluorescent materials (donor-acceptor pairs of dyes) to determine the changes in human blood plasma caused by low temperatures was shown. The new method is a promising fluorescent tool for medicine and biology.

*Keywords:* ratiometric detection, Förster resonance energy transfer (FRET), squaraine dyes, nonsquaraine dyes, styryl dye, proteins, protein conformation changes, energy transfer efficiency, FRET ratio.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### *Публікації у періодичних наукових виданнях інших держав, які входять до міжнародних наукометричних баз:*

1. Tracing the conformational changes in BSA using FRET with environmentally-sensitive squaraine probes / **Iryna V. Govor**, Anatoliy L. Tatarets, Olena M. Obukhova, Ewald A. Terpetschnig, Gary Gellerman, Leonid D. Patsenker // Methods Appl. Fluoresc. – 2016. – Vol. 4, Is. 2. – Art. num. 024007. (Scopus, Web of Science) *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, прийнято участь у написанні тексту статті та обговоренні результатів.*

2. Molecular structure and spectral properties of indolenine based norsquaraines versus squaraines / Olga S. Kolosova, Svitlana V. Shishkina, Vered Marks, Gary Gellerman, **Iryna V. Govor**, Anatoliy L. Tatarets, Ewald A. Terpetschnig, Leonid D. Patsenker // Dyes and Pigments. – 2019. – Vol. 163. – P. 318-329. (Scopus, Web of Science) *Здобувачкою виконано спектральні та фотофізичні дослідження барвників, прийнято участь у підготовці статті до друку.*

3. Water-soluble norsquaraine dyes for protein labeling and pH-sensing applications / **Iryna V. Govor**, Olga S. Kolosova, Edward V. Sanin, Olena M. Obukhova, Anatoliy L. Tatarets, Ewald A. Terpetschnig, Leonid D. Patsenker // Dyes and Pigments. – 2019. – Vol. 170. – Art. num. 107567. (Scopus, Web of Science) *Здобувачкою виконано спектральні та фотофізичні дослідження барвників, прийнято участь у підготовці статті до друку.*

### *Публікації у періодичних наукових фахових виданнях України:*

4. Вплив конформаційних змін у молекулі альбуміну (BSA) на спектральні властивості сквараїнового и диціанометилен-сквараїнового барвників / **І. В. Говор**, О. М. Обухова, А. Л. Татарец, О. С. Колосова, Л. Д. Паценкер // Вісник Одеського національного університету, Серія: Хімія. – 2018. – Т. 23, Вип. 3(67). – С. 67-79. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, підготовлено статтю до друку.*

5. Застосування стирилового та сквараїнового барвників для визначення конформаційних змін у молекулах протеїнів / **І. В. Говор**, І. А. Федюняєва, О. М. Обухова, А. Л. Татарець, О. С. Колосова // Вісник Одеського національного університету, Серія: Хімія. – 2020. – Т. 25, Вип. 3(75). – С. 94-103. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, підготовлено статтю до друку.*

6. Comparison of squaraine and nonsquaraine dyes for biomedical applications / **I. V. Govor**, O. S. Kolosova, O. M. Obukhova, A. L. Tatarets, L. D. Patsenker // Functional materials. – 2020. – Vol. 27, Is. 4. – P. 836-845. (Scopus, Web of Science) *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, підготовлено статтю до друку.*

***Наукові праці апробаційного характеру (тези доповідей на наукових конференціях) за темою дисертації:***

7. Govor I. V. New method for assessing the conformational changes of proteins: Förster resonance energy transfer between the microenvironment sensitive squaraine dyes / **I. V. Govor** // XIV Kharkiv young scientists conference on Radiophysics, Electronics, Photonics and Biophysics, 14-17 October 2014 : abstracts – Kharkiv (Ukraine), 2014. – P. ВІО-9. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, написано текст тез, підготовлено усну доповідь.*

8. Говор И. В. Исследование конформационных изменений белков с применением донорно-акцепторной пары флуоресцентных зондов / **И. В. Говор** // «Холод в биологии и медицине. Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии»: 39-я Ежегодная конференция молодых ученых, 20–21 мая 2015 г. : тезисы доп. – Харьков, 2015. – С. 191. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, написано текст тез, підготовлено усну доповідь.*

9. Application of FRET between Environment-Sensitive Squaraine Dyes for Assessment of the Conformational Changes of Proteins / A. L. Tatarets, **I. V. Govor**, O. M. Obukhova, E. A. Terpetschnig, L. D. Patsenker // The 14<sup>th</sup> International Conference on Methods and Applications in Fluorescence, 13-16 September 2015 :

abstracts – Würzburg (Germany), 2015. – P. 233. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, підготовлено стендову доповідь.*

10. Говор И. В. Применение ферстеровского резонансного переноса энергии между сквараиновыми красителями для оценки конформационных изменений белков / **И. В. Говор**, А. Л. Татарец, Л. Д. Паценкер // "Актуальные проблемы молекулярной спектроскопии конденсированных сред" : V Международная конференция, 22-24 сентября 2016 г. : тезисы докл. – Самарканд (Узбекистан), 2016. – С. 51-52. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, написано текст тез.*

11. Environment-sensitive fluorescent probes for the intensity and FRET based tracing of the conformational changes in proteins / A. Tatars, **I. Hovor**, I. Fedyunyayeva, E. Terpetschnig, L. Patsenker // The 15<sup>th</sup> Conference on Methods and Applications in Fluorescence, 10-13 September 2017 : abstracts – Bruges (Belgium), 2017. – P. 277. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, підготовлено стендову доповідь.*

12. Говор И. В. Влияние микроокружения на спектральные свойства красителей S485, Sq634 и Sq685 / **И. В. Говор** // "Хімічні Каразінські читання – 2018" : X Всеукраїнська наукова конференція студентів та аспірантів, 23-25 квітня 2018 р. : тези доп. – Харків, 2018. – С.158-159. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, написано текст тез, підготовлено усну доповідь.*

13. Говор И. Фотофизические свойства красителей S485, Sq634 и Sq685 и их применение для мониторинга конформационных изменений в протеинах / **И. Говор** // XIII Всеукраїнська конференція молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії, 2-4 травня 2018 р. : тези доп. – Харків, 2018. – С. 49. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, написано текст тез, підготовлено усну доповідь.*

14. Synthesis , molecular structure and spectral properties of indolenine based norsquaraines versus squaraines / O. S. Kolosova, A. L Tatars, I. V. Hovor, S. V. Shishkina, L. D. Patsenker // "Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles" : 8<sup>th</sup> International Conference in memoriam of Prof. Valeriy Orlov (CNCH-2018),



12-16 November 2018 : abstracts – Kharkiv, 2018. – P. 102. *Здобувачкою виконано спектральні та фотофізичні дослідження барвників.*

## ЗМІСТ

Список умовних позначень та скорочень.....	20
Вступ .....	21
РОЗДІЛ 1 Використання раціометричних методів на основі ферстерівського резонансного переносу енергії (FRET) у біологічних дослідженнях для визначення конформації протеїнів (огляд наукової літератури).....	26
1.1 Резонансний перенос енергії (FRET) між двома флуорофорами .....	26
1.2 Способи визначення FRET.....	27
1.3 Біологічне застосування FRET .....	29
Висновки до розділу 1 .....	34
РОЗДІЛ 2 Спектральні властивості барвників.....	36
2.1 Структура барвників.....	36
2.2 Спектрально-люмінесцентні властивості барвників у розчинах .....	39
2.2.1 Симетричні гідрофобні сквараїни .....	45
2.2.2 Симетричні гідрофобні норсквараїни .....	47
2.2.3 Симетричні гідрофільні сквараїни.....	48
2.2.4 Симетричні гідрофільні норсквараїни .....	49
2.2.5 Гідрофобні сквараїни з карбоксильною групою .....	50
2.2.6 Гідрофільні сквараїни з карбоксильними групами.....	52
2.2.7 Стириловий барвник .....	52
2.2.8 Ціаніни.....	54
Висновки до розділу 2 .....	54
РОЗДІЛ 3 Спектральні властивості барвників у комплексах з протеїнами ....	56
3.1 Кінетика комплексоутворення .....	57
3.2 Протеїнові комплекси сквараїнів у термодинамічно контрольованих умовах .....	60
3.3 Комплекси барвників з БСА.....	65
3.4 Спектральні властивості комплексів барвників з протеїнами .....	70
3.5 Вплив сечовини на спектральні властивості барвників .....	77
3.6 Вплив сечовини на спектральні властивості барвників у комплексах з протеїнами.....	81
3.6.1 Вплив сечовини на комплекси SqO3 з протеїнами.....	93
3.6.2 Вплив сечовини на комплекси SqCN3 з протеїнами .....	98
3.6.3 Вплив сечовини на комплекси Styryl з протеїнами .....	103
Висновки до розділу 3 .....	107

РОЗДІЛ 4 Використання донорно-акцепторних пар барвників для визначення конформаційних змін протеїнів.....	109
4.1 Донорно-акцепторні FRET пари барвників .....	109
4.2 Перенос енергії з некон'югованого донора на некон'югований акцептор.....	111
4.3 Вплив молярного співвідношення на перенос енергії між некон'югованими барвниками в БСА.....	115
4.4 FRET у системі SqO3-протеїн-SqCN3 .....	118
4.5 FRET в системі Styryl-протеїн-SqO3 .....	126
4.6 Вплив конформації на перенос енергії з БСА кон'югованого сквараїну SqO4 на некон'югований сквараїн SqCN3 .....	132
4.7 Вплив сечовини на перенос енергії з БСА кон'югованого сквараїну SqO4 на кон'югований сквараїн SqCN4 .....	136
4.8 Вплив сечовини на перенос енергії з БСА кон'югованого ціаніну Cy5 на кон'югований ціанін Cy5.5 .....	138
4.9 Вплив низькотемпературного збереження на перенос енергії між SqO3 та SqCN3 в альбумінах плазми крові людини.....	140
Висновки до розділу 4.....	143
РОЗДІЛ 5 Експериментальна частина .....	146
5.1 Реагенти та розчинники.....	146
5.2. Спектральні вимірювання.....	147
5.3 Комплекси барвників з протеїнами.....	148
5.4 Флуоресцентне титрування барвників розчином БСА .....	149
5.5 Кон'югати барвників з протеїном.....	149
5.6 Дослідження зразків плазми крові людини.....	150
5.7 Математична обробка результатів .....	151
5.8 Статистична обробка результатів .....	153
Висновки до розділу 5 .....	154
Висновки .....	155
Список використаних джерел.....	158

## Список умовних позначень та скорочень

$\lambda$	Довжина хвилі
$\varepsilon$	Коефіцієнт екстинкції
$\Phi_F$	Квантовий вихід флуоресценції
$\Delta\nu_{st}$	Стоксів зсув
$\Delta\lambda_{1/2}$	Півширина смуги
$I$	Інтенсивність флуоресценції
FRET	Ферстерівський резонансний перенос енергії
PB	10 мМ Фосфатний буфер (pH=7.4)
БСА	сироватковий альбумін бика — <i>Bovine serum albumin</i>
БСАж	сироватковий альбумін бика з жирними кислотами
САЛ	сироватковий альбумін людини — <i>Human serum albumin</i>
САЛж	сироватковий альбумін людини з жирними кислотами
ПХ	пероксидаза хрону — <i>Horseradish peroxidase</i>
D/P	<i>Dye-to-protein ratio</i> — середньостатистичне число молекул барвника, пов'язаних з однією молекулою протеїну
ДМФА	N,N-Диметилформамід
NHS	N-гідроксисукцинімідний естер

## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** За допомогою флуоресцентних методів конформацію протеїнів можливо дослідити методами власної флуоресценції (за зміною флуоресценції тирозину і/або триптофану), за зміною флуоресценції одного барвника (зонда), який не зв'язан з протеїном ковалентним зв'язком. Найбільш популярним інструментом медико-біологічних досліджень є Ферстерівський резонансний перенос енергії (FRET) [1], який зокрема використовують для вивчення конформацій протеїнів [2]. Для вимірювання відстаней за допомогою FRET використовують нечутливі до оточення флуоресцентні барвники (донор та акцептор), які ковалентно зв'язують з аналітом [3]. За цим способом експериментально отримують ефективність переносу енергії між барвниками, яку використовують для визначення відстані між сайтами до яких прив'язані донор та акцептор. Також ефективність переносу енергії, без визначення відстані, може використовуватися, як параметр, що відображає ступінь взаємодії між барвниками та змін у системі [4, 5, 6]. Але на практиці у біологічних дослідженнях частіше використовують раціометричний спосіб, за яким визначають співвідношення сигналу між донором та акцептором [7, 8]. Такий підхід не дозволяє вимірювати відстані, але дозволяє виявляти зміни в об'єктах, що досліджуються.

До недоліків методів можна віднести низьку чутливість власної флуоресценції протеїнів та методу флуоресцентних зондів. А для методу FRET маркування протеїнів донорними та акцепторними барвниками відбувається на специфічних ділянках протеїнів і часто є складним та вимагає певної розробки стратегії маркування для кожного типу протеїнів [9, 10]. Такий підхід обмежує використання методу FRET у гетерогенних біологічних системах та може призводити до зниження фактичної ефективності FRET, якщо більшість молекул буде промарковане лише донором.

Явище, на якому основана дія флуоресцентних зондів, а саме залежність спектральних характеристик та інтенсивності флуоресценції від оточення,

повинно приводити до додаткових змін в ефективності FRET. Таким чином, чутливість барвника-донора та/або барвника-акцептора до мікрооточення може покращити чутливість флуоресцентних біоаналітичних методів, які основані на вимірюванні ефективності FRET. Нещодавно були розроблені довгохвильові сквараїнові і норсквараїнові барвники з комплексом поліпшених характеристик, що може вирішити проблему недостатньої чутливості та достовірності флуоресцентних методів визначення. У той же час, донорно-акцепторні FRET пари, в яких обидва барвника були б чутливими до мікрооточення та не зв'язані між собою раніше не вивчалися, а донорно-акцепторні пари, в яких обидва барвники є сквараїнами, майже не відомі.

**Зв'язок з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційну роботу виконано в ДНУ "НТК "Інститут монокристалів" Національної академії наук України відповідно до тем відомчого замовлення НАН України *"Флуоресцентний резонансний перенос енергії між сквараїновими барвниками в модельних біологічних системах"* (2013 р., номер державної реєстрації 0113U003293) та *"Перенос енергії, гасіння та посилення флуоресценції в мультифлуорофорних системах"* (2016-2018 р.р., номер державної реєстрації 0116U001210) та міжнародного проекту УНТЦ *"Флуоресцентні зонди і мітчики для медико-біологічних застосувань"* (№ P548).

**Головна мета роботи** у встановленні закономірностей щодо зв'язку між структурою та спектрально-люмінесцентними і фотофізичними властивостями барвників для створення систем з раціометричним детектуванням для розробки нового, чутливого способу визначення конформаційних змін у протеїнах.

Для досягнення цієї мети необхідно було вирішити такі завдання:

- запропонувати новий флуоресцентний метод визначення конформаційних змін протеїнів;
- визначити алгоритм відбору барвників та дослідити вплив оточення на спектральні та фотофізичні властивості барвників;
- відібрати найбільш ефективні FRET-пари барвників на прикладі модельного протеїну БСА (бичачий сироватковий альбумін);

- на прикладі протеїнів, різних за фізико-хімічними властивостями, визначити придатність та обмеження застосування нового підходу;
- вивчити вплив способу з'єднання барвників з протеїном на чутливість раціометричного детектування та уявну ефективність переносу енергії між барвниками при визначенні конформаційних змін у протеїнах;
- дослідити можливість практичного застосування розробленого методу у системі гетерогенного протеїнового складу.

**Об'єкт дослідження:** вплив середовища та мікрооточення на спектральні властивості барвників; ферстерівський резонансний перенос енергії між барвниками у протеїнах, раціометричне визначення конформаційних змін у протеїнах.

**Предмет дослідження:** розчини флуоресцентних барвників у водних та органічних розчинниках, а також при ковалентному зв'язуванні та нековалентній взаємодії барвників з протеїнами.

**Методи дослідження:** електронна абсорбційна і флуоресцентна спектроскопія, рефрактометрія, гель-хроматографія.

**Наукова новизна.** У роботі вперше:

- з'ясовано вплив полярності середовища та наявності протеїнів на спектрально-люмінесцентні властивості ряду норскварінових і скварінових барвників;
- розроблено новий флуоресцентний підхід для визначення зміни конформації протеїнів із застосуванням раціометричного детектування та визначення ферстерівського резонансного переносу енергії між барвниками, чутливими до мікрооточення та незв'язаних з аналітом ковалентним зв'язком;
- оцінено чутливість методу виявлення конформаційних змін у протеїні, ініційованих розчинами сечовини різної концентрації (0—7 М);
- визначено залежність уявної ефективності переносу енергії в комплексах донорно-акцепторних пар барвників з протеїнами від структури та молекулярної маси протеїнів;

- продемонстровано можливість використання нового підходу у системі гетерогенного протеїнового складу (плазма крові людини) для визначення змін, що викликані заморожуванням та довгостроковим низькотемпературним зберіганням.

**Практичне значення отриманих результатів** полягає у дослідженні комплексів [барвник–донор]–[протеїн]–[барвник–акцептор] та змін ефективності переносу енергії між барвниками при зміні конформації протеїну, що дозволило розробити новий підхід, заснований флуоресцентному визначенні конформаційних змін в протеїнах. Показано можливість використання нових флуоресцентних матеріалів (раціометричних систем та донорно-акцепторних пар барвників) для визначення змін плазми крові людини, викликаних дією низьких температур. Новий підхід є перспективним флуоресцентним засобом для медицини та біології.

**Особистий внесок** автора полягає у систематизації даних літератури за темою дисертації, виконанні всіх спектральних досліджень, а саме, вимірюванні електронних спектрів поглинання і флуоресценції, визначенні квантових виходів та коефіцієнтів екстинкції, математичний аналіз та обробка одержаних результатів. Постановка завдань, обговорення результатів досліджень та формулювання висновків проведені спільно з науковим керівником – к.х.н., ст.досл. А.Л.Татарцем.

Автор виражає подяку співробітникам ДНУ "НТК "Інститут монокристалів" НАН України к.х.н., н.с. Колосової О. С., м.н.с. Обухової О. М. та к.х.н., с.н.с. Федюняєвої І. А. за синтез барвників. Співробітниці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України к.б.н., н.с. Фалько О. В. за надані зразки плазми крові людини.

**Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень доповідалися на XIV Kharkiv young scientists conference on Radiophysics, Electronics, Photonics and Biophysics (Харків, 2014), на 39-й щорічній конференції молодих вчених «Холод в біології та медицині. Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології » (Харків, 2015), 14-й, 15-й Міжнародних конференціях "Methods and Applications of Fluorescence" (Вюрцбург, Німеччина, 2015; Брюгге,



Бельгія, 2017), 5-й Міжнародній конференції "Актуальні проблеми молекулярної спектроскопії конденсованих середовищ" (Самарканд, Узбекистан 2016), X Всеукраїнській науковій конференції студентів та аспірантів "Хімічні Каразінські читання – 2018" (Харків, 2018), XIII Всеукраїнській конференції молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії. (Харків, 2018), 8<sup>th</sup> International Conference "Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles" in memoriam of Prof. Valeriy Orlov (CNCH-2018) (Kharkiv, 2018).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 14 публікацій, з яких 6 статей (3 – у фахових виданнях України, 3 – у зарубіжних періодичних виданнях інших держав, що входять до міжнародної наукометричної бази Scopus) та 8 тез доповідей у збірках матеріалів міжнародних, українських та регіональних конференцій.

**Структура роботи.** Дисертація викладена на 184 сторінці та складається зі вступу, п'яти розділів, висновків, переліку використаних джерел (209 найменувань); містить 3 схеми, 81 рисунки та 6 таблиць. Обсяг основного тексту дисертації складає 130 сторінок.

# РОЗДІЛ 1

## ВИКОРИСТАННЯ РАЦІОМЕТРИЧНИХ МЕТОДІВ НА ОСНОВІ ФЕРСТЕРІВСЬКОГО РЕЗОНАНСНОГО ПЕРЕНОСУ ЕНЕРГІЇ (FRET) У БІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНФОРМАЦІЇ ПРОТЕЇНІВ (ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ)

### 1.1 Резонансний перенос енергії (FRET) між двома флуорофорами

Механізм резонансного переносу енергії флуоресценції (FRET) включає в себе донор у збудженому електронному стані, який може передавати свою енергію збудження сусідньому акцептору через диполь-дипольні взаємодії. В результаті переносу енергії донор переходить в стан з меншою енергією, а акцептор – в стан з більшою енергією та набуває здатності випромінювати фотон. Взаємодія відбувається без проміжного випускання фотонів та не пов'язана з реабсорбцією флуоресценції, випромінюваної донором, яка потім поглинається акцептором.

Ефективність переносу енергії FRET ( $E_{\text{FRET}}$ ) обернено пропорційна відстані між донором та акцептором у шостому ступені [11]:

$$E_{\text{FRET}} = 1/[1+(R/R_0)^6] \quad (1.1)$$

де,  $E_{\text{FRET}}$  – ефективність переносу енергії,  $R$  – відстань між флуорофорами та  $R_0$  – відстань при якій відбувається 50% переносу енергії між випадково орієнтованими донором і акцептором та дорівнює

$$R_0 = 0.211(k^2 n^{-4} \Phi_{FD} J(\lambda))^{1/6}, \quad (1.2)$$

де  $k^2$  – коефіцієнт орієнтації між молекулами донора і акцептора, що у загальному випадку дорівнює  $2/3$ ,  $n$  – показник заломлення середовища,  $\Phi_{FD}$  – квантовий вихід флуоресценції донору,  $J(\lambda)$  – інтеграл спектрального перекривання спектру флуоресценції донора та поглинання акцептора.

Інтеграл перекривання розраховується як [11]:

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda, \quad (1.3)$$

де  $\lambda$  — довжина хвилі,  $F_D(\lambda)$  — спектр флуоресценції донору,  $\varepsilon_A(\lambda)$  — спектр поглинання акцептору.

Ефективність переносу енергії дуже чутлива до зміни відстані в діапазоні 1–10 нм, що дозволяє за допомогою FRET досліджувати зміни відстаней у нанорозмірному масштабі у біологічних системах.

## 1.2 Способи визначення FRET

В якості донорів і акцепторів в FRET-парах широко використовують органічні барвники, що випромінюють в ультрафіолетовій (UV), видимій (Vis) та інфрачервоній (IR) частинах спектру. До загальних вимог спектральних властивостей барвників при використанні їх в якості пари відносять:

- значне перекриття спектру флуоресценції донора зі спектром поглинання акцептора
- розділення спектрів поглинання барвників, які використовуються у FRET-парі, що забезпечує селективність збудження донора
- максимально можливе розділення спектрів флуоресценції донора і акцептора для більш точного виміру FRET [12].

У загальному випадку ефективність переносу енергії ( $E_{\text{FRET}}$ ) визначають за зміною флуоресценції донора у присутності ( $F_{\text{DA}}$ ) та відсутності ( $F_{\text{D}}$ ) акцептора [11]:

$$E_{\text{FRET}} = 1 - (F_{\text{DA}}/F_{\text{D}}) \quad (1.4)$$

Через експериментальне визначення визначення ефективності переносу енергії можна точно розрахувати відстань між двома флуорофорами, однак при цьому зміни флуоресценції акцептора не приймають до уваги. Проте, при використанні приладів з різними каналами реєстрації сигналу, необхідно

визначати внесок флуоресценції акцептора в каналі донора. Це призводить до математичного ускладнення формули, для врахування геометрії приладу і використовуваних фільтрів [13]. Такі математичні корективи можуть призвести до експериментальних помилок, які важко контролювати. Тому, на практиці, частіше  $E_{\text{FRET}}$  використовують як показник відносних змін в системі, без визначення відстаней [14, 15]. Ми застосовуємо барвники, що чутливі до змін середовища, тому ефективність переносу є уявною, оскільки залежить як від відстані між барвниками, так і від властивостей барвників у певному середовищі.

Для врахування змін флуоресценції обох флуорофорів застосовують раціометричний параметр, "FRET ratio" (співвідношення FRET), що використовує два ефекти FRET – збільшення флуоресценції акцептора та зменшення флуоресценції донора [16]:

$$\text{FRET ratio} = (F_A - \alpha \times F_D) / F_D \quad (1.5)$$

де  $F_D$  – інтенсивність флуоресценції донора в присутності акцептора,  $F_A$  – інтенсивність флуоресценції акцептора в присутності донора,  $\alpha$  – коефіцієнт,  $\alpha = F_{D\lambda_{\text{max}A}} / F_{D\lambda_{\text{max}}}$  ( $F_{D\lambda_{\text{max}A}}$  – інтенсивність флуоресценції донора без акцептора на довжині хвилі максимуму випромінювання акцептора,  $F_{D\lambda_{\text{max}}}$  – інтенсивність флуоресценції донора без акцептора в максимумі), враховує вклад донору в інтенсивність флуоресценції акцептора за присутності обох барвників у розчині.

За цим методом неможливо визначити відстань між флуорофорами, однак цей метод досі простий у вимірюванні та не залежить від використовуваних приладів, оскільки є безрозмірною величиною [17]. Метод не потребує часу на фотознебарвлення акцептора або донора, що дозволяє відстежувати швидкі молекулярні події [18]. Однак важливо зазначити, що FRET ratio є нелінійним щодо змін ефективності FRET [19]; отже, такі раціометричні дані корисні для спостереження за відносними змінами в межах однієї системи.

### 1.3 Біологічне застосування FRET

Для дослідження біологічних систем барвник-донор і барвник-акцептор зв'язують з однією біологічною молекулою або двома, що взаємодіють (антитіло і антиген, рецептор і ліганд, компліментарні пари олігонуклеотидів, тощо). Зміни в ефективності переносу енергії з барвника-донора на барвник-акцептор дозволяють відслідковувати та досліджувати зміни відстані в біологічних молекулах та мікросистемах, що викликані внутрішніми та зовнішніми факторами, такими як захворювання, лікарські препарати, температура, кислотність або осмос [11, 20]. Зміни в ефективності FRET використовуються для вимірювання відстані і виявлення молекулярних взаємодій [21, 22, 23], у тому числі, для ідентифікації фактів взаємодії антитіла з антигеном при флуоресцентному імуноаналізі [24], компліментарних пар олігонуклеотидів при гібридизаційному аналізі ДНК [11], взаємодії рецепторів з лігандами [25], для вивчення ліпідних шарів в клітинних мембранах [26], для дослідження процесів у живих клітинах *in-vivo*, визначення місця розташування і взаємодії генів і клітинних структур [27, 28], вимірювання відстаней між доменами протеїнів для отримання інформації про їх конформацію та взаємодію між протеїнами [29, 30, 31].

Біологічні функції протеїнів залежать від їх тривимірної структури, яка визначається амінокислотою послідовністю в процесі згортання макромолекули. Підвищення температури, наявність іонів металів, зміни рН та іонної сили середовища – лише деякі приклади факторів, які можуть значно вплинути на конформаційну стабільність протеїнів та призвести до їх неправильного складання або денатурації. Протеїни, які зазнали конформаційних змін мають схильність до утворення агрегатів та втрачають свої природні функції, що в організмі людини призводить до, так званих, конформаційних захворювань. До групи цих захворювань належать хвороба Альцгеймера, гемолітична анемія, аміотрофічний бічний склероз, хвороба Паркінсона, діабет II типу та інші [32]. Таким чином, вивчення конформаційних

змін протеїнів допомагає виявленню можливих шляхів діагностики та лікування або попередження конформаційних захворювань.

До експериментальних методів вивчення третинної структури і конформації протеїнів належать ЯМР спектроскопія [33, 34, 35], диференційна калориметрія [36, 37], рентгеноструктурний аналіз [38, 39], а також флуоресцентні методи. Серед зазначених методів, лише флуоресцентні методи дозволяють вивчати зміни конформації протеїнів в динаміці та безпосередньо у клітинах. У флуоресцентних методах використовують дослідження власної флуоресценції протеїнів, органічного флуоресцентного барвника (метод флуоресцентного зонду) та метод FRET.

За методом вивчення власної флуоресценції протеїнів реєстрація конформаційних змін відбувається за зміною інтенсивності флуоресценції "внутрішніх" флуорофорів (тирозину чи/або триптофану) [40, 41, 42]. Основою цього методу є зниження флуоресценції амінокислотних залишків при збільшені полярності їх оточення, що трапляється внаслідок розгортання третинної структури протеїну. Метод має низьку чутливість та не дозволяє виявити малі конформаційні зміни.

Використання органічних барвників, дозволяє значно підвищити чутливість флуоресцентних методів. У методі флуоресцентного зонду використовують один синтетичний барвник (зонд), який не зв'язаний з протеїном ковалентним зв'язком, тобто знаходиться в комплексі з протеїном. Зв'язок з аналітом здійснюється через електростатичні [43], водневі зв'язки [44] та гідрофобні [45] взаємодії у неполярних ділянках протеїну, так званих "гідрофобних кишнях" [46], що супроводжується зміною спектрально-люмінесцентних властивостей барвників. Барвник, зазвичай, не впливає на активність протеїну, проте, його флуоресцентні властивості залежать від структурного стану протеїну. Денатурацію, або розгортання третинної структури протеїну, вивчають за допомогою барвників чутливих до полярності середовища, таких як, 1-аніліно-8-нафтален сульфонат (1,8-ANS) [47, 48, 49], SYPRO ORANGE [50, 51] та 6-*n*-толуїдино-2-нафталенсульфонова кислота (TNS) [52, 53]. Для виявлення агрегатів протеїнів використовують барвники

чутливі до в'язкості середовища, такі як, тіофлавин Т [54, 55] та протеостат (ProteoStat) [56, 57]. До загальних недоліків методу зонду можна віднести можливі стеричні проблеми, через що, не відбувається утворення комплексу, а також, залежність флуоресценції зонду від фізико-хімічних властивостей протеїну та експериментальних умов.

Для реалізації методу FRET необхідні два флуорофори, які утворюють донорно–акцепторну пару. При цьому в протеїнах донором може виступати їх природній флуорофор – триптофан, а в якості акцептору органічний барвник, який ковалентно прив'язують до протеїну. За таким підходом були вивчені проміжні ланки в згортанні стафілококової нуклеази [58], барстару (протеїн, що синтезується бактерією *Bacillus amyloliquefaciens*) [59], вивчалися конформаційні переходи тропіну під впливом  $\text{Ca}^{2+}$  [60], у роботі [61] вивчали зміни конформації САЛ (сироватковий альбумін людини) при взаємодії з пальмітиною кислотою. Такий підхід також використовувався при нековалентному зв'язуванні акцептору з протеїном. Так у роботі [62] вивчали місцезнаходження центрів зв'язування БСА за допомогою переносу енергії з триптофану на 1,8-ANS. Недоліком цього підходу є необхідність збудження флуоресценції у досить короткохвильовій області спектру (~280 нм), що небажано при дослідженні біологічних молекул, оскільки значне власне поглинання біологічних молекул буде заважати дослідженню цільового протеїну. Крім того, опромінення жорстким УФ світлом може призводити до руйнування барвника та протеїну. У флуоресцентних протеїнах окрім тирозину та триптофану є інші внутрішні флуорофори, які здатні поглинати та випромінювати у більш довгохвильових частинах спектру та можуть використовуватись в якості донору. Такий підхід було реалізовано у роботі [63], де вивчали конформаційні зміни протеїну Цитрину (Citrine) з родини жовтих флуоресцентних протеїнів. Перенос енергії спостерігали з внутрішнього флуорофору Цитрину на барвник Alexa 647, ковалентно прив'язаний на поверхні протеїну. Однак, такий спосіб визначення конформаційних змін протеїнів обмежується лише класом флуоресцентних протеїнів.

Застосування двох флуоресцентних барвників засновано на переносі енергії між барвниками та відбувається за двома способами, які залежать від властивостей барвників. Барвники не чутливі до оточення (мітчики) використовують в якості FRET пар, а зонди зв'язані між собою використовують в якості FRET сенсорів.

Для визначення відстані використовують мітчики – донор та акцептор, які ковалентно зв'язують з певними ділянками протеїну. За таким підходом експериментально визначають  $E_{\text{FRET}}$  (формула 1.4), яку використовують для визначення відстані між барвниками (формула 1.2). Для реалізації цього методу FRET використовують сполуки, що мають можливість хімічної модифікації для введення до їх структури N—гідроксисукцинімідного (NHS) естера, малеїміда або гідразида для забезпечення подальшого утворення кон'югатів з біооб'єктами. Для вивчення конформації протеїнів за допомогою FRET використовують два способи. За одним підходом, барвники спочатку зв'язують з синтетичними амінокислотами, а потім вбудовують їх у необхідні місця протеїнів [64, 65, 66]. Більш застосовувана стратегія маркування заснована на підготовці мутантних протеїнів, в яких два вибрані залишки замінюються цистеїнами (маркування мутацій) [67, 68]. Потім ці залишки цистеїну хімічно модифікуються флуоресцентними тіол-реакційними барвниками. Так, у роботі [69] використовували Texas Red та тетраметилродамін (TMR) для вивчення конформаційної динаміки T4 лізоциму під час ферментативної реакції, а у роботах [70, 71] за допомогою пари тетраметилродамін-Cy5 вивчали конформаційні зміни інгібітора хімотрипсину 2 під впливом гуанідин хлориду. Найчастіше для реєстрації конформації протеїнів в якості донору використовують барвник Alexa 488, який має високий квантовий вихід, є фото стабільним та сумісний з лазером 488 нм. Цей барвник відноситься до класу ксантенових барвників та в якості акцептора до нього найчастіше виступає також ксантеновий барвник Alexa 594 [72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79].

Барвники класу ціанінів, які широко використовуються у різних біологічних дослідженнях, хоча і перекривають широкий спектральний діапазон та відповідають необхідним вимогам для реалізації процесу переносу енергії, не



мають великого розповсюдження при вивченні конформацій протеїнів. Найчастіше для дослідження третинної структури протеїнів застосовують пару ціанінових барвників Су3-Су5 [80, 81, 82, 83], а ціаніновий барвник Alexa 647 може використовуватись в якості акцептору, з ксантеновими барвниками Alexa 488 [84, 85, 86] та Alexa 546 [87, 88].

Використання донорно-акцепторної пари сквараїнових барвників для визначення відстані не відоме. Але відомі сенсори в яких сквараїновий барвник є акцептором [89, 90]. Використання сенсорів не дозволяє визначати певні відстані, а як параметр взаємодії барвників з біооб'єктами використовують раціометричний параметр FRET ratio [91, 122]. Для його визначення використовують співвідношення двох інтенсивностей флуоресценції: на хвилі випромінювання донора та на хвилі випромінювання акцептора [92, 93]. Раціометричний параметр FRET ratio надає інформацію про відносні зміни в межах однієї системи, такі, як наприклад, збільшення концентрації іонів металів [94, 95, 96], зміна рН [97], зміна мембранного потенціалу [98], дії сигнальних молекул [99, 92]. Використання сенсорів для визначення зміни конформації одного протеїну не відоме.

Таким чином, застосування двох барвників в якості FRET-пари вимагає розробки певної стратегії для селективного зв'язування барвників з необхідними сайтами протеїну [100], або зв'язування донора та акцептора [101]. Окрім того, при наявності декількох потенційних сайтів зв'язування барвника з протеїном, може знадобитися специфічне модифікування протеїну, щоб блокувати небажані сайти [102]. Для тіолспецифічної хімічної модифікації необхідна заміна цистеїном однієї з амінокислот у місці маркування. Ця хімічна модифікація не завжди призводить до бажаних реакцій, крім того заміщення на цистеїн може впливати на структуру та функціонування протеїну.

Також недоліком існуючих донорно-акцепторних FRET пар є недостатній квантовий вихід флуоресценції донору і коефіцієнт екстинкції акцептору, що, як правило, не дозволяє проводити вимірювання на відстанях, більш ніж 80 Å [103, 104, 24, 105]. Ще одним недоліком є недостатня фотохімічна стабільність барвників, у тому числі ціанінів, що призводить до руйнування барвників у

процесі вимірювань і, як наслідок, погіршення достовірності результатів медико-біологічних аналізів [106, 107].

Недоліки існуючих методів обумовлюють необхідність створення нових флуоресцентних методів для визначення конформації протеїнів, простіших та не потребуючих хімічної модифікації протеїнів. На підставі аналізу літературних даних можна припустити, що поєднання двох відомих флуоресцентних методів, методу зондів та методу FRET, а саме використання двох чутливих до мікрооточення флуоресцентних барвників-зондів у донорно-акцепторних парах дозволить покращити чутливість флуоресцентних біоаналітичних методів, а саме визначення змін конформації протеїнів. У той же час донорно-акцепторні FRET пари, в яких обидва барвника були б чутливими до мікрооточення та незв'язані між собою, раніше не застосовувалися для моніторингу конформації протеїнів. Такий спосіб не потребує хімічної модифікації барвників чи протеїнів, що значно спрощує проведення аналізу. Оскільки комплексоутворення є статистичним процесом та відбувається у гідрофобних кишнях протеїнів, запропонований підхід не дозволяє вимірювання відстані між певними частинами молекули, проте надає інформацію про загальний стан системи. Цей підхід є доречним при дослідіах гетерогенних за складом протеїнових розчинів (ізолятів протеїнів рослин, плазми крові, спинномозкова рідина та інші), тому що дозволяє виявляти зміни в системі одночасно по декількох протеїнах з різними властивостями.

## **Висновки до розділу 1**

1. Серед флуоресцентних методів визначення зміни конформації протеїну найменшу чутливість мають методи власної флуоресценції протеїнів та флуоресцентного зонду із використанням одного флуоресцентного барвника, який чутливий до мікрооточення. найбільш ефективним є метод FRET двома нечутливими до мікрооточення барвниками, що зв'язані з протеїном ковалентно. Але він має низку недоліків, зокрема, необхідність додаткової, досить складної, синтетичної підготовки зразків.

2. Для визначення відстаней між барвниками, що зв'язані з певними сайтами протеїну експериментально визначають  $E_{\text{FRET}}$ , однак цей параметр може використовуватися и без визначення відстані, як параметр, що відображає ступінь взаємодії між барвниками та змін у системі. У біологічних дослідженнях також використовують раціометричний спосіб, за яким визначають співвідношення між донором та акцептором. Такий підхід не дозволяє вимірювати відстані, але дозволяє виявляти зміни в об'єктах, що досліджуються.

3. Донорно-акцепторні FRET пари, в яких обидва барвника були б чутливими до мікрооточення та не зв'язані між собою раніше не вивчалися та не використовувалися для визначення конформації протеїнів, а донорно-акцепторні пари, в яких обидва барвники є сквараїнами, майже не відомі.

## РОЗДІЛ 2 СПЕКТРАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ БАРВНИКІВ

Для визначення придатності використання барвників у FRET парі ми розробили схему відбору барвників (рис. 2.1), яка включає оцінку розчинності та схильності до агрегації, спектральних та фотофізичних властивостей барвника у водному фосфатному буфері з pH 7.4 (PB) (полярному розчиннику) та хлороформі (неполярному розчиннику).

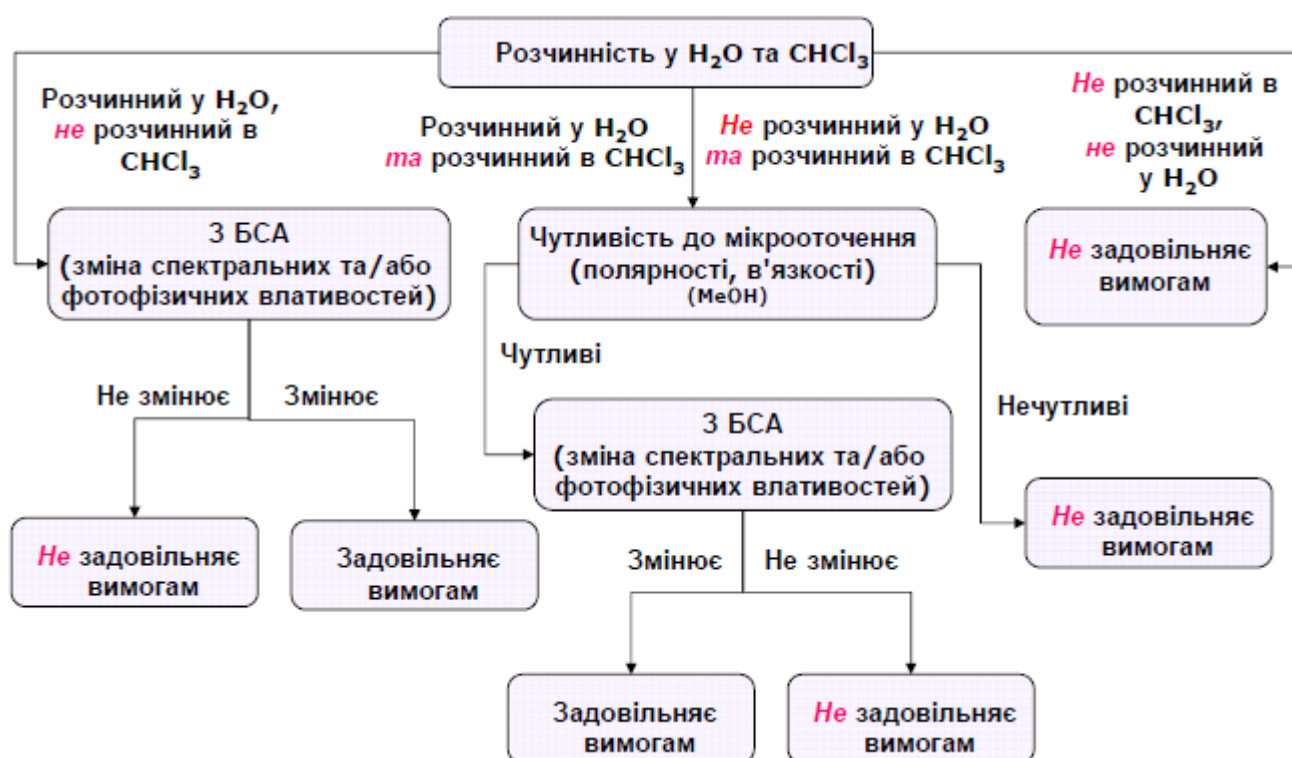


Рисунок 2.1 Схема відбору барвників

У випадку, коли барвник розчинний лише в одному з розчинників, додатково визначали чутливість спектральних властивостей барвника до мікрооточення. Далі досліджували розчини барвників у присутності бичачого сироваткового альбуміну (БСА) як модельного протеїну. Тільки барвники, які утворюють комплекси, тобто демонструють зміни спектральних характеристик при взаємодії з протеїном, придатні для подальшого дослідження.

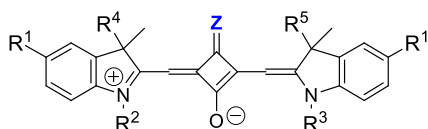
### 2.1 Структура барвників

Пошук барвників здійснювався серед класів скварайнових, норскварайнових та стирилових барвників. Ці барвники були обрані з огляду на

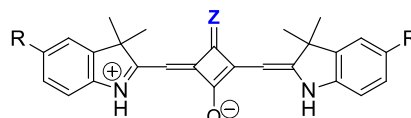
те, що деякі з них вже були запропоновані у літературі для визначення концентрації або наявності протеїнів у розчинах, але інформації про їх взаємодію з протеїнами було недостатньо для використання у запропонованому методі.

Розробку та синтез усіх досліджених сполук було проведено у відділі люмінесцентних матеріалів та барвників ім. Б.М. Красовицького ДНУ "НТК "Інститут монокристалів" НАН України.

Скварайнові та норскварайнові барвники, містять циклобутеновий фрагмент (похідні квадратної кислоти) в поліметиновому ланцюзі та термінальні гетероциклічні фрагменти (схема 2.1).



**SqO1, SqB1, SqCN1:** R<sup>1</sup> = H; R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> = CH<sub>3</sub>; R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> = CH<sub>3</sub>;  
**SqO2, SqB2, SqCN2:** R<sup>1</sup> = SO<sub>3</sub>H; R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> = (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>COOH; R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> = CH<sub>3</sub>;  
**SqO3, SqCN3:** R<sup>1</sup> = H; R<sup>2</sup> = (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>COOH; R<sup>3</sup> = CH<sub>3</sub>; R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> = CH<sub>3</sub>;  
**SqO4:** R<sup>1</sup> = SO<sub>3</sub>H; R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> = (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H; R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> = (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>COOH;  
**SqCN4:** R<sup>1</sup> = SO<sub>3</sub>H; R<sup>2</sup> = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; R<sup>3</sup> = (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H; R<sup>4</sup> = CH<sub>3</sub>; R<sup>5</sup> = (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>COOH;



**nor-SqO1, nor-SqCN1:** R = H;  
**nor-SqO2, nor-SqB2, nor-SqCN2:** R = SO<sub>3</sub>H

**SqO1, SqO2, SqO3, SqO4, nor-SqO1, nor-SqO2:** Z = O  
**SqB1, SqB2, nor-SqB2:** Z = barbituric  
**SqCN1, SqCN2, SqCN3, SqCN4, nor-SqCN1, nor-SqCN2:** Z = C(CN)<sub>2</sub>

Схема 2.1 – Структура скварайнових та норскварайнових барвників

Сполуки **SqO1**, **SqB1** та **SqCN1** є симетричними гідрофобними скварайнами, в яких атоми азоту та атоми вуглецю в третьому положенні індоленінового циклу заміщені метильними групами, а в сквартаному циклі містяться, відповідно, атом кисню (**SqO1**), залишки барбітурової кислоти (**SqB1**) або малонодинітрилу (**SqCN1**). Скварайни **SqO2**, **SqB2** та **SqCN2** також мають симетричну будову, але атом азоту в гетероциклічних фрагментах заміщений карбоксипентильною групою. Завдяки наявності двох сульфогруп в положенні п'ять індоленінових циклів, барвники набувають гідрофільних властивостей. Барвник **SqO4** має дві карбоксипентильні групи у третьому положенні індоленінового циклу, а наявність чотирьох сульфогруп робить барвник найбільш гідрофільним серед симетричних скварайнів.

Сполуки **SqO3**, **SqCN3** та **SqCN4** мають несиметричну будову з різною комбінацією вищезгаданих замісників (схема 2.1).

Сквараїни, які містять фрагменти незаміщених за атомом азоту індоленінових циклів, мають здатність до оборотного депротонування в лужному середовищі (схема 2.2) та відносяться до норсквараїнів (**nor-SqO1**, **nor-SqO2**, **nor-SqB2**, **nor-SqCN1** та **nor-SqCN2**) [108].

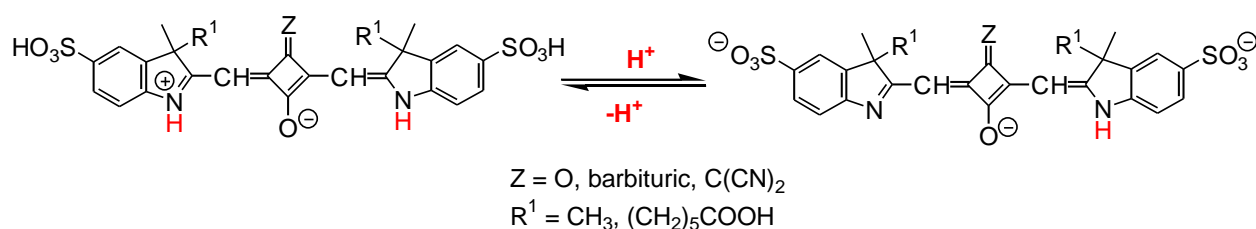
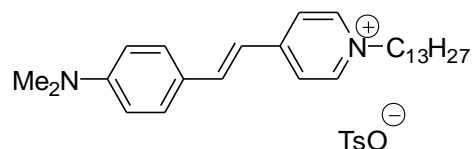


Схема 2.2 – Реакція оборотного депротонування норсквараїнових барвників

Серед стирилових барвників ми обрали (тозилат 4-(4-диметиламінофеніл)-1-етеніл)-1-тридецилпіридинію) (**Styryl**) з довгим алкільним (тридецильним) замісником, завдяки якому він легко вбудовується в гідрофобні ділянки альбуміну людини, через що чутливий до його конформаційних змін [109].



Комерційно доступні ціанінові барвники **Cy5** та **Cy5.5**, які використовують у медико-біологічних дослідженнях в якості FRET пари, були синтезовані за методиками [110, 111] та використовувалися для порівняння одержаних результатів.

Структури усіх барвників, властивості яких було досліджено у роботі наведено на схемі 2.3.

Ми дослідили спектрально-люмінесцентні та фотофізичні властивості барвників (схема 2.3) в хлороформі, метанолі та 10 мМ фосфатному буфері з рН 7.4 (PB). Основна увага приділялася визначенню чутливості барвників до полярності середовища, положення максимумів ( $\lambda_{\text{макс.}}$ ) поглинання (Погл.) і флуоресценції (Фл.), коефіцієнтам екстинкції ( $\epsilon$ ) та квантовим виходам

флуоресценції ( $\Phi_F$ ), які мають значний вплив на ефективність переносу енергії між двома барвниками.

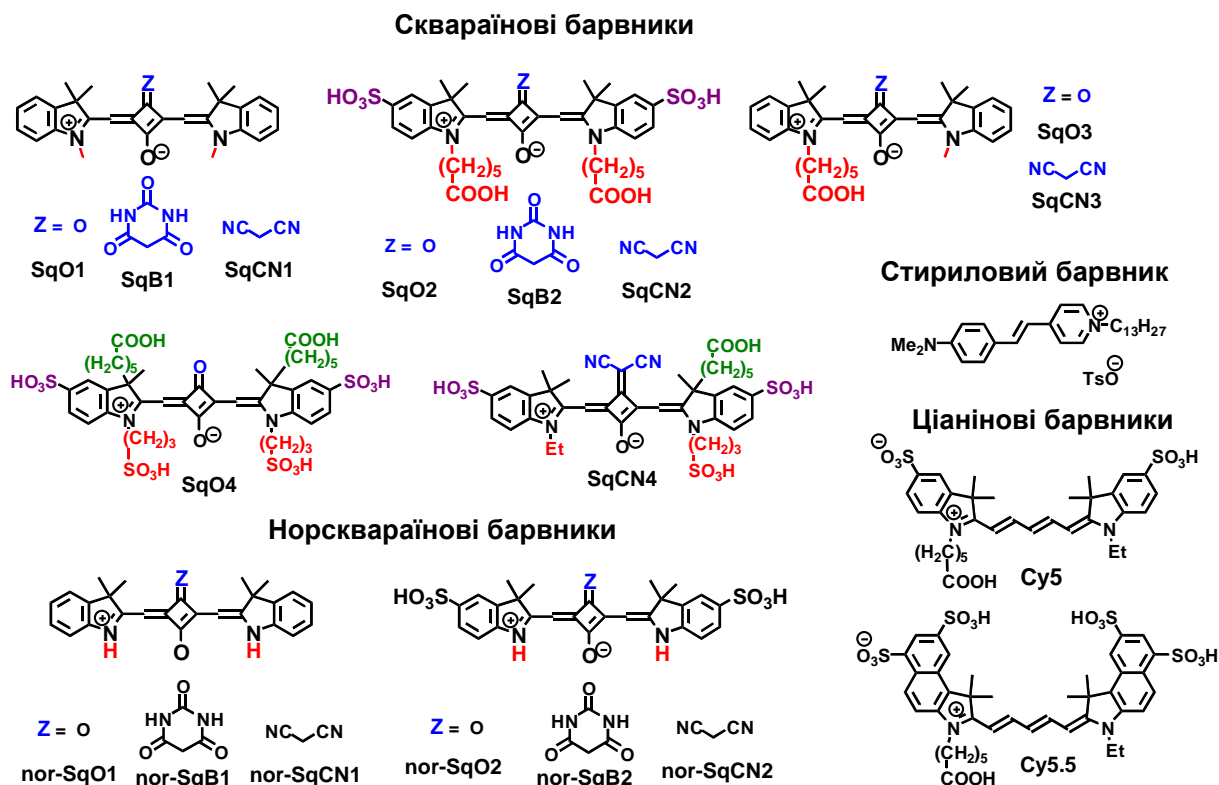


Схема 2.3 – Структури барвників, що досліджено

## 2.2 Спектрально-люмінесцентні властивості барвників у розчинах

В цьому розділі ми дослідили спектрально-люмінесцентні властивості скварайнів (**SqO1 – SqO4, SqB1, SqB2, SqCN1 – SqCN3**), норскварайнів (**nor-SqO1, nor-SqO2, nor-SqB2, nor-SqCN1, nor-SqCN2**), стирилу (**Styryl**) та ціанінів (**Cy5, Cy5.5**) у розчинах.

У мономерній формі смуги поглинання і флуоресценції скварайнів мають яскраво виражене плече (рис. 2.2 (а)), яке пов'язане з коливальними переходами при збудженні та випромінюванні [112, 110]. Таке плече є характерним для спектральних смуг всіх скварайнових барвників [113, 110].

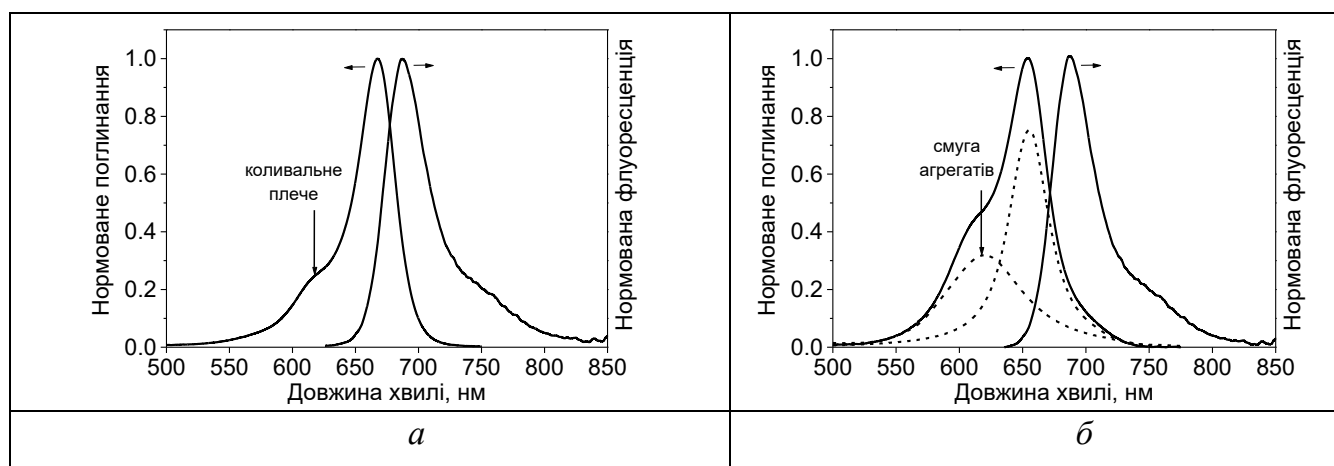


Рисунок 2.2 Приклади спектрів поглинання і флуоресценції мономерного (а) та агрегованого сквараїна (б)

Відомо, що сквараїни схильні до агрегації [114, 115], яка значно ускладнює проведення досліджень. Агрегати мають смугу поглинання приблизно у тій же самій спектральній області, що і коливальна смуга (плече) у спектрі поглинання вільного (неагрегованого) барвника (рис. 2.2 (а, б)), але агрегати не мають флуоресценції, яку можливо було б виміряти або зареєструвати [116, 117]. Оскільки випромінюють лише неагреговані молекули барвника, агрегація не впливає на форму спектру флуоресценції та змінює лише форму спектру поглинання, що призводить до порушення дзеркальної симетрії між смугами поглинання та флуоресценції (рис.2.2 (б)). З іншого боку, у водних середовищах, гасіння флуоресценції сквараїнів може бути пов'язано зі значними безрадіаційними втратами енергії електронного збудження, в наслідок переорієнтації полярних молекул барвника у збудженому стані [118].

Як розчинники для визначення спектральних та фотофізичних характеристик барвників нами обрано водний фосфатний буфер (10 мМ) з рН 7.4, хлороформ та метанол. Застосування фосфатного буфера як розчинника пов'язано з тим, що він щонайкраще моделює фізіологічні умови в біологічних системах і тому є найбільш поширеним та загально прийнятим середовищем для подібних досліджень [119, 120]. Хлороформ, у протилежність до фосфатного буфера, є надзвичайно гідрофобним розчинником. Беручи до уваги те, що біологічні макромолекули, такі як протеїни, антитіла і ліпіди, та біологічні мікросистеми, такі як клітини, є більш гідрофобними у порівнянні з водним

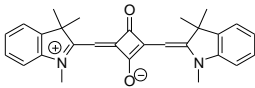
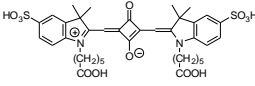
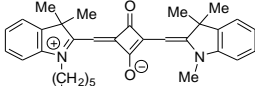


фосфатним буфером, вимірювання у хлороформі дозволяють прогнозувати зміни в спектрально-люмінесцентних та фотофізичних властивостях барвників, що відбуватимуться у зазначених біологічних системах. Метанол, який за нормованим емпіричним параметром полярності розчинника  $E_T^N=0.762$ , знаходиться між водою ( $E_T^N=1.000$ ) та хлороформом ( $E_T^N=0.259$ ), був обраний для перевірки чутливості барвників до полярності середовища [121].

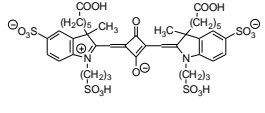
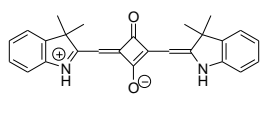
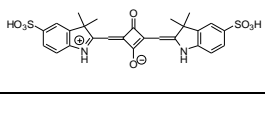
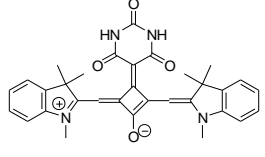
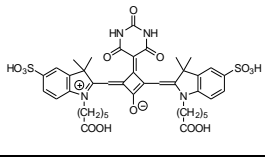
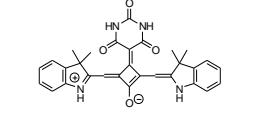
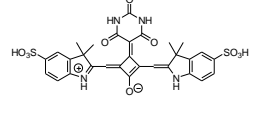
Одержані спектральні та фотофізичні дані, що виміряні у 10 мМ фосфатному буфері рН 7.4 (РВ), хлороформі та метанолі при концентрації барвника 1 мкМ, наведено у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

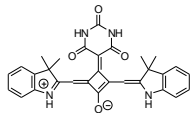
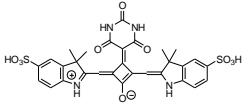
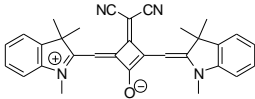
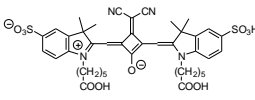
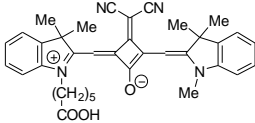
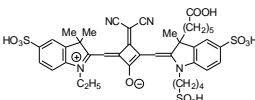
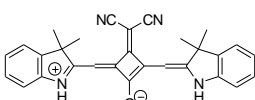
**Спектральні та фотофізичні характеристики досліджуваних барвників у хлороформі та РВ ( $c_{\text{барвника}}=1$  мкМ)**

Барвник	Розчинник	$\lambda_{\text{макс.}}$ (Погл.), нм	$\Delta\nu_{1/2}$ (Погл.), см <sup>-1</sup>	$\epsilon$ , М <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup>	$\lambda_{\text{макс.}}$ (Фл.), нм	$\Delta\nu_{1/2}$ (Фл.), см <sup>-1</sup>	$\Phi_F$ , %	$\Delta\nu_{\text{st}}$ , см <sup>-1</sup>
<b>SqO1</b> 	РВ – ДМСО (5:1)	624	750	92000	635	740	3	280
	CHCl <sub>3</sub>	633	690	219000	642	690	25	220
	MeOH	625	640	н/в*	635	690	4	250
<b>SqO2</b> 	РВ	632	680	265000	642	700	7	250
	MeOH	637	620	н/в	646	640	18	220
<b>SqO3</b> 	РВ	622	760	285000	632	760	1.9	250
	CHCl <sub>3</sub>	634	600	312000	644	650	25	250
	MeOH	627	640	н/в	636	660	6	230

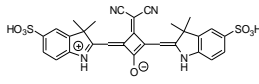
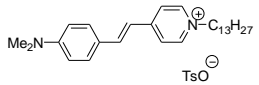
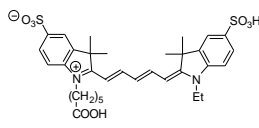
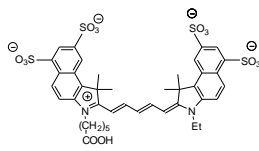
Продовження таблиці 2.1

Барвник	Розчинник	$\lambda_{\text{макс.}}$ (Погл.), нм	$\Delta\nu_{1/2}$ (Погл.), $\text{см}^{-1}$	$\varepsilon$ , $\text{М}^{-1}\text{см}^{-1}$	$\lambda_{\text{макс.}}$ (Фл.), нм	$\Delta\nu_{1/2}$ (Фл.), $\text{см}^{-1}$	$\Phi_F$ , %	$\Delta\nu_{\text{st}}$ , $\text{см}^{-1}$
<b>SqO4</b> 	PB	635	650	300000	645	670	12	250
	MeOH	640	590	н/в	649	640	40	220
<b>nor-SqO1</b> 	PB – ДМСО (5:1)	639	960	92000	659	850	13	470
	CHCl <sub>3</sub>	654	780	218000	669	780	45	340
	MeOH	647	830	200000	662	800	44	350
<b>nor-SqO2</b> 	PB	636	870	149000	653	820	32	410
	MeOH	650	840	н/в	667	760	41	390
<b>SqB1</b> 	PB – ДМСО (5:1)	618	1410	86000	646	1620	<1	700
	CHCl <sub>3</sub>	641	1110	103000	669	1380	4	650
<b>SqB2</b> 	PB	627	1080	150000	650	1100	5	560
<b>nor-SqB1</b> 	_*							
<b>nor-SqB2</b> 	PB	638	1230	88000	666	1120	20	660

## Продовження таблиці 2.1

Барвник	Розчинник	$\lambda_{\text{макс.}}$ (Погл.), нм	$\Delta\nu_{1/2}$ (Погл.), $\text{см}^{-1}$	$\varepsilon$ , $\text{М}^{-1}\text{см}^{-1}$	$\lambda_{\text{макс.}}$ (Фл.), нм	$\Delta\nu_{1/2}$ (Фл.), $\text{см}^{-1}$	$\Phi_{\text{F}}$ , %	$\Delta\nu_{\text{st}}$ , $\text{см}^{-1}$
<b>nor-SqB1</b> 				—*				
<b>nor-SqB2</b> 	PB	638	1230	88000	666	1120	20	660
<b>SqCN1</b> 	PB – ДМСО (5:1)	660	2030	70000	678	1510	<1	400
	$\text{CHCl}_3$	683	800	196000	701	830	37	380
	MeOH	666	890	н/в	687	930	8	460
<b>SqCN2</b> 	PB	667	860	188000	685	860	7	390
<b>SqCN3</b> 	PB	654	1250	138000	670	850	1.0	370
	$\text{CHCl}_3$	683	800	202000	701	830	32	380
	MeOH	668	880	н/в	690	730	10	480
<b>SqCN4</b> 	PB	667	840	179000	686	860	7	420
<b>nor-SqCN1</b> 	PB – ДМСО (5:1)	698	н/в	28000	—			
	$\text{CHCl}_3$	694	750	120000	712	730	28	360

## Продовження таблиці 2.1

Барвник	Розчинник	$\lambda_{\text{макс.}}$ (Погл.), нм	$\Delta\nu_{1/2}$ (Погл.), $\text{см}^{-1}$	$\varepsilon$ , $\text{M}^{-1}\text{см}^{-1}$	$\lambda_{\text{макс.}}$ (Фл.), нм	$\Delta\nu_{1/2}$ (Фл.), $\text{см}^{-1}$	$\Phi_{\text{F}}$ , %	$\Delta\nu_{\text{st}}$ , $\text{см}^{-1}$
<b>nor-SqCN2</b> 	PB	670	1090	123000	693	910	19	500
<b>Styryl</b> 	PB	456	5800	н/в	615	2460	<1	5670
	CHCl <sub>3</sub>	488	3450	56000	585	2720	7	3400
	EtOH	484	4045	50500	612	2680	3.1	4320
<b>Cy5</b> 	PB	647	870	250000	664	750	27	420
<b>Cy5.5</b> 	PB	675	890	250000	694	790	23	400

\* н/в– не вимірювали

\*–не вимірювали через значну агрегацію і/або низьку розчинність

Спектральні характеристики гідрофільних сквараїнів **SqO2**, **SqO4**, **nor-SqO2**, **SqB2**, **nor-SqB2**, **SqCN2**, **SqCN4**, **nor-SqCN2** та **Cy5** і **Cy5.5**, що містять сульфогрупи в ароматичному кільці та/або алкільному ланцюзі у положенні 1 індолинінового фрагменту, вимірювали тільки у PB. Для визначення властивостей гідрофобних сквараїнів **SqO1**, **nor-SqO1**, **SqB1**, **SqCN1**, **nor-SqCN1** у полярному середовищі, використовували суміш розчинників PB-ДМСО (5:1), де ДМСО використовували для зменшення ступеня агрегації барвників. Данні, відносно чутливості барвників до полярності середовища, були отримані для кисневих барвників і потім співвідносились до їх похідних. Таким чином, у метанолі досліджувались **SqO1**, **SqO2**, **SqO3**, **nor-SqO1**, **nor-SqO2**.

### 2.2.1 Симетричні гідрофобні сквараїни

В першу чергу нами були вивчені симетричні гідрофобні сквараїни **SqO1**, **SqB1**, **SqCN1**, які за нашими припущеннями повинні бути найбільш чутливі до полярності оточення та утворення комплексів з протеїнами [122].

Положення максимумів поглинання та флуоресценції барвників залежить від замісника атому кисню в скваратному фрагменті. Так, у хлороформі **SqCN1**, в якому атом кисню сквараїну заміщений на сильно полярну диціанометиленову групу, має найбільш довгохвильовий максимум поглинання, ніж **SqO1** та **SqB1** (табл. 2.1, рис. 2.3). Ми вважаємо, що це пов'язано зі збільшенням полярності замісника у сквараїновому циклі [123].

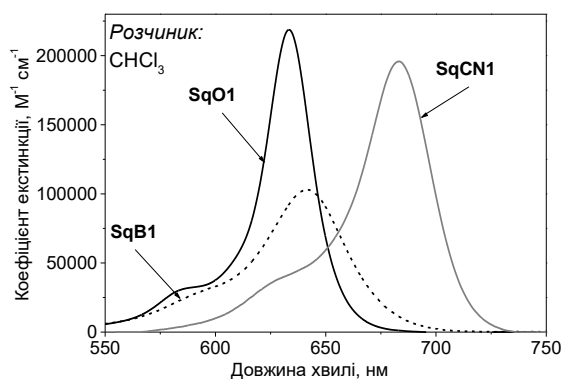


Рисунок 2.3 Спектри поглинання сквараїнових барвників **SqO1**, **SqB1**, **SqCN1** в хлороформі,  $c_{\text{барвника}} = 1 \text{ мкМ}$

У розчині водного буфера максимуми поглинання та флуоресценції становлять, відповідно, 624 нм і 635 нм (**SqO1**), 618 нм і 646 нм (**SqB1**) та 660 нм і 678 нм (**SqCN1**). Збільшення полярності середовища призводить до довгохвильового зсуву спектральних смуг на  $\sim 8$  нм для **SqO1** та на 23 нм для **SqB1** та **SqCN1** (табл. 2.1). Таким чином, барвники мають негативний сольватохромізм, тобто в основному стані вони більш полярні, ніж у збудженому [124].

Стоксові зсуви ( $\Delta\nu_{st}$ ) залежать від полярності розчинника та зменшуються при переході від водного розчину буфера до хлороформу (таб.2.1), що вказує на збільшення дипольного моменту при збудженні. За величиною  $\Delta\nu_{st}$  збільшуються в ряду **SqO1** < **SqCN1** < **SqB1**. Втрати енергії **SqB2** найбільш

ймовірно пов'язані зі зміною взаємодії Н-зв'язків між атомами кисню барбітурового фрагменту та метиновими протонами, а також молекулами води у збудженому стані [123].

У хлороформі означені сквараїни не виявляють ознак агрегації та мають досить великі коефіцієнти екстинкції від  $103000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  до  $219000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (табл. 2.1, рис. 2.4).

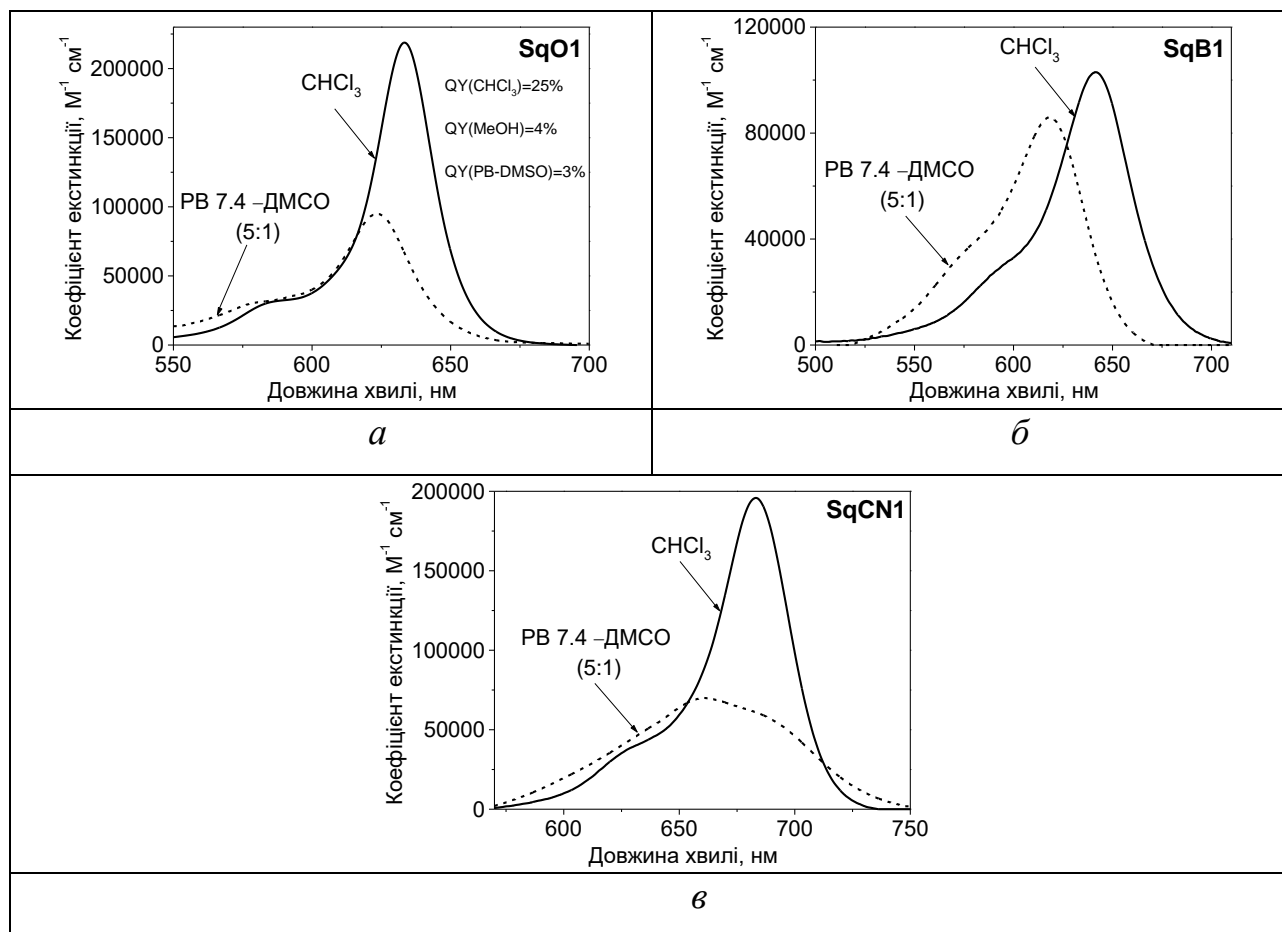


Рисунок 2.4 Спектри поглинання сквараїнів **SqO1** (а), **SqB1** (б), **SqCN1** (в) в хлороформі та у суміші розчинників РВ 7.4–ДМСО (5:1)

Збільшення полярності розчинника не призводить до агрегації **SqO1**, проте через безрадійщині втрати енергії, квантовий вихід барвника зменшується в  $\sim 7$  разів з 25 % у хлороформі до 4% у MeOH і 3% у РВ-ДМСО. Такі зміни квантового виходу вказують на чутливість барвників всього ряду до полярності їх мікрооточення. На відміну від **SqO1**, барвники **SqB1** і **SqCN1** значно агрегують у водному середовищі, що проявляється у появі смуги агрегації та збільшенні напівширини в спектрах поглинання (рис. 2.3 (б, в)). Через агрегацію

квантові виходи барвників у водному розчині буфера не перевищують 1%, а коефіцієнти екстинкції барвників знижуються [1233].

### 2.2.2 Симетричні гідрофобні норскварайни

У розчинах та розчинниках, що були використані у дослідженні **nor-SqB1** виявився майже не розчинним. **nor-SqO1** та **nor-SqCN1** у хлороформі знаходяться у мономерній формі з максимумами поглинання та флуоресценції, відповідно, 639 нм і 659 нм (**nor-SqO1**) та 694 нм і 712 нм (**nor-SqCN1**). Подібно до гідрофобних скварайнів, наявність у структурі сильно полярної діцианометиленової групи зміщує спектральні максимуми барвника у довгохвильову область (рис. 2.5) [122]. Коефіцієнт екстинкції **nor-SqO1** у хлороформі сягає  $218000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , що майже в два рази більше ніж для **nor-SqCN1** ( $\epsilon=120000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) [123].

Порівнюючи з хлороформом, у водному розчині **nor-SqO1** має більш короткохвильові максимуми поглинання та флуоресценції, відповідно, 639 нм і 659 нм, при цьому Стоксів зсув зростає в 1.3 рази, з  $340 \text{ cm}^{-1}$  у хлороформі до  $470 \text{ cm}^{-1}$  у водному розчині буфера. Напівширини смуги поглинання збільшуються зі збільшенням полярності розчинника, що вказує на його агрегацію **nor-SqO1** (рис. 2.5 (a)).

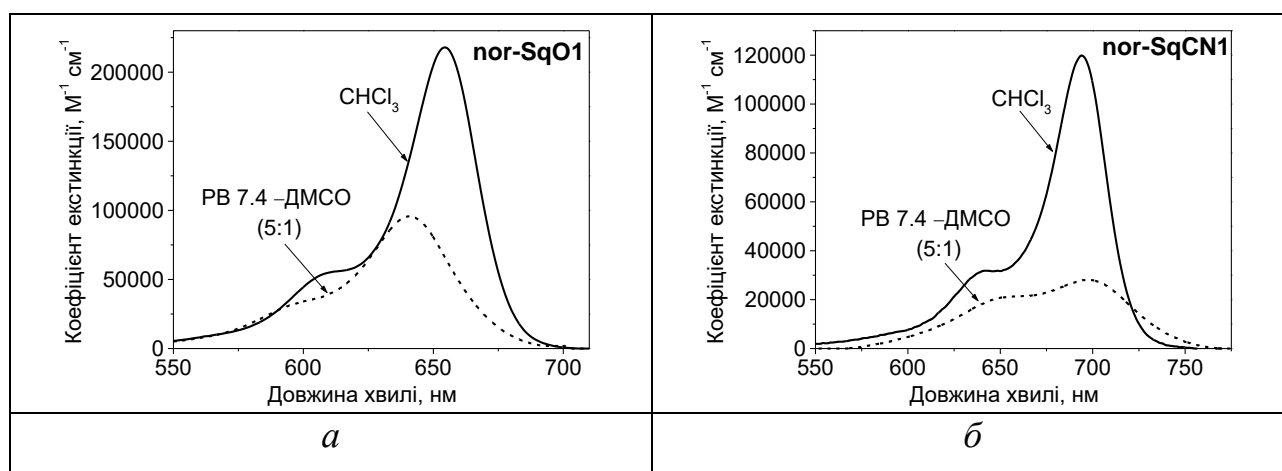


Рисунок 2.5 Спектри поглинання норскварайнових барвників **nor-SqO1** (a) і **nor-SqCN1**(б) в хлороформі та у суміші розчинників PB 7.4–ДМСО (5:1)

Діціанометиленовий **nor-SqCN1** також агрегує у водному розчині буфера, але в більшому ступені. Занадто низький квантовий вихід **nor-SqCN1** не дозволяє проведення достовірних спектральних вимірювань, тому максимум його смуги флуоресценції не визначали (табл. 2.1).

Гідрофобні норсквараїни **nor-SqO1** і **nor-SqCN1** виявились майже не чутливі до полярності середовища, ніж аналогічні сквараїни. Квантовий вихід **nor-SqO1** в метанолі ( $\Phi_F = 44\%$ ) майже не відрізняється від такого у хлороформі ( $\Phi_F = 45\%$ ) і в водному розчині буфера зменшується лише в  $\sim 3$  рази до  $13\%$  [123].

### 2.2.3 Симетричні гідрофільні сквараїни

Сквараїни **SqO2**, **SqB2** та **SqCN2**, що мають по сульфогрупі в кожному індоленіновому фрагменті, поглинають в межах 627–667 нм та флуоресціюють при 642–685 нм. Положення максимуму поглинання зростає в ряду барбітуровий < кисневий < діціанометиленовий замісник (рис. 2.6) [125].

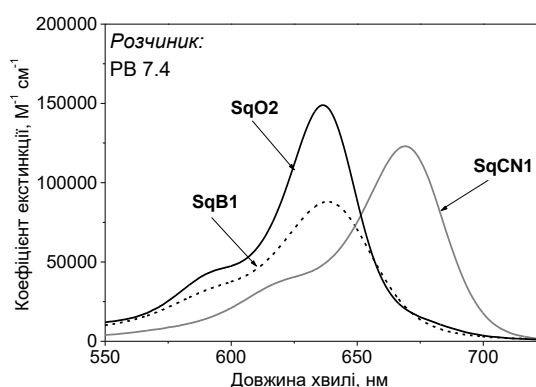


Рисунок 2.6 Спектри поглинання сквараїнових барвників **SqO2**, **SqB2**, **SqCN2** в РВ 7.4,  $c_{\text{барвника}} = 1 \text{ мкМ}$

Барвники виміряні у фосфатному буфері не виявляють ознак агрегації, в спектрах поглинання присутнє добре виражене коливальне плече, а їх напівширина збігається з такою в спектрах флуоресценції. Для оксосквараїна **SqO2** коефіцієнт екстинкції сягає  $265000 \text{ M}^{-1}\text{см}^{-1}$ , а для більш полярних **SqB2** і **SqCN2** дещо зменшується та становить, відповідно,  $150000 \text{ M}^{-1}\text{см}^{-1}$  та  $188000 \text{ M}^{-1}\text{см}^{-1}$ . Відносно **SqO2**, **SqB2** та **SqCN2** мають більші напівширини спектральних смуг, що пов'язано з більшим дипольним моментом цих барвників. Стоксові



зсуви ( $\Delta\nu_{st}$ ) зростають зі зростанням полярності замісника в центральному фрагменті, та знаходяться в ряду **SqO2** ( $250 \text{ cm}^{-1}$ ) < **SqCN2** ( $390 \text{ cm}^{-1}$ ) < **SqB2** ( $560 \text{ cm}^{-1}$ ). Як і у випадку гідрофобного скваріаіна **SqB1**, втрати енергії **SqB2** також пов'язані з утворенням водневих зв'язків між атомами кисню барбітурового фрагменту та/або метиновими протонами і молекулами води у збудженому стані [123]. Гідрофільні скваріаіни, на відміну від їх гідрофобних аналогів, мають значно меншу чутливість до полярності оточення [125]. Квантовий вихід **SqO2** змінюється лише в 2.5 рази, зростаючи від 7% у РВ до 18% у метанолі. У водному буфері квантові виходи **SqB2** та **SqCN2** також є не високими та не перевищують 7% (табл. 2.1).

## 2.2.4 Симетричні гідрофільні норскваріаіни

Спектри поглинання норскваріаінів з двома сульфогрупами **nor-SqO2**, **nor-SqB2** та **nor-SqCN2** у водному буфері наведено на рис. 2.7 [125].

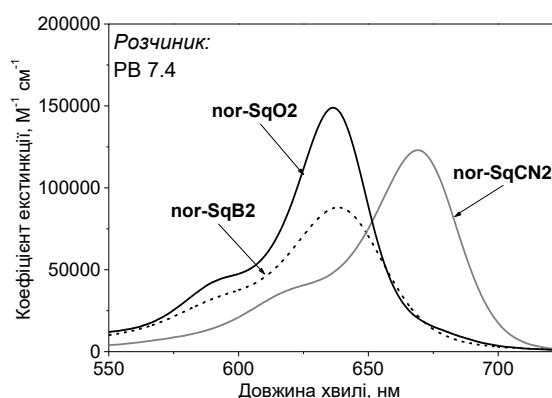


Рисунок 2.7 Спектри поглинання скваріаінових барвників **nor-SqO2**, **nor-SqB2**, **nor-SqCN2** в РВ 7.4,  $c_{\text{барвника}}=1 \text{ мкМ}$

Смути поглинання барвників зміщуються у довгохвильову область із зростанням полярності замісника у скватратному циклі, а максимуми спектральних смуг у РВ 7.4 становлять: **nor-SqO2** (636/653 нм), **nor-SqB2** (638/666 нм), **nor-SqCN2** (670/693 нм). Подібно до інших розглянутих барвників з барбітуровою групою, утворення водневих зв'язків збільшує втрати енергії та призводить до зростання Стокового зсуву **nor-SqB2** ( $\Delta\nu_{st}=660 \text{ cm}^{-1}$ ), відносно **nor-SqO2** ( $\Delta\nu_{st}=410 \text{ cm}^{-1}$ ) та **nor-SqCN2** ( $\Delta\nu_{st}=500 \text{ cm}^{-1}$ ).

Наявність двох сульфогруп перешкоджає агрегації барвників, тому у РВ вони мають значні квантові виходи 32% (**nor-SqO2**), 20% (**nor-SqB2**), 19% (**nor-SqCN2**) та коефіцієнти екстинкції вищі за гідрофобні норсквараїни, які дорівнюють  $149000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (**nor-SqO2**),  $88000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (**nor-SqB2**),  $123000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (**nor-SqCN2**) [125].

Гідрофільні норсквараїни практично не чутливі до полярності середовища, квантовий вихід **nor-SqO2** у РВ лише у 1.2 рази менший за 41% у метанолі.

### 2.2.5 Гідрофобні сквараїни з карбоксильною групою

Далі ми дослідили несиметричні сквараїни **SqO3** та **SqCN3**, що на відміну від попередніх барвників мають карбоксильну групу в алкільному ланцюзі у атома азоту в індоленіновому фрагменті. Наявність цієї групи збільшує розчинність сквараїнів у водному середовищі, однак в меншій мірі, ніж сульфогрупа. Ведення до структури барвників карбоксильної групи зменшує їх агрегацію у полярних розчинниках, в той же час не зберігаючи чутливість барвників до полярності.

Смути поглинання і флуоресценції сквараїнів **SqO3**, і **SqCN3**, виміряні при концентрації барвника  $c \sim 1 \text{ мкМ}$  як у фосфатному буфері, так і в хлороформі, мають яскраво виражене плече (рис. 2.8), яке пов'язане з коливальними переходами при збудженні та випромінюванні [112]. Смути поглинання і флуоресценції сквараїна **SqO3** дзеркально симетричні один до одного (зберігається правило дзеркальної симетрії Льовшина [126, 127]), що свідчить як про відсутність значних конформаційних змін або сольватаційних ефектів у збудженому стані, так і про відсутність агрегації барвника при зазначеній концентрації (рис. 2.8 (а)).

Сквараїн **SqCN3** має сильно електроноакцепторну диціанометиленову групу у сквартатному фрагменті та не має жодної сульфогрупи, через це він агрегує у РВ 7.4 (рис. 2.8 (б)) [128]. Агрегація призводить до порушення дзеркальної симетрії спектральних смуг **SqCN3** у РВ 7.4 та збільшенню напівширини смуги поглинання. Беручи до уваги те, що у менш полярному

розчиннику, хлороформі, дзеркальна симетрія **SqCN3** також незначною мірою порушена, слід припустити, що порушення дзеркальної симетрії у водному буфері пов'язано не тільки з агрегацією, але ще й з сольватаційними ефектами у збудженому стані.

Оксоскварайн **SqO3** у фосфатному буфері має максимуми смуг поглинання та флуоресценції, відповідно, 622 нм і 632 нм. Для диціанометиленового скварайна **SqCN3**, ці смуги значно зміщуються у довгохвильову область — на 32 нм і 38 нм. Барвники характеризуються малими значеннями стоксових зсувів ( $\Delta\nu_{st}$ ),  $250\text{ см}^{-1}$  для **SqO3** і дещо більше,  $370\text{ см}^{-1}$  для **SqCN3**. Зростання безрадіаційних втрат енергії у випадку барвника **SqCN3** пов'язано, скоріш за все, з більш полярною будовою його молекули через наявність сильно електроноакцепторної диціанометиленової групи у скваратному фрагменті [128].

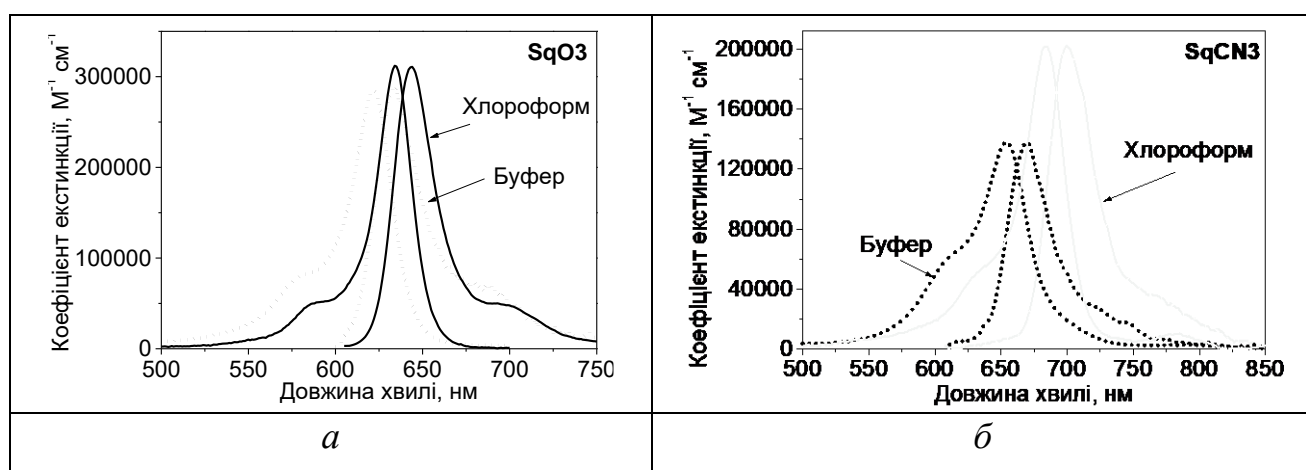


Рисунок 2.8 Спектри поглинання скварайнових барвників **SqO3** і **SqCN3** у хлороформі та РВ 7.4,  $c_{\text{барвника}}=1\text{ мкМ}$

Малі значення стоксових зсувів призводять до значного перекривання смуг поглинання і випромінювання скварайнових барвників, незважаючи на те, що ці смуги є дуже вузькими (з напівширинами  $\sim 380\text{ см}^{-1}$  для **SqO3** і  $410\text{--}590\text{ см}^{-1}$  для **SqCN3** у фосфатному буфері). Така особливість спектральних смуг є характерною майже для всіх відомих скварайнів [129].

Коефіцієнти екстинкції **SqO3** і **SqCN3** у фосфатному буфері сягають, відповідно,  $285000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  і  $138000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , а квантові виходи флуоресценції є невисокими, відповідно 1.9% та 1%.

При переході від полярного водного фосфатного буфера до менш полярного хлороформу максимуми поглинання і флуоресценції зміщуються в довгохвильову область приблизно на 12 нм для оксосквараїна **SqO3** і на 30 нм для більш полярного диціанометиленового **SqCN3**. При цьому коефіцієнт екстинкції **SqO3** зростає в 1.1 рази до  $312000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , а для **SqCN3** в 1.4 рази та сягає  $202000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (табл. 2.1). Зменшення полярності середовища призводить до зростання квантових виходів, які становлять 25 % (**SqO3**) і 32 % (**SqCN3**) [128].

### 2.2.6 Гідрофільні сквараїни з карбоксильними групами

Сквараїни **SqO4** та **SqCN4** мають, відповідно, чотири та три сульфогрупи, які необхідні для зменшення агрегації при ковалентному зв'язуванні. Окрім того, до структури **SqO4** і **SqCN4** введено, відповідно, дві та одна карбоксильна група, що ще збільшує гідрофільність барвників [130]. Відносно **SqO4**, для якого максимуми смуг поглинання та флуоресценції становлять, відповідно, 635 нм і 644 нм, спектральні максимуми **SqCN4** зсунуті у довгохвильову область, та сягають 667 нм і 687 нм. Коефіцієнт екстинкції **SqO4** складає  $300000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , що в 1.6 рази більше ніж для **SqCN4**, для якого він становить  $179000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Квантові виходи є не високими, лише 12 % (**SqO4**) та 7% (**SqCN4**).

### 2.2.7 Стириловий барвник

Барвник **Styryl** належить до класу стирилових барвників та, відносно сквараїнів, поглинає і випромінює у більш короткохвильовій частині спектру. Чутливість спектральних та інших фотофізичних характеристик барвника до полярності мікрооточення досягається завдяки сильній донорно-акцепторній взаємодії між електронодонорною диметиламіногрупою та електроноакцепторним кватернізованим піридинієвим циклом.

Макимуми поглинання та випромінювання **Styryl** істотно залежать від полярності розчинника та становлять, відповідно, 456 / 615 нм у РВ, 484 / 612 нм у етанолі та 488 / 585 нм у хлороформі. Слід зазначити, що **Styryl**, як і сквараїни,

має негативний сольватохромізм, проте, на відміну від скварайнів, має позитивний сольватофлуорохромізм.

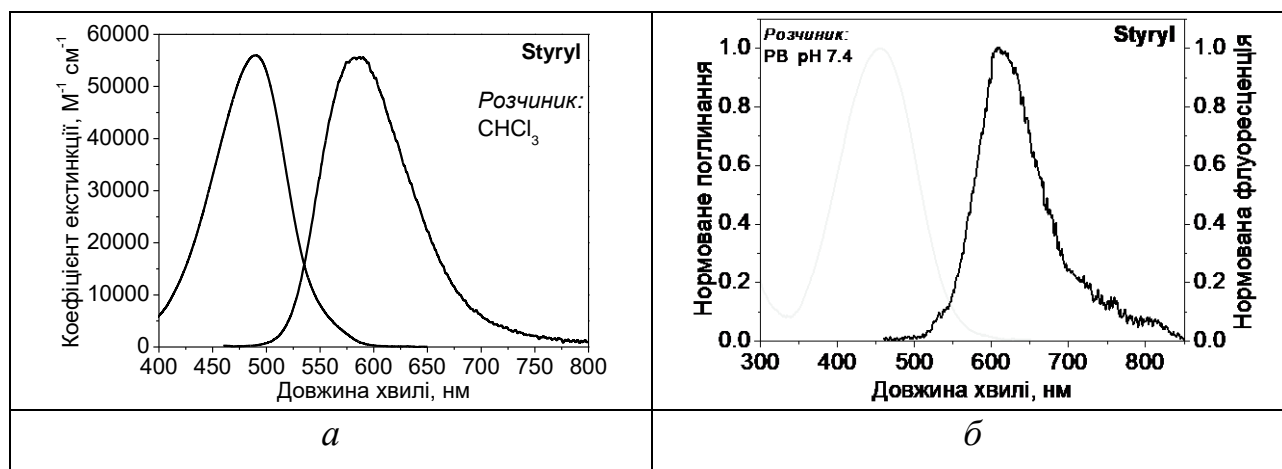


Рисунок 2.9 Спектри поглинання та флуоресценції **Styryl** у хлороформі та РВ,  $C_{\text{барвника}} = 1 \text{ мкМ}$

Таким чином, максимум флуоресценції **Styryl** зсувається у довгохвильову область спектру зі збільшенням полярності середовища. Імовірно, це пов'язано з внутрішньомолекулярним переносом заряду з сегмента-донора (диметиламіногрупа) на сегмент-акцептора (піридиновий цикл) барвника та зміною геометрії барвника у збудженому стані [131]. Через це, Стоксів зсув барвника збільшується зі збільшенням полярності розчинника від  $3400 \text{ см}^{-1}$  у хлороформі до  $5670 \text{ см}^{-1}$  у РВ.

Через сильно полярну будову, **Styryl** має низьку розчинність у водних середовищах та значно агрегує, через що його коефіцієнт екстинкції у РВ не вимірювали. У водному розчині буфера барвник має істотно збільшену напівширину поглинання  $5800 \text{ см}^{-1}$  та значне порушення дзеркальної симетрії. Проте незначне відхилення від правила Льовшина спостерігається і у хлороформі, що вказує на наявність сольватаційних ефектів. Оскільки більша частина **Styryl** у РВ знаходиться в агрегованій формі, барвник майже не випромінює ( $\Phi_F < 1\%$ ).

При зменшенні полярності середовища барвник переходить до мономерної форми, через що напівширини спектрів поглинання **Styryl** та Стоксіві зсуви зменшуються. При цьому квантовий вихід значно зростає, до 3.1 % у етанолі та 7.0 % у хлороформі.

### 2.2.8 Ціаніни

Барвники серій CyTM (*General Electric Healthcare*, США) [132], **Cy5** та **Cy5.5** є комерційно доступними та широко розповсюдженими при проведенні медико-біологічних досліджень [133, 134, 135], в тому числі і в дослідженнях з використанням FRET [136, 137]. Барвники відносяться до класу відкритоланцюгових ціанінів, та мають дві (**Cy5**) та чотири (**Cy5.5**) сульфогрупи, що зменшує агрегацію барвників при ковалентному зв'язуванні з біомолекулами. Максимуми поглинання та флуоресценції **Cy5** складають, відповідно, 647 нм та 664 нм. Барвник **Cy5.5** має більш довгохвильові максимуми поглинання та флуоресценції, відповідно, 675 нм і 694 нм. У водному буфері **Cy5** та **Cy5.5** мають досить великі коефіцієнти екстинкції, що для обох барвників дорівнюють  $250000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  та квантові виходи, відповідно, 27% та 23%. Спектральні та фотофізичні характеристики барвників дозволяють утворювати FRET-пару **Cy5–Cy5.5**, яка використовується для проведення медико-біологічних досліджень [138, 139].

### Висновки до розділу 2

Підводячи підсумки дослідження, викладені в цій главі, можна зробити ряд висновків, щодо зв'язку будови барвників та їх спектральних і фотофізичних властивостей.

1. Сквараїнові та норсквараїнові барвники виявляють негативний сольватохромізм та сольватофлуорохромізм, при цьому спектральні смуги норсквараїнів є більш довгохвильовими у порівнянні зі смугами сквараїнів аналогічної будови.

2. Стоксові зсуви зростають в ряду замісників **кисень < диціанометиленова група < барбітурова кислота**. Для барвників з барбітуровою групою це пов'язано зі змінами, які відбуваються у збудженому стані з внутрішньомолекулярними водневими зв'язками між киснями фрагменту барбітурової кислоти та метиновими протонами, що і призводить до втрати енергії.

3. Заміщені за сквараїном циклом гідрофобні барвники, які не містять сульфогруп, значно агрегують у водному середовищі, що спектрально

підтверджується уширенням смуги поглинання та/або появою додаткової смуги, розташованої на 40-50 нм у більш короткохвильовій області. Через агрегацію квантові виходи флуоресценції сквараїнів (**SqB1** і **SqCN1**) у водному буферному розчині не перевищують 1%, а у аналогічних за структурою норсквараїнів флуоресценція взагалі відсутня. Барвник **nor-SqB1** має настільки погану розчинність, що неможливо дослідити спектральні властивості в жодному з досліджених розчинників, а **nor-SqCN2** розчинявся без значних ознак агрегації лише у хлороформі.

4. Встановлено, що сквараїни більш чутливі до полярності оточення, що виявляється у зниженні їх квантового виходу у 3.2-6.3 разів при переході від розчину у неполярному розчиннику (хлороформі) до полярного середовища (метанолу), в той час як квантовий вихід норсквараїнів майже не залежить від полярності середовища.

5. Введення сульфогруп підвищує розчинність барвників у водному розчині, але водночас зменшує чутливість барвників до полярності оточення. Квантовий вихід **SqO2** змінюється лише в 2.5 рази при переході від водного розчину (РВ) до метанолу, і лише у 1.3 рази для норсквараїну **nor-SqO2**. Наявність карбоксильної групи також сприяє розчинності барвників у водному розчині, проте зберігає чутливість барвників до полярності середовища. Так, у РВ квантові виходи флуоресценції барвників є невисокими, 1.9% (**SqO3**) та 1% (**SqCN3**), а зменшення полярності середовища приводить до зростання квантових виходів, відповідно до 6% і 10% у метанолі та 25% і 32% у хлороформі.

6. Максимуми поглинання та флуоресценції стирилового барвника **Styryl** істотно залежать від полярності розчинника та при переході від РВ до хлороформу максимум поглинання зсувається у довгохвильову область на 32 нм, а флуоресценція – у короткохвильову на 30 нм. Квантовий вихід барвника у хлороформі дорівнює 6.7%, а у водних середовищах спостерігається значна агрегація, через що **Styryl** втрачає здатність флуоресціювати.

Основні положення розділу 2 викладені у публікаціях автора [122, 123, 125, 128, 130].

### РОЗДІЛ 3 СПЕКТРАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ БАРВНИКІВ У КОМПЛЕКСАХ З ПРОТЕЇНАМИ

Дослідження протеїнів за допомогою флуоресцентних барвників передбачає вивчення їх здатності до нековалентної взаємодії з протеїном та спектральних і фотофізичних властивостей в комплексах з протеїном.

Як було зазначено у розділі 1 формування комплексів барвників з протеїнами відбувається у "гідрофобних кишнях" протеїну та супроводжується зміною спектрально-люмінесцентних властивостей барвників, що можна віднести до зміни середовища після утворення комплексу [140]. Відомо, що квантовий вихід сквараїнів після утворення комплексу з протеїнами може зростати в 50 разів, при цьому смуги поглинання та флуоресценції мають довгохвильовий зсув [141, 142, 123], однак утворення комплексу залежить як від будови барвника, так і від властивостей протеїну [143, 144].

В якості модельного протеїну був обраний БСА (бичачий сироватковий альбумін), який має добре відомі властивості та молекулярну будову. Висока гідрофобність та комплексоутворююча активність БСА з лігандами, щонайкраще підходять для вивчення здатності барвників до утворення стійких комплексів „барвник–протеїн”. Інтерпретацію даних, що одержуються, полегшує відсутність ферментативної активності БСА.

Сквараїнові, норсквараїнові та стирилові барвники утворюють комплекси з протеїнами, що приводить до змін їх спектральних і фотофізичних характеристик [145, 123, 109]. Утворення комплексів є кінетично і термодинамічно контрольованим процесом. Спочатку, безпосередньо після змішування барвника і протеїна, процес контролюється кінетикою, тобто швидкість утворення комплексу ( $v$ ). У загальному випадку вона залежить від концентрацій барвника ( $C_{\text{барвника}}$ ) та протеїну ( $C_{\text{протеїн}}$ ) (формула 3.1), і потребує певного часу, який залежить від константи швидкості реакції ( $k$ ). Але далі в системі досягається рівновага між комплексом і його вільними компонентами (молекулами барвника і протеїна), тобто процес стає термодинамічно контрольованим (формула 3.2).



$$v = k c_{\text{барвника}} c_{\text{БСА}}, \quad (3.1)$$



Константа рівноваги ( $K_c$ ) визначається як відношення мольної концентрації комплексу ( $c_{\text{комплексу}}$ ) до множення мольних концентрацій барвника та БСА (формула 3.3).

$$K_c = c_{\text{Комплекс}} / (c_{\text{барвник}} c_{\text{протеїн}}) \quad (3.3)$$

Тому, перш за все, було досліджено процес утворення комплексів у часі. В якості модельного протеїну використовували БСА, при цьому ми спостерігали за змінами спектрів та інтенсивностей поглинання і флуоресценції безпосередньо з моменту змішування розчинів барвника і БСА у водному розчині.

### 3.1 Кінетика комплексоутворення

На прикладі **SqO3** та **SqCN3** ми дослідили кінетику комплексоутворення барвників з БСА при різних концентраціях протеїну. Було встановлено, що утворення комплексу сквараїна **SqO3** ( $c_{\text{барвника}} = 1$  мкМ) з БСА при  $c_{\text{БСА}} = 1$  мкМ перебігає за 3–4 хвилини. При цьому спостерігається невелике збільшення абсорбції (рис. 3.1 (а, в)), зменшення інтенсивності флуоресценції (рис. 3.1 (б, г)), а максимуми поглинання та випромінювання зсуваються у довгохвильову область, відповідно на 3 та 2 нм. При низькій концентрації БСА  $c_{\text{БСА}} < 0.3$  мкМ утворення комплексу сповільнюється, що можна пояснити законом діючих мас у кінетиці (формула 3.1).

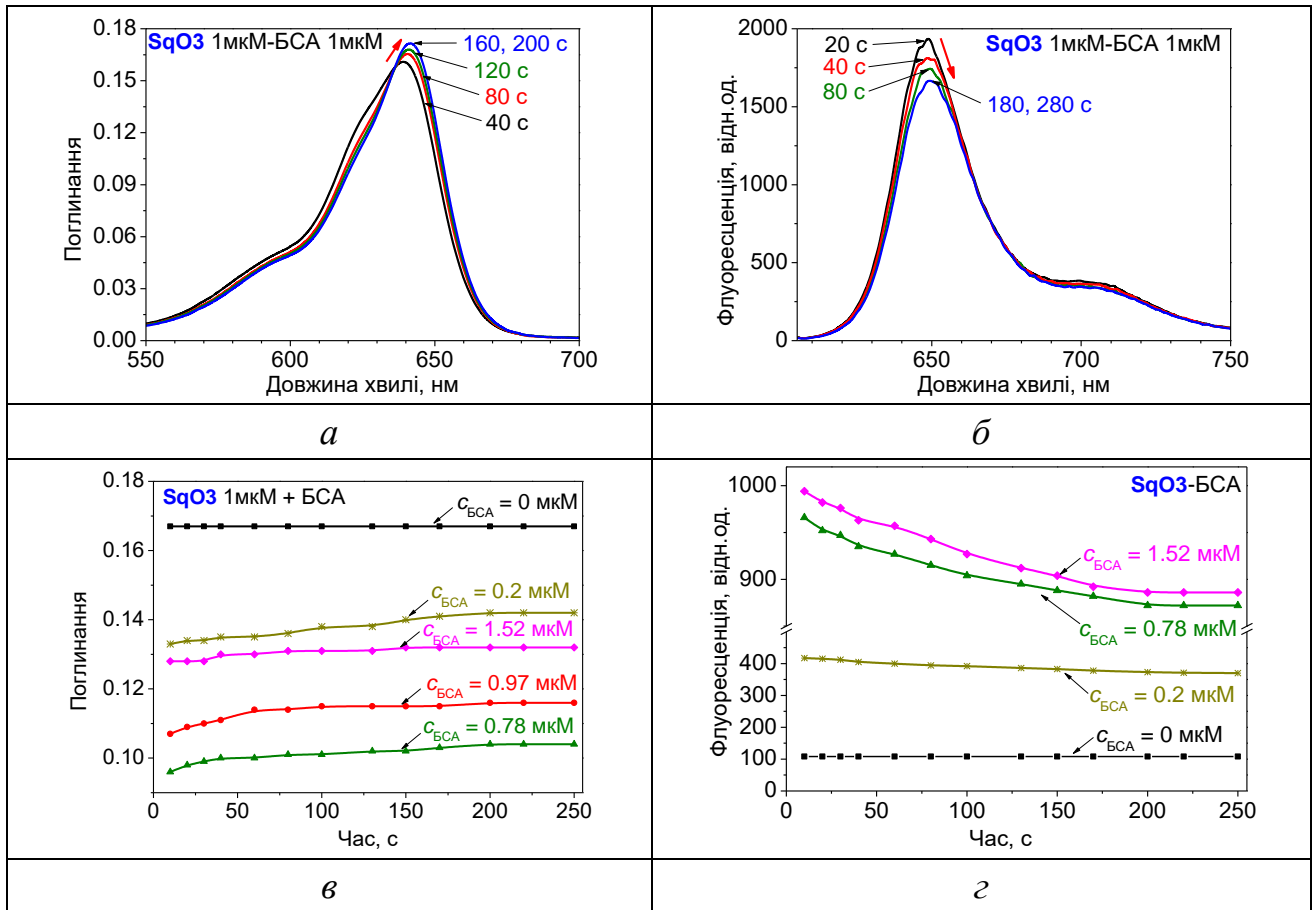


Рисунок 3.1 Зміни спектрів абсорбції (а), інтенсивності флуоресценції (б) та максимумів поглинання (в) і флуоресценції (г) барвника **SqO3** ( $C_{\text{барвника}} = 1 \text{ мкМ}$ ) у часі при додаванні різних концентрацій БСА

Утворення протеїнового комплексу диціанометиленового сквараїна **SqCN3** перебігає значно повільніше, і рівновага встановлюється приблизно за 5–10 хвилини у залежності від концентрації БСА (рис. 3.2). Протягом цього часу спостерігається зміна абсорбції (рис. 3.2 (а, в)), проте інтенсивність флуоресценції залишається не змінною (рис. 3.2 (б)).

Слід зазначити, що спектральні зміни при утворенні протеїнових комплексів сквараїна **SqCN3** у часі значно більші, ніж у випадку комплексів сквараїна **SqO3** (рис. 3.3 (а, в)). Так, при концентрації **SqO3** та БСА 1 мкМ, спектральні зсуви дорівнюють 5 нм (поглинання) та 8 нм (флуоресценція) (рис. 3.2 (а, в)).

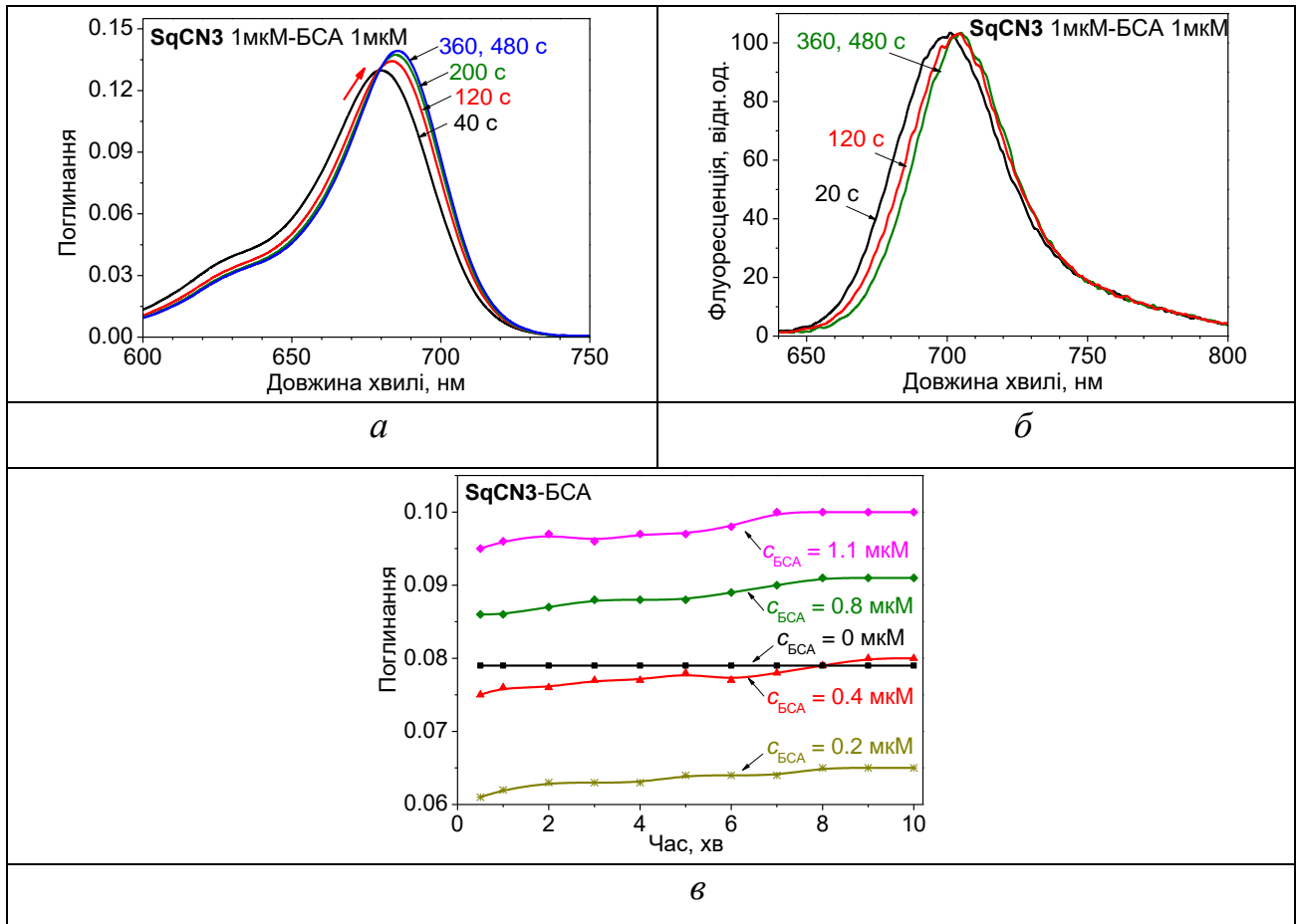


Рисунок 3.2 Зміни абсорбції (а), інтенсивності флуоресценції (б) та максимумів поглинання (в) барвника **SqCN3** ( $c_{\text{барвника}} = 1 \text{ мкМ}$ ) у часі при додаванні різних концентрацій БСА

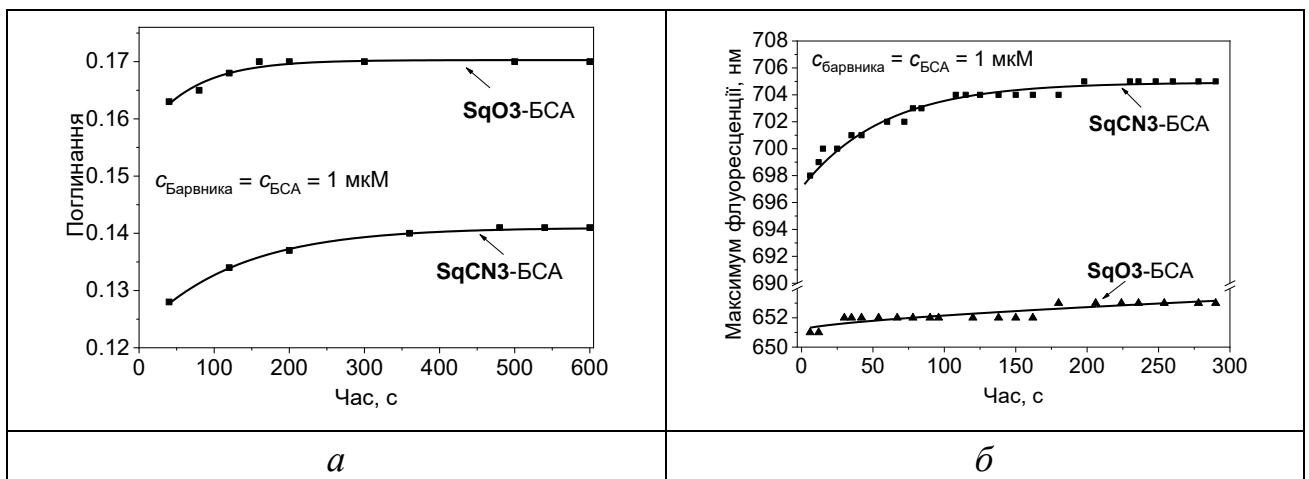


Рисунок 3.3 Зміни інтенсивності поглинання (а) і максимумів флуоресценції (б) барвників **SqO3** і **SqCN3** ( $c_{\text{барвника}} = 1 \text{ мкМ}$ ) у часі при концентрації БСА 1 мкМ

Таким чином, при змішуванні протеїну зі сквараїном **SqO3** і, в ще більшій мірі, з **SqCN3**, протягом до 10 хвилин (у залежності від барвника та концентрації БСА) можуть спостерігатися зміни спектральних характеристик

розчину, що пов'язано з кінетикою утворення протеїнового комплексу. Тому всі подальші вимірювання, що пов'язані з комплексоутворенням, ми проводили щонайменше через 10 хвилин після змішування розчинів, тобто в термодинамічно контрольованих умовах.

### 3.2 Протеїнові комплекси сквараїнів у термодинамічно контрольованих умовах

Далі ми досліджували протеїнові комплекси сквараїнів. Було вивчено вплив концентрації сквараїнів **SqO3** і **SqCN3** та концентрації БСА на спектри та інтенсивності поглинання і флуоресценції барвників в протеїнових комплексах. Для цього було проведено абсорбційне та флуоресцентне титрування постійних концентрацій обох барвників ( $c_{\text{барвника}} = 1 \text{ мкМ}$ ) розчином БСА та, навпаки, титрування БСА сквараїнами при постійних концентраціях БСА:  $c_{\text{БСА}} = 1 \text{ мкМ}$  (0.06 мг/мл). Залежність спектрів та інтенсивностей поглинання і флуоресценції сквараїнів від концентрації БСА та концентрації барвника показано на [рис. 3.4](#), [3.5](#) і [3.6](#).

З даних, представлених на [рис. 3.4](#), [3.5](#) і [3.6](#) видно, що збільшення концентрації БСА в діапазоні  $c_{\text{БСА}} = 0 \div 1 \text{ мкМ}$  у РВ приводить до довгохвильового зміщення смуг поглинання і флуоресценції, відповідно, на 20 нм і 23 нм для оксосквараїна **SqO3** ( $c_{\text{барвника}} = 1 \text{ мкМ}$ ) і на 30 нм і 36 нм для диціанометиленового сквараїна **SqCN3** ( $c_{\text{барвника}} = 1 \text{ мкМ}$ ). При цьому спостерігається значне зростання (приблизно в 10 разів) інтенсивності флуоресценції обох барвників ([рис. 3.4 \(z\)](#), [3.5 \(z\)](#)) [128].

Графіки залежності абсорбції від концентрації БСА мають яскраво виражені мінімуми в області  $c_{\text{БСА}} \sim 0.70 \text{ мкМ}$  для оксосквараїна **SqO3** і  $c_{\text{БСА}} \sim 0.17 \text{ мкМ}$  для диціанометиленового сквараїна **SqCN3** ([рис. 3.6 \(a\)](#)). Тобто при збільшенні концентрації БСА абсорбція спочатку зменшується, а потім зростає. Такий ефект стає зрозумілим з [рисунків 3.4 \(e\)](#) і [3.5 \(e\)](#): при збільшенні концентрації БСА вміст барвника та, відповідно, інтенсивність смуги його поглинання у водній фазі зменшується, а у протеїновій фазі збільшується.

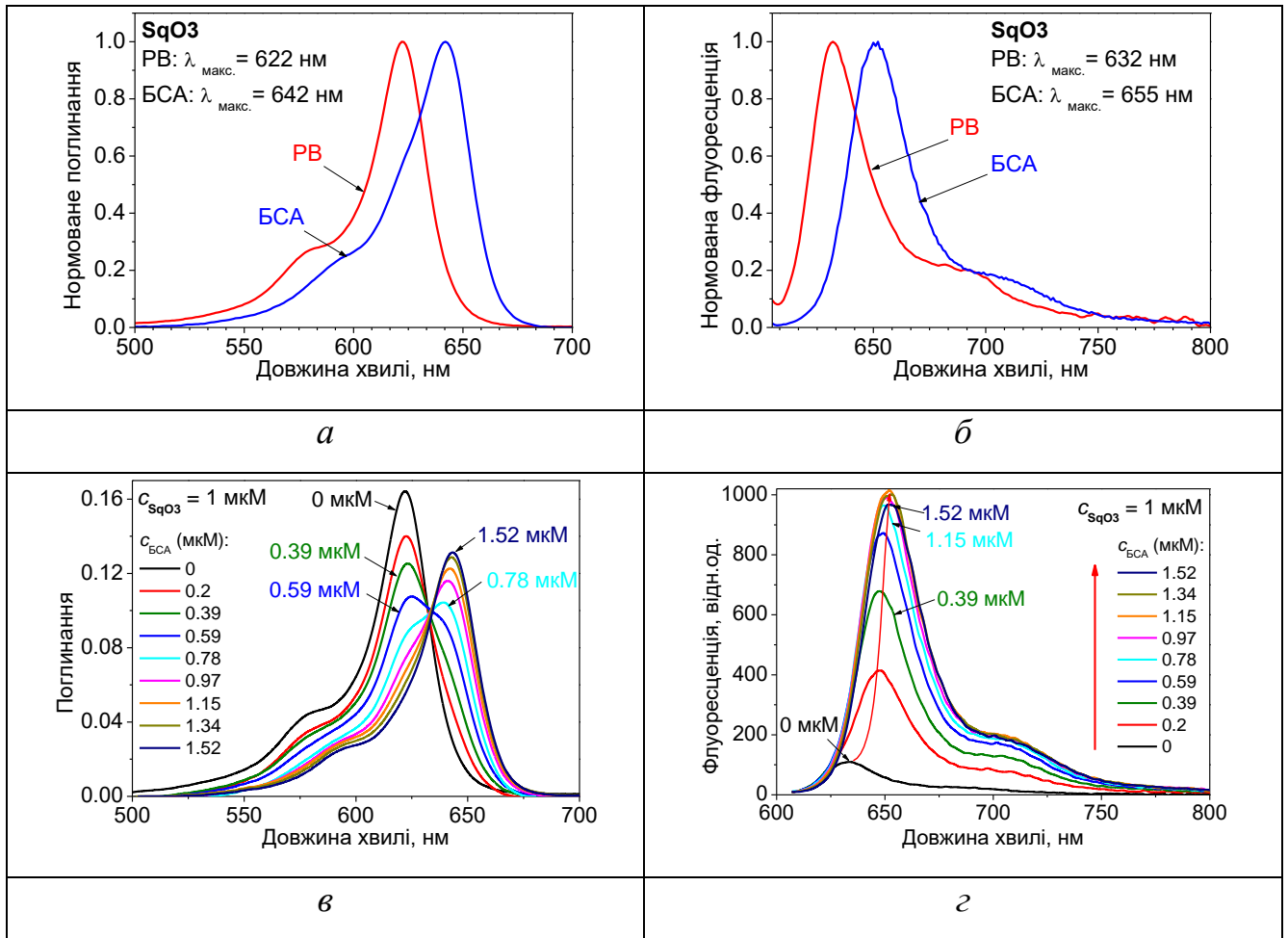


Рисунок 3.4 Вплив БСА на положення максимумів (а, б), вид та інтенсивності спектрів поглинання (в) і флуоресценції (г) сквараїна **SqO3** при  $c_{\text{барвника}} = 1 \text{ мкМ}$  (10 мМ фосфатний буфер з рН 7.4)

З [рисунків 3.4 \(в\), 3.5 \(в\) і 3.6 \(а\)](#) також видно, що при  $c_{\text{барвника}} = c_{\text{БСА}} = 1 \text{ мкМ}$  екстинкція сквараїна **SqO3** у комплексі з протеїном менша, ніж для барвника у фосфатному буфері, а для сквараїна **SqCN3**, навпаки, більша.

Інтенсивність флуоресценції обох сквараїнів у фосфатному буфері суттєво зростає при збільшенні концентрації БСА від нуля до  $c_{\text{БСА}} \sim 0.7\text{--}1 \text{ мкМ}$ , а при більших концентраціях настає "насичення", тобто інтенсивність флуоресценції вже не змінюється ([рис. 3.6 \(а\)](#)). Максимуми смуг флуоресценції, як і максимуми поглинання, також зсуваються у довгохвильову область лише до певного значення, після чого остаються незмінними ([рис. 3.6 \(б\)](#)). Збільшення інтенсивності флуоресценції відбувається як через зменшення полярності його мікрооточення так і завдяки зменшенню агрегації барвника [128].

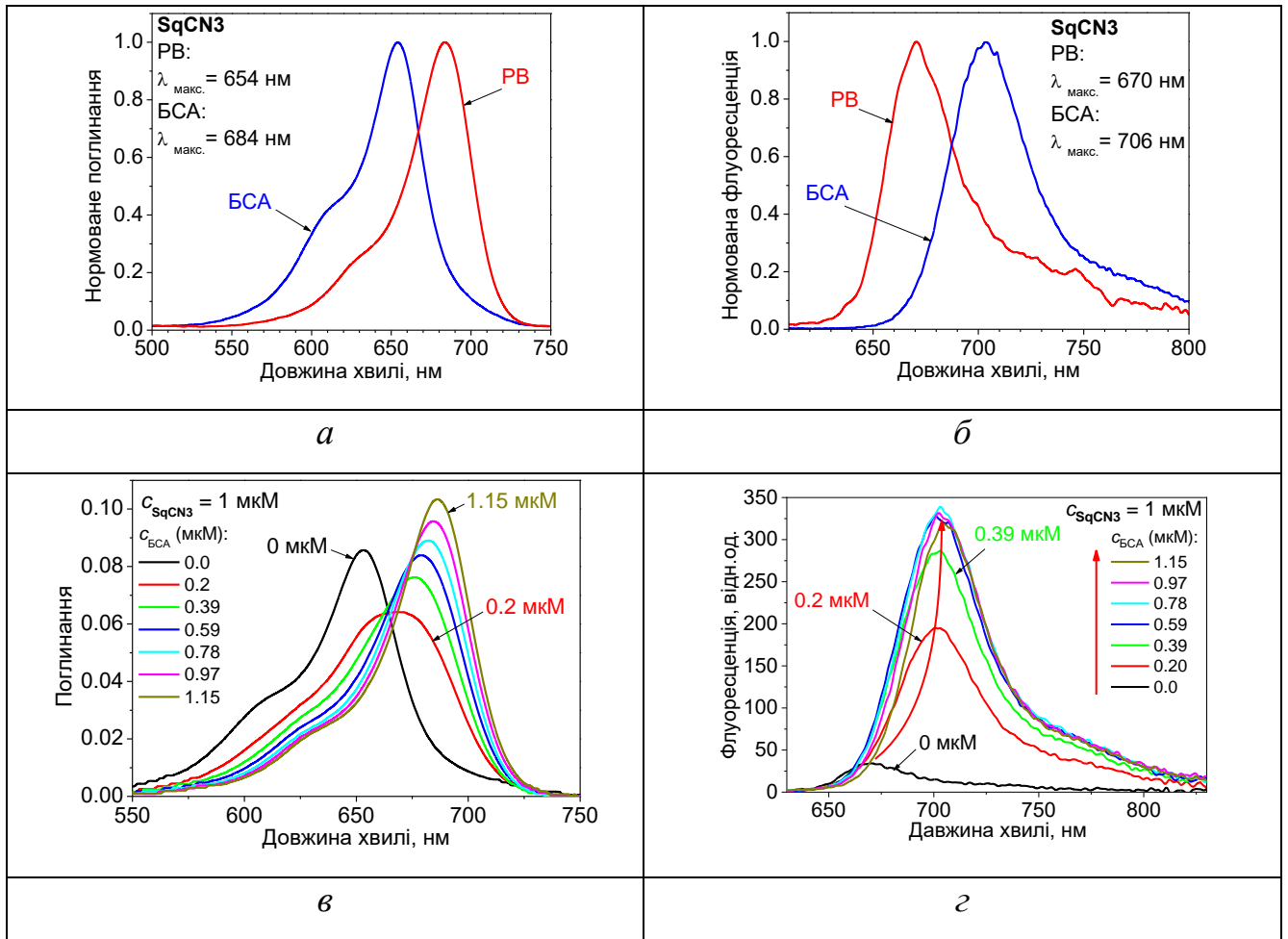


Рисунок 3.5 Вплив БСА на положення максимумів (*a*, *б*), вид та інтенсивності спектрів поглинання (*в*) і флуоресценції (*г*) сквараїна **SqCN3** ( $c_{\text{барвника}} = 1 \text{ мкМ}$ ) у 10 мМ фосфатному буфері з рН 7.4

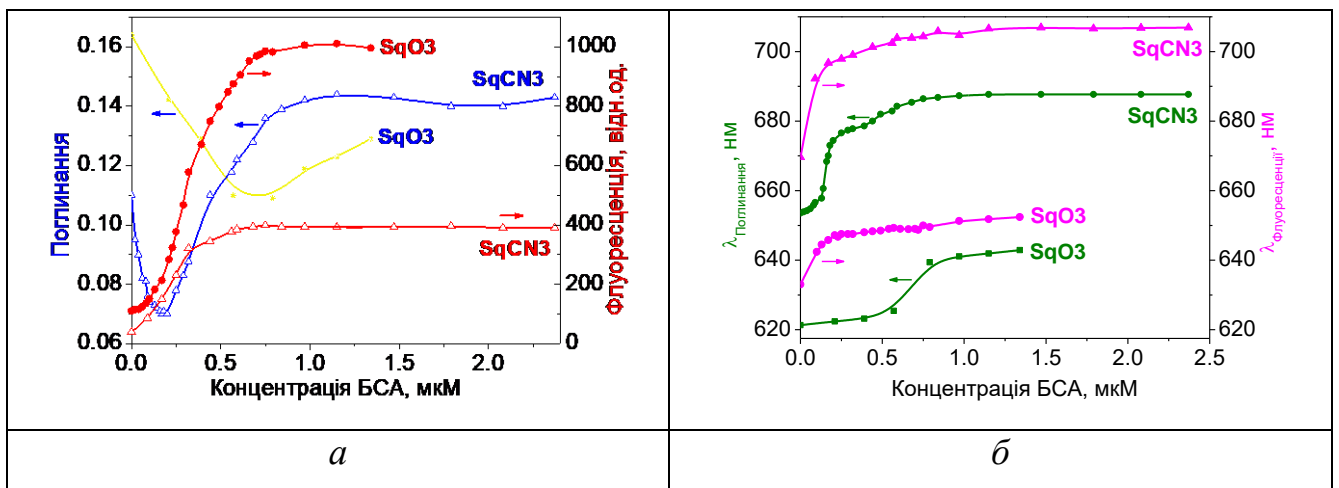


Рисунок 3.6 Вплив БСА на інтенсивності (*a*) та максимуми (*б*) спектральних смуг сквараїнів **SqO3**

Це добре видно зі спектрів **SqCN3** у воді, де барвник має значно більшу агрегацію, а ніж у РВ (рис. 3.7 (*a*)). Смуга поглинання агрегатів з максимумом

~615 нм поступово зникає зі збільшенням концентрації БСА до  $c_{\text{БСА}} \sim 4$  мкМ (рис. 3.7 (б)). Це пов'язано з переходом молекул барвника з води до більш гідрофобної фази (БСА) та утворенням комплексу барвник—БСА. Форма спектру флуоресценції при цьому не змінюється, бо випромінюють лише неагреговані молекули скварайну, але інтенсивність флуоресценції значно зростає (рис. 3.7 (в)).

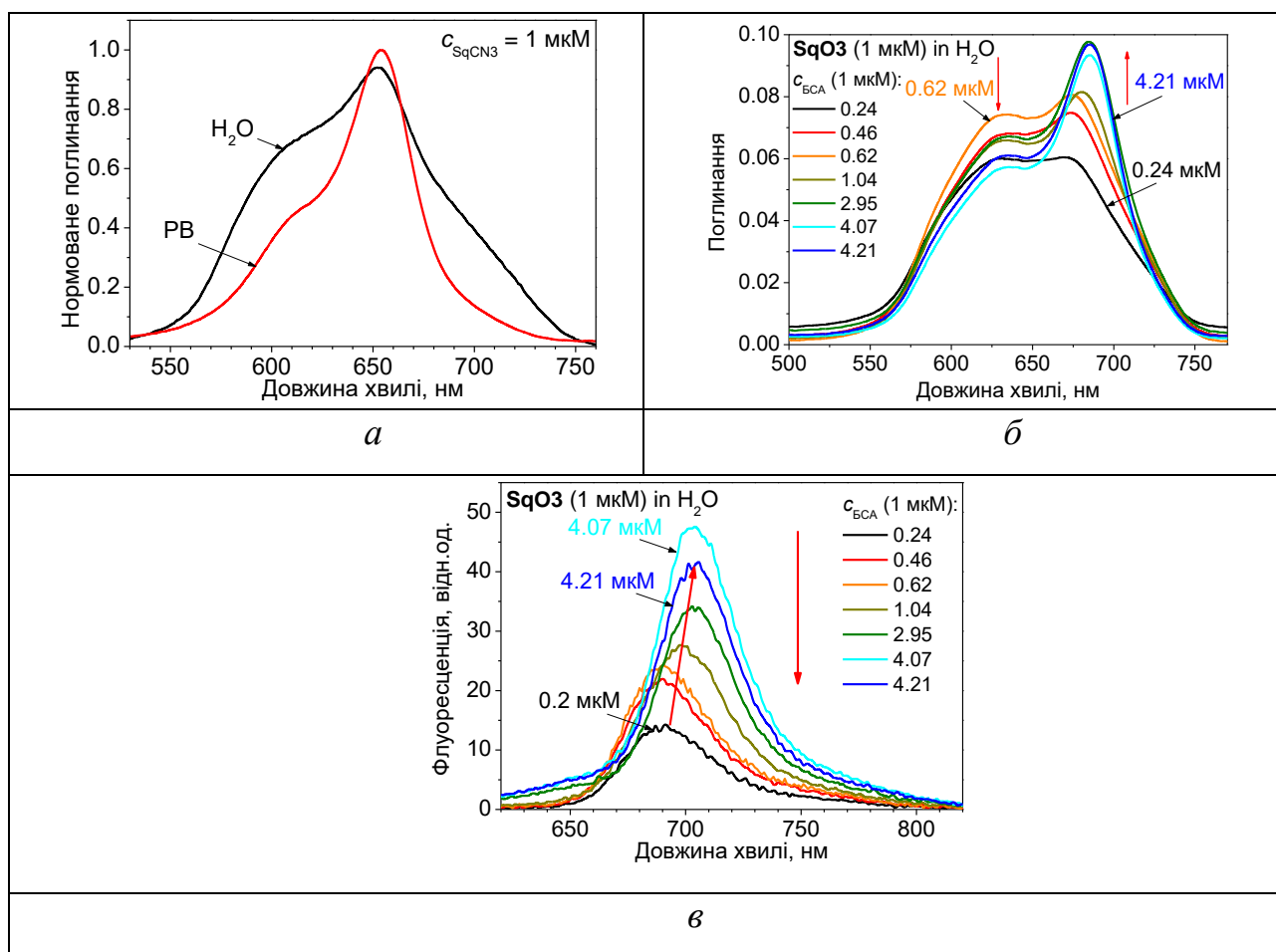


Рисунок 3.7 Вплив розчинника (а) та концентрації БСА на спектри поглинання (б) та флуоресценції (в) **SqCN3** при  $c_{\text{барвника}} = 1$  мкМ у воді

При збільшенні концентрації скварайнів при постійній концентрації БСА смуги поглинання і флуоресценції майже не зміщуються (рис. 3.8), і лише максимум поглинання диціанометиленового скварайна **SqCN3** зсувається у короткохвильову область на 13 нм (рис. 3.8 (в)). При концентрації БСА 1 мкМ абсорбція зростає лінійно при збільшенні концентрації оксоскварайна **SqO3** від нуля до, щонайменше,  $c_{\text{Барвника}} \sim 2.3$  мкМ для і до  $c_{\text{Барвника}} \sim 1.5$  мкМ для

диціанометиленового сквараїна **SqCN3** (рис. 3.8 (д)). Флуоресценція лінійно зростає від нуля до  $c_{\text{барвника}} \sim 0.4$  мкМ для оксоскваїна **SqO3** і до  $c_{\text{барвника}} \sim 1.3$  мкМ для диціанометиленового сквараїна **SqCN3**. При більших концентраціях барвників спостерігається відхилення графіка зростанні флуоресценції від лінійності.

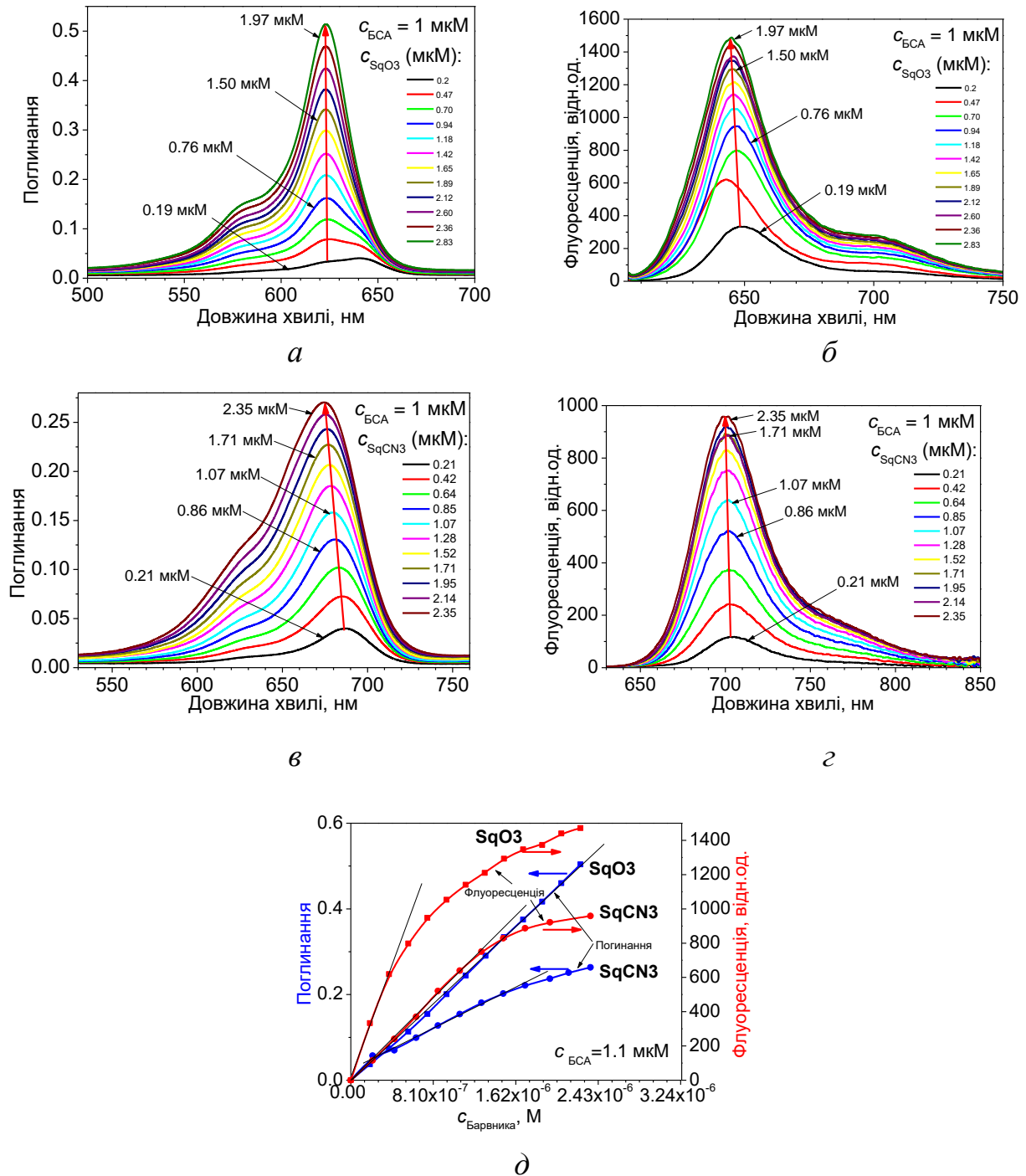


Рисунок 3.8 Вплив концентрації сквараїнів **SqO3** і **SqCN3** на їх спектри (а–д) та інтенсивності (д) поглинання та флуоресценції в комплексах з БСА при  $c_{\text{БСА}} = 1$  мкМ в 10 мМ фосфатному буфері (рН 7.4)



У той же час диціанометиленовий сквараїн **SqCN3** при концентрації  $>1.3$  мкМ починає агрегувати, що можна визначити не тільки по відхиленню від лінійності графіку залежності абсорбції від концентрації, але й по зростанню смуги агрегату при  $\sim 635$  нм.

Характер графіків залежності інтенсивності флуоресценції від концентрації сквараїнів **SqO3** і **SqCN3** (рис. 3.8 (д)) свідчить, що число місць зв'язування ( $N$ ) на молекулі БСА з цими барвниками наближається до  $N = 1$ . Тому усі наступні дослідження комплексоутворення з протеїнами проводились при концентрації барвників та протеїнів 1 мкМ.

### 3.3 Комплекси барвників з БСА

Реєстрацію утворення комплексів „барвник–БСА” здійснювали за допомогою спектрофотометру, порівнюючи спектри поглинання барвників у водному розчині буфера у присутності та відсутності БСА. Наявність комплексу визначалася за зміною положення максимуму і/або форми смуги поглинання та зростанням квантового виходу. Всі вимірювання проводили у РВ при концентрації БСА і барвників, що дорівнювала 1 мкМ.

Виявилось, що гідрофобні барвники **SqB1**, **SqCN1** і **nor-SqCN1**, які містять сильно полярні групи в сквараїновому фрагменті та не мають сульфогруп, значно агрегують в комплексі з БСА (рис 3.9). Про це свідчить значне збільшення напівширини спектрів барвників у присутності БСА та зростання поглинання на смузі агрегації. Таким чином, мікросередовище протеїну не є достатньо гідрофобним, щоб запобігти агрегації цих барвників у комплексах.

Гідрофільні сквараїни **SqO2**, **SqB2** та норсквараїни **nor-SqO2**, **nor-SqB2**, навпаки, майже не змінюють свої спектральні характеристики у присутності 1 мкМ БСА, тобто комплексоутворення з протеїном не відбувається (рис 3.10). Це пояснюється наявністю двох сульфогруп в індоленінових фрагментах цих барвників, які не дозволяють їм ефективно взаємодіяти з протеїном [125].

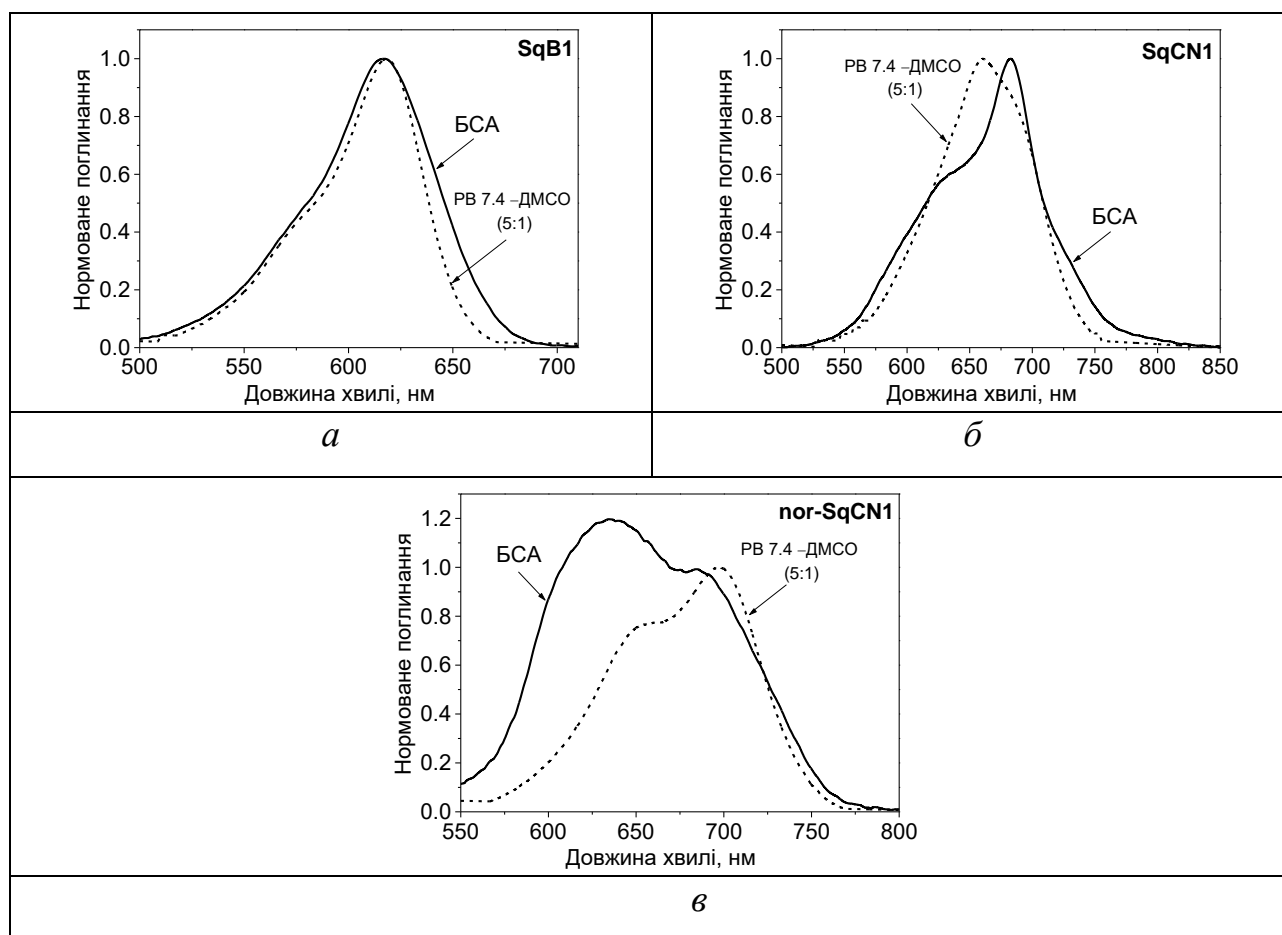


Рисунок 3.9 Нормовані спектри поглинання сквараїнових барвників **SqB1** (а), **SqCN1** (б) та **nor-SqCN1** (в) у суміші розчинників РВ-ДМСО (5:1) та у комплексі з БСА,  $c_{\text{барвника}}=1\text{мкМ}$ ,  $c_{\text{БСА}}=1\text{мкМ}$

Найбільшу здатність до утворення протеїнових комплексів без ознак агрегації, виявили **SqO1**, **nor-SqO1**, які не містять сульфогруп, **SqCN2** і **nor-SqCN2** з двома сульфогрупами, **SqO3** і **SqCN3**, які частково гідрофільні за рахунок однієї карбоксильної групи та стирил **Styryl** (рис. 3.11, табл. 3.1).

Максимуми поглинання **SqO1** та **nor-SqO1** після утворення комплексу з БСА зсуваються, відповідно, на 15 нм і 16 нм у довгохвильову область (рис. 3.11 (а, б)) [123]. Квантовий вихід **SqO1**-БСА становить 22%, що дещо менше ніж 27 % для **nor-SqO1**-БСА (табл. 3.1).

Диціанометиленові **SqCN2** і **nor-SqCN2** в комплексах також мають довгохвильові зсуви максимумів поглинання, які становлять, відповідно, 10 нм та 12 нм (рис. 3.11 (в, г)).

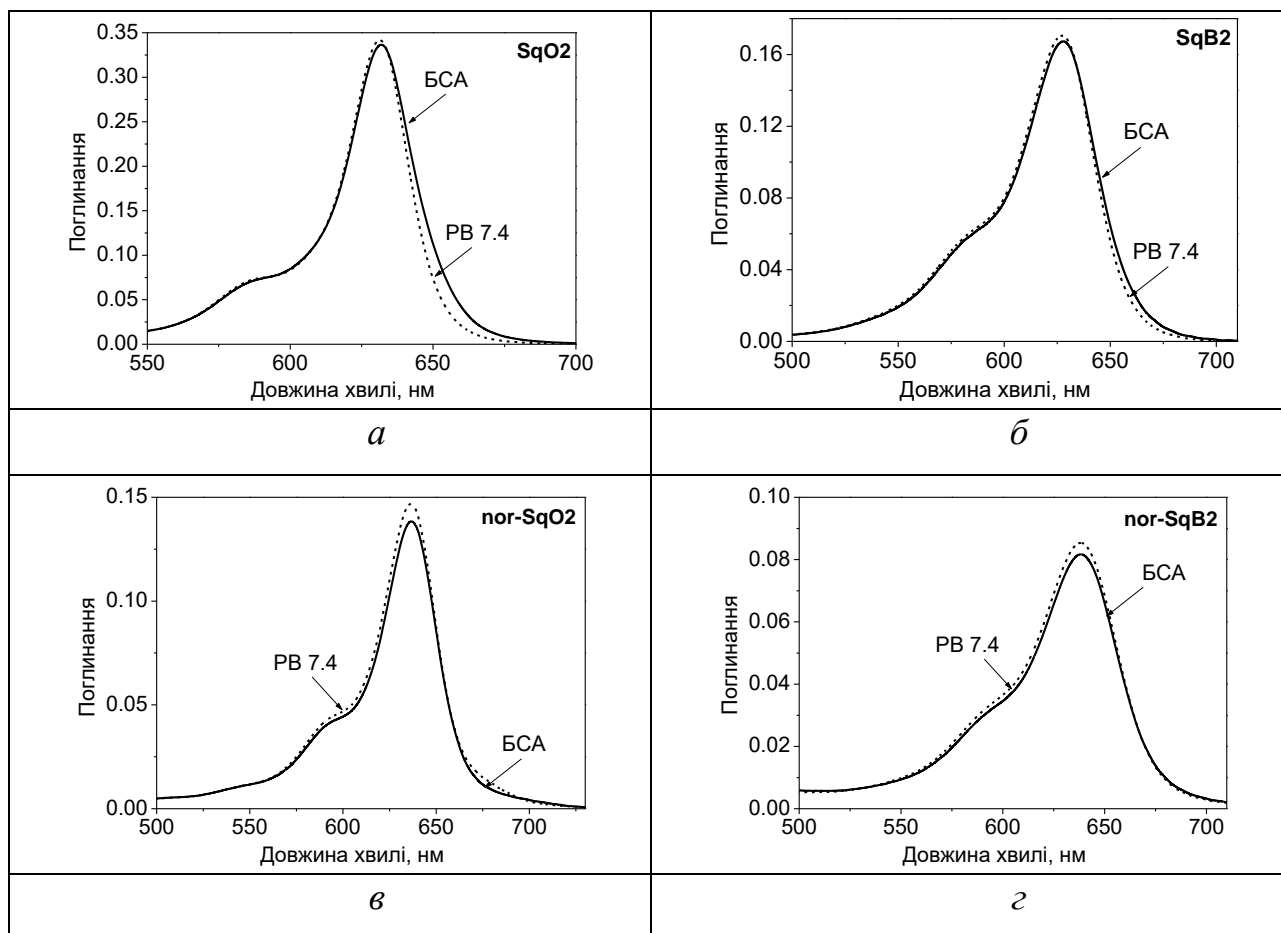
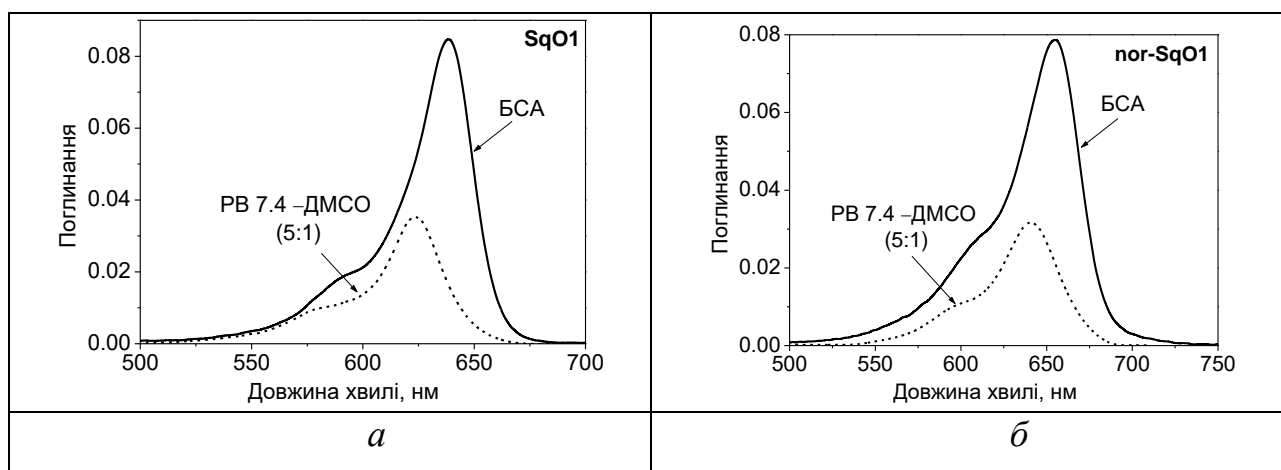


Рисунок 3.10 Спектри поглинання барвників **SqO2** (а), **SqB2** (б), **nor-SqO2** (в) та **nor-SqB2** (г) в РВ 7.4 і в комплексі з БСА,  $c_{\text{барвника}}=1\text{мкМ}$ ,  $c_{\text{БСА}}=1\text{мкМ}$

Барвник **nor-SqCN2** в комплексі з БСА переходить у депротоновану форму [125], через це його коефіцієнт екстинкції зменшується у 2.6 рази та становить лише  $46300\text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ . Для **SqCN2** коефіцієнт екстинкції в комплексі також зменшується до  $134400\text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$  (табл. 3.1).



## Продовження рисунку 3.11

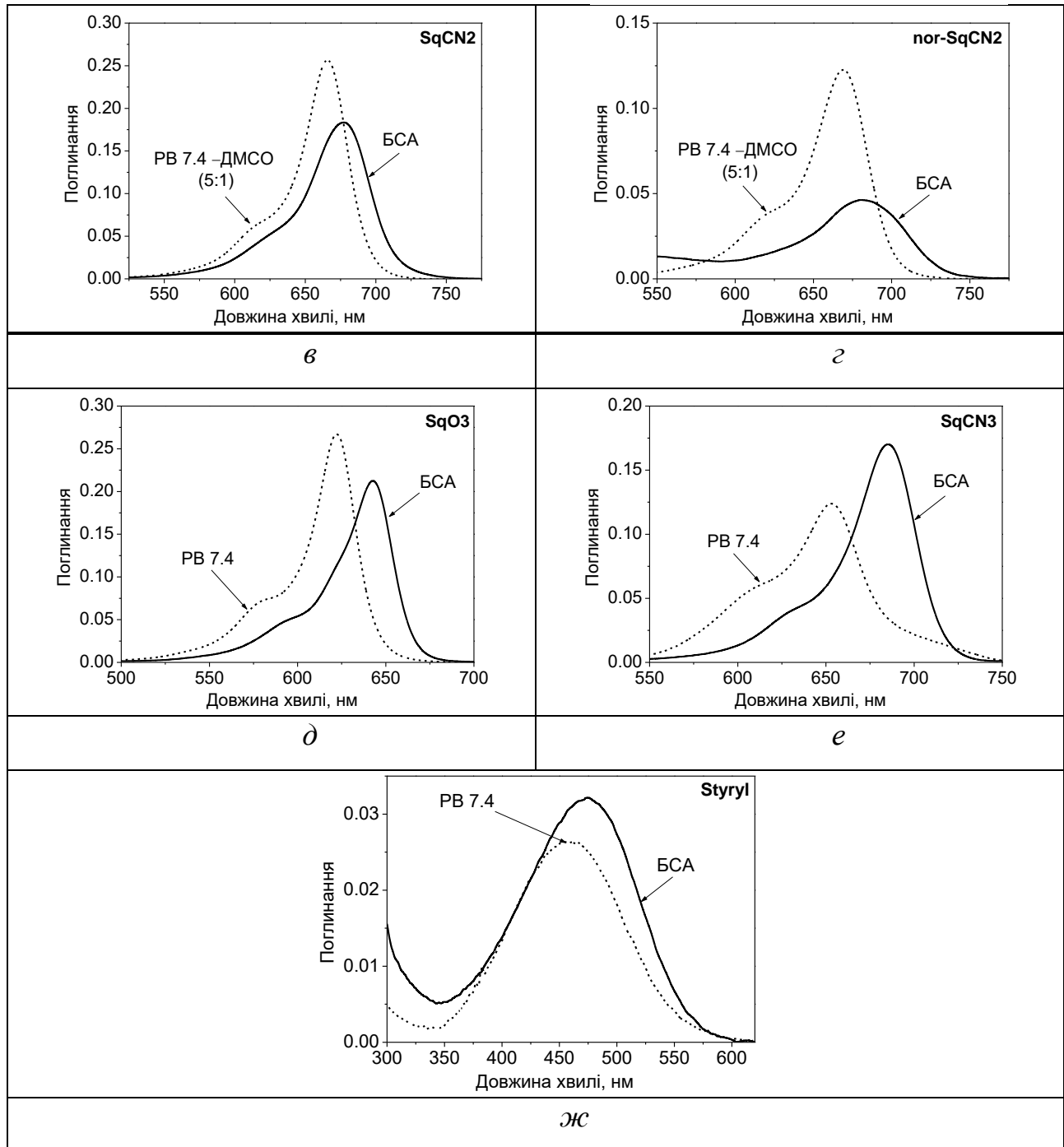


Рисунок 3.11 Спектри поглинання барвників **SqO1** (а), **nor-SqO1** (б), **SqCN2** (в) **nor-SqCN2** (г) в суміші розчинників РВ-ДМСО (5:1) та в комплексі з БСА, спектри поглинання **SqO3** (д) **SqCN3** (е) і **Styryl** у РВ 7.4 та у комплексі з БСА,  $c_{\text{барвника}}=1\text{мкМ}$ ,  $c_{\text{БСА}}=1\text{мкМ}$

Смуга поглинання **SqO3** у комплексі з БСА становить 642 нм, що на 20 нм більше, ніж у РВ (рис. 3.11 (д)) [128]. Після утворення комплексу квантовий вихід барвника зростає у  $\sim 14$  разів та становить 26%, а коефіцієнт екстинкції, хоча і зменшується, залишається досить великим та сягає  $215000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Скварайн **SqCN3** агрегує у водному розчині буфера (розділ 2, рис. 3.11 (e)), проте у комплексі барвник переходить до мономерної форми, через це його квантовий вихід значно зростає, з 1% у РВ до 47% у комплексі з БСА, а коефіцієнт екстинкції збільшується до  $162000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [128].

Таблиця 3.1

**Спектральні та фотофізичні характеристики барвників в комплексах з БСА**  
( $c_{\text{барвника}} = 1 \text{ мкМ}$ ,  $c_{\text{БСА}} = 1 \text{ мкМ}$ )

Барвник	Середовище	$\lambda_{\text{макс.}}$ (Погл.), нм	$\lambda_{\text{макс.}}$ (Фл.), нм	$\epsilon$ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\Phi_{\text{F}}$ , %
<b>SqO1</b>	РВ-ДМСО (5:1)	624	635	92000	3
	БСА	639	648	203000	22
<b>nor-SqO1</b>	РВ-ДМСО (5:1)	639	659	92000	13
	БСА	655	669	200000	27
<b>SqCN2</b>	РВ	667	685	188000	7
	БСА	677	698	134400	24
<b>nor-SqCN2</b>	РВ	670	693	123000	19
	БСА	682	713	46300	13
<b>SqO3</b>	РВ	622	632	285000	1.9
	БСА	642	652	215000	26
<b>SqCN3</b>	РВ	654	670	138000	1
	БСА	684	706	162000	47
<b>Styryl</b>	РВ	456	615	н/в*	<1
	БСА	474	598	42400	13

\* не визначали

Для стирилового барвника при утворенні комплексу з протеїном також змінюється максимум поглинання, з 474 нм у РВ до 456 нм. При цьому квантовий вихід барвника значно зростає, та сягає 13% [146].

Таким чином, утворення комплексів барвник-протеїн супроводжується зміною спектральних та фотофізичних характеристик барвників. При утворенні комплексів відбувається довгохвильовий зсув (від 10 до 36 нм) спектральних смуг барвників, відносно смуг вільних барвників у РВ, при цьому їх квантові виходи зростають (таб. 3.1).

Використовуючи схему відбору барвників ми відібрали барвники, що задовольняють запропонованому методу. Барвники, що агрегують (**SqB1**, **SqCN1**, **nor-SqCN1**), або взагалі не утворюють комплексів з БСА (**SqO2**, **SqB2**, **nor-SqO2** та **nor-SqB2**) для подальших досліджень ми не використовували. Також ми виключили **SqCN2** та **nor-SqCN2**, оскільки ці барвники мають найбільш довгохвильові максимуми поглинання і у FRET-парах можуть використовуватися лише в якості акцепторів, а зменшення їх коефіцієнту екстинкції після зв'язування з БСА призведе до зменшення інтегралу перекривання барвників і зниженню чутливості всієї системи. Таким чином, для подальших досліджень були обрані барвники **SqO1**, **nor-SqO1**, **SqO3**, **SqCN3** та **Styryl**.

### 3.4 Спектральні властивості комплексів барвників з протеїнами

Для з'ясування впливу будови, молекулярної маси протеїну та наявності зв'язаних з протеїном низькомолекулярних сполук на взаємодію з барвниками ми дослідили комплексоутворення **SqO3**, **SqCN3** та **Styryl** з шістьма модельними протеїнами: бичачим сироватковим альбуміном (БСА) і сироватковим альбуміном людини (САЛ), що не містять жирних кислот, а також бичачим сироватковим альбуміном і сироватковим альбуміном людини з жирними кислотами (відповідно БСАж і САЛж), пероксидазою хрону (ПХ) та лізоцимом, які різняться за структурою та фізико-хімічними властивостями.

Глобулярні протеїни БСА і САЛ з молекулярною вагою ~66000 Да [147], належать до класу альбумінів, не мають ферментативної активності та майже однакові за будовою, відрізняючись тільки наявністю двох триптофанів у БСА і лише одним у САЛ [148]. Найбільш важливою їх біологічною функцією є транспортування жирних кислот, ліків та інших речовин, за рахунок утворення комплексів [149]. Незважаючи на майже однаковий амінокислотний склад, фізико-хімічні властивості цих протеїнів, їх стійкість до денатуруючих агентів та здатність до утворення комплексів з барвниками відрізняються [148, 150, 41]. Тому, в першу чергу, ці протеїни були обрані для перевірки чутливості донорно-акцепторних пар барвників до різних протеїнів. Використання БСА та САЛ з жирними кислотами, було обумовлено необхідністю вивчення конкурентного зв'язування з активними центрами альбумінів. Відомо, що утворення комплексів альбумінів з жирними кислотами відбувається у гідрофобних кишнях [151], тобто присутність жирних кислот може завадити утворенню комплексів барвників з протеїнами, та, порівнюючи з очищеними альбумінами, змінити спектральний відгук в системі „барвник-протеїн-барвник”.

На відміну від альбумінів, пероксидаза хрому — це фермент рослинного походження з молекулярною вагою 40000 Да [152] та атомом заліза в активному центрі і двома центрами зв'язування кальцію [153]. Фермент широко використовують в імунологічних тестах [154, 155], біосенсорах [156, 157, 158], генній терапії [159, 160], органічному синтезі [161, 162] та інше.

Лізоцим – це невеликий (~15000 кДа) високо катіонний фермент, поширений у тканинах ссавців. Лізоцим має антибактеріальну активність, спричинену гідролізом 1-4 глікозидних зв'язків між N-ацетилмураміною кислотою та N-ацетилглюкозаміном грампозитивних бактерій [163], через що застосовується у фармацевтичній галузі та харчових продуктах. У медико-біологічних дослідженнях лізоцим широко використовується для вивчення амілоїдних фібрил [164, 165]. Цей протеїн був обраний через його малий розмір, для перевірки граничних умов застосування запропонованого методу.

В першу чергу ми дослідили залежність спектральних та фотофізичних властивостей барвників від протеїну з яким вони утворюють комплекс (таб. 3.3).

Таблиця 3.2

**Спектральні та фотофізичні характеристики комплексів барвників з протеїнами у РВ ( $c_{\text{барвника}} = 1 \text{ мкМ}$ ,  $c_{\text{протеїну}} = 1 \text{ мкМ}$ )**

Барвник	Середовище	Поглинання			Флуоресценція			$\nu_{\text{st}}$ , см <sup>-1</sup>
		$\lambda_{\text{макс}}$ , нм	$\Delta\nu_{1/2}$ , см <sup>-1</sup>	$\epsilon$ , М <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup>	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм	$\Delta\nu_{1/2}$ , см <sup>-1</sup>	$\Phi_{\text{F}}$ , %	
<b>SqO3</b>	РВ	622	760	285000	632	760	1.9	250
	Сечовина 7М	627	720	276100	638	730	4.6	280
	БСА	642	860	215000	655	770	26	310
	БСАж	642	860	215000	655	770	25	310
	САЛ	637	850	241000	649	730	48	290
	САЛж	635	980	213000	649	730	37	340
	ПХ	624	1150	144000	652	800	14	610
	Лізоцим	622	730	285000	634	770	2	310
<b>SqCN3</b>	РВ	654	1250	138000	670	850	1	370
	Сечовина 7М	660	880	184700	675	890	3.2	340
	БСА	684	900	162000	706	860	47	460
	БСАж	687	860	162000	708	860	49	430
	САЛ	686	860	180000	707	870	61	430
	САЛж	686	900	180000	706	900	54	420
	ПХ	679	1170	85000	705	890	30	540
	Лізоцим	654	2300	114000	670	880	<1	390
<b>Styryl</b>	РВ	456	5800	15700	615	2460	<1	5670
	Сечовина 7М	465	5700	17700	615	3080	1.7	5250
	БСА	474	5340	32700	598	2540	13	4370
	БСАж	468	5680	30000	593	2540	8	4500
	САЛ	486	5300	30200	601	2300	13	3930
	САЛж	486	5300	33500	601	2300	15	3930
	ПХ	467	7550	26300	596	2540	5	4640
	Лізоцим	456	6040	12300	618	2340	<1	5770

\* не визначали

Спектральні характеристики оксоквараїна **SqO3** у комплексах з БСА та БСАж не відрізняються, максимума поглинання та флуоресценції для обох комплексів знаходяться, відповідно, при 642 нм та 655 нм, а Стоксів зсув становить 310 см<sup>-1</sup>. Напівширини комплексів поглинання та випромінювання дорівнюють, відповідно, 860 см<sup>-1</sup> та 770 см<sup>-1</sup>. Коефіцієнти екстинкції барвника у комплексах **SqO3**-БСА і **SqO3**-БСАж однакові та становлять 215000 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>.



Квантові виходи комплексів відрізняються лише у межах похибки та складають 26% для **SqO3**-БСА і 25% для **SqO3**-БСАж. Таким чином, наявність жирних кислот не впливає на утворення комплексів **SqO3** з альбумінами бика.

Відносно комплексів з бичачим альбуміном, **SqO3** у комплексах з САЛ і САЛж має більш короткохвильові максимуми поглинання і випромінювання. Спектр поглинання **SqO3**-САЛ має максимум при 637 нм і напівширину  $850 \text{ см}^{-1}$ . Смуга поглинання **SqO3**-САЛж зміщена у короткохвильову область на 2 нм і складає 635 нм, при цьому збільшується поглинання на 590 нм (плече) та напівширина спектру. Спектри випромінювання **SqO3**-САЛ і **SqO3**-САЛж мають однаковий максимум 649 нм і напівширину спектру  $730 \text{ см}^{-1}$  (табл. 3.3, рис. 3.12).

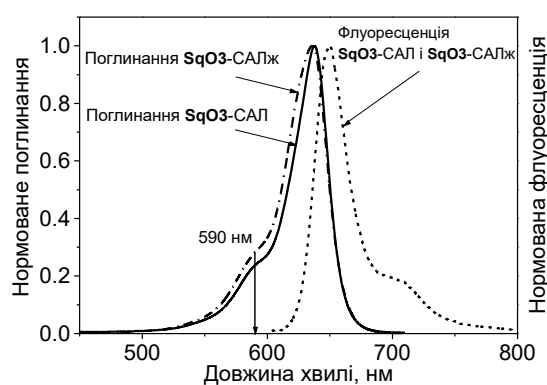


Рисунок 3.12 Спектри поглинання та флуоресценції комплексів **SqO3** з САЛ та САЛж ( $c_{\text{sqo3}}=1 \text{ мкМ}$ ,  $c_{\text{САЛ}}=1 \text{ мкМ}$ ,  $c_{\text{САЛж}}=1 \text{ мкМ}$ )

Таким чином, **SqO3** агрегує в комплексах з альбумінами людини, при цьому ступінь агрегації барвника в комплексі **SqO3**-САЛж вища за **SqO3**-САЛ. Це відбувається через наявність жирних кислот в САЛж, які ускладнюють утворення комплексу. Через утворення агрегатів квантовий вихід **SqO3** зменшується з 48% у САЛ до 37% у САЛж. Коефіцієнт екстинкції **SqO3**-САЛ дорівнює  $241000 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ , а для **SqO3**-САЛж  $213000 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ .

В комплексі з ПХ **SqO3** поглинає при 624 нм і випромінює при 652 нм. Максимум поглинання 624 нм **SqO3**-ПХ, майже дорівнює максимуму 622 нм поглинанню вільного барвника у РВ, що, враховуючи значне порушення правила Льовшина (табл. 3.3, рис.3.13), свідчить про знаходження значної частини барвника у РВ, а не у комплексі з протеїном. До спектральних проявів комплексоутворення **SqO3** з ПХ відноситься невелике плече у

спектрі поглинання при  $\sim 642$  нм (рис. 3.13). Оскільки значна частина **SqO3** знаходиться у РВ, **SqO3**-ПХ має невеликий квантовий вихід 14% та коефіцієнт екстинкції  $144000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

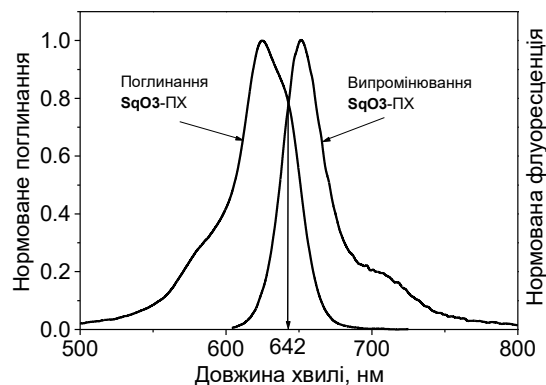


Рисунок 3.13 Нормовані спектри поглинання та флуоресценції комплексу **SqO3** з ПХ ( $c_{\text{SqO3}}=1 \text{ мкМ}$ ,  $c_{\text{ПХ}}=1 \text{ мкМ}$ )

Скварайн **SqO3** не виявляє значних спектральних змін при утворенні комплексу з лізоцимом, що скоріш за все це пов'язано з малими розмірами протеїну.

Спектральні властивості комплексів **SqCN3** з альбумінами бика та людини дуже схожі. Максимуми поглинання знаходяться від 684 нм до 687 нм, а максимуми флуоресценції в межах 706-708 нм. Спектри поглинання і випромінювання комплексів **SqCN3** з альбумінами дзеркально симетричні, з напівширинами  $860\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$  і Стоксовими зсувами  $420\text{-}460 \text{ cm}^{-1}$ , та не виявляють ознак агрегації барвника. Квантові виходи **SqCN3** в комплексі з БСА і БСАж складають, відповідно, 47% і 49%. У присутності САЛ і САЛж квантові виходи **SqCN3** значно більші, та становлять, відповідно, 61% і 54%. Коефіцієнти екстинкції комплексів **SqCN3** з бичачими альбумінами дорівнюють  $162000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Комплекси **SqCN3** з альбумінами людини мають дещо більші значення коефіцієнтів екстинкції, які становлять  $180000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

У порівнянні з альбумінами комплекс **SqCN3**-ПХ має більш короткохвильові максимуми поглинання і флуоресценції, відповідно, 679 нм та 705 нм. Напівширина спектру поглинання, більша за напівширину спектра флуоресценції  $890 \text{ cm}^{-1}$  і становить  $1170 \text{ cm}^{-1}$ , що вказує на наявність двох форм, які відповідають знаходженню барвника у водній та протеїновій фазі (рис. 3.14).

Стоксів зсув **SqCN3**-ПХ більший за альбумінові комплекси та сягає  $540 \text{ см}^{-1}$ , проте квантовий вихід **SqCN3**-ПХ є досить великим та складає 30%. У порівнянні з альбуміновими комплексами, коефіцієнт екстинкції **SqCN3**-ПХ майже у два рази менший та становить  $85000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

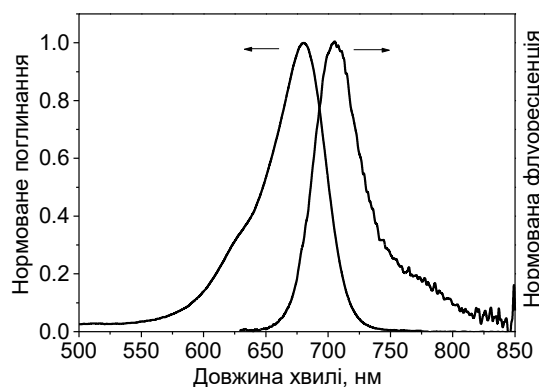


Рисунок 3.14 Нормовані спектри поглинання та флуоресценції комплексу **SqCN3** з ПХ ( $c_{\text{SqCN3}}=1 \text{ мкМ}$ ,  $c_{\text{ПХ}}=1 \text{ мкМ}$ )

В комплексі з лізоцимом **SqCN3** максимуми поглинання та флуоресценції не відрізняються від таких для вільного барвника у РВ та становлять, відповідно, 654 нм і 670 нм. У присутності лізоциму барвник значно агрегує, навіть більше ніж у РВ (рис. 3.15), через що його квантовий вихід становить менше 1% (табл. 3.3).

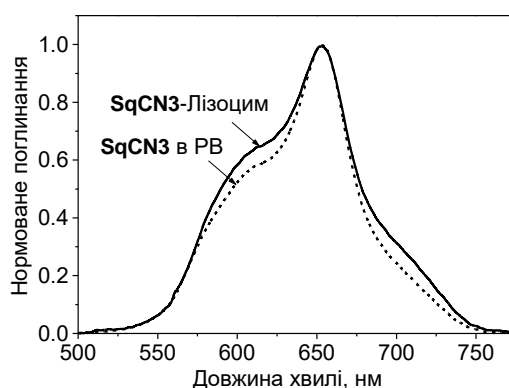


Рисунок 3.15 Нормовані спектри поглинання **SqCN3**–лізоцим та вільного **SqCN3** у РВ ( $c_{\text{SqCN3}}=1 \text{ мкМ}$ ,  $c_{\text{лізоцим}}=1 \text{ мкМ}$ )

Спектри поглинання протеїнових комплексів **Styryl** являють собою широку безструктурну смугу напівширина якої приблизно в 2 рази більша, ніж для спектрів випромінювання. Таке порушення дзеркальної симетрії може бути

пов'язано не тільки з агрегацією барвника, але також і з різною геометрією барвника в основному та збудженому стані [166].

Форма спектральних смуг **Styryl**-БСА та **Styryl**-БСАЖ майже не відрізняються, однак, спектри **Styryl**-БСАЖ, відносно спектрів **Styryl**-БСА, зсунуті у короткохвильову область на  $\sim 5$  нм (рис. 3.16, табл. 3.3). При цьому напівширина спектру поглинання збільшується з  $5340 \text{ см}^{-1}$  для **Styryl**-БСА до  $5680 \text{ см}^{-1}$  для БСАЖ, в той час як напівширини спектрів флуоресценції збігаються та становлять  $2540 \text{ см}^{-1}$ . Таким чином, в комплексі **Styryl**-БСАЖ барвник знаходиться в менш гідрофобному оточенні, ніж в комплексі з БСА, що можна пояснити наявністю жирних кислот, які запобігають утворенню комплексу. Це призводить до збільшення енергетичних втрат барвника, через що Стоксів зсув **Styryl**-БСАЖ більший за **Styryl**-БСА, а квантовий вихід навпаки менший (табл. 3.3).

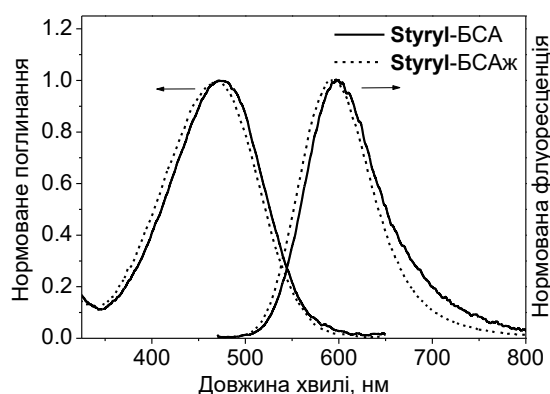


Рисунок 3.16 Нормовані спектри поглинання комплексів **Styryl**-БСА та **Styryl**-БСАЖ ( $c_{\text{Styryl}}=1 \text{ мкМ}$ ,  $c_{\text{БСА}}=1 \text{ мкМ}$ ,  $c_{\text{БСАЖ}}=1 \text{ мкМ}$ )

Спектральні властивості комплексів **Styryl**-САЛ і **Styryl**-САЛЖ, повністю співпадають, смуги поглинання і випромінювання знаходяться відповідно, при 486 нм і 601 нм. Напівширини спектрів також збігаються та становлять  $5300 \text{ см}^{-1}$  для поглинання і  $2300 \text{ см}^{-1}$  для флуоресценції. З чого можна зробити висновок, відносно бичачих альбумінів, **Styryl** в комплексах з альбумінами людини знаходиться в більш гідрофобному оточенні [146], а наявність жирних кислот не впливає на утворення комплексу. Знаходження барвника у гідрофобному середовищі призводить до зменшення Стоксового зсуву, який як для **Styryl**-САЛ

так і для **Styryl**-САЛЖ становить  $3930 \text{ см}^{-1}$ , та збільшенню квантових виходів, які сягають, відповідно, 13% і 15%.

Комплекс **Styryl**-ПХ має максимуми поглинання при 467 нм і флуоресценції при 596 нм, які наближаються до спектральних максимумів барвника у РВ. Через гідрофільне оточення **Styryl**, його Стоксів зсув більший ніж у комплексів з альбумінами та становить  $4640 \text{ см}^{-1}$ , а квантовий вихід сягає лише 5%. Оскільки, ПХ це залізовмісний протеїн, у спектрі його поглинання присутня смуга Соре (характерна смуга поглинання порфіринів) з максимумом 403 нм, яка перекривається зі смугою поглинання барвника, що призводить до значного збільшення напівширини поглинання **Styryl**-ПХ до  $7550 \text{ см}^{-1}$ , при цьому напівширина спектра флуоресценції, як і у випадку комплексів з альбумінами бика, дорівнює  $2540 \text{ см}^{-1}$ .

Максимум поглинання комплексу **Styryl**-лізоцим співпадає з максимумом поглинання вільного барвника у РВ і становить 456 нм. Однак, максимум флуоресценції комплексу 618 нм, на 3 нм більш довгохвильовий ніж у буфері. Напівширина спектру поглинання сягає  $6040 \text{ см}^{-1}$ , проте напівширина спектру флуоресценції дорівнює  $2340 \text{ см}^{-1}$ . Таким чином, **Styryl** в комплексі з лізоцимом знаходиться в гідрофільному оточенні та зазнає значної агрегації. Через це Стоксів зсув комплексу становить  $5770 \text{ см}^{-1}$ , а квантовий вихід менше 1%.

Таким чином, наявність жирних кислот запобігає утворенню комплексів з БСАЖ для барвника **Styryl**, однак не заважає для сквараїнів **SqO3** та **SqCN3**. В альбуміні людини жирні кислоти зменшують комплексоутворення з **SqO3** та **SqCN3**, проте не впливають на зв'язок з **Styryl**. В комплексі **SqO3**-ПХ більшість барвника знаходиться у водній фазі, а з лізоцимом барвники взагалі не утворюють комплексів квантовий вихід яких перевищує 2%.

### 3.5 Вплив сечовини на спектральні властивості барвників

Для контрольованої денатурації третинної структури протеїнів, ми використовували сечовину в кількості від 1 до 7 М, яка широко використовується у біологічних дослідженнях пов'язаних з конформаційними

змінами біомолекул [167, 168]. У розчинах сечовини з концентрацією від 1 до 7 М відбувається поступове розгортання третинної структури протеїнів, яке збільшується зі зростанням концентрації сечовини [169, 170]. Це призводить до зменшення упорядкованої компактної структури макромолекул [171, 172] та зростанню сольватації неполярних областей [173, 174]. Таким чином, молярність розчину сечовини відповідає різному ступеню конформаційних змін протеїну, які умовно можна поділити на малі (0–2 М), середні (3–4 М) та значні (5–7 М) зміни.

Ми передбачили, що можлива безпосередня взаємодія сечовини з барвниками, яка може призвести до руйнування молекули барвників, внаслідок незворотних хімічних реакцій з можливістю утворення різних типів самоасоціатів молекул сечовини у водних розчинах [175], які по-різному впливають на полярність та гідрофобно-гідрофільні властивості середовища, чи утворення комплексів "барвник—сечовина" завдяки водневим зв'язкам, або іншим специфічним взаємодіям [170]. Все це може призводити до зміни спектрально-люмінесцентних характеристик барвників, однак для реалізації цілей даної роботи необхідно відокремлювати флуоресцентний відгук барвників від змін у протеїнах під впливом сечовини та безпосереднього впливу сечовини на барвники. Таким чином, перш за все нами було вивчено вплив сечовини на спектрально-люмінесцентні властивості вільних барвників.

Оскільки **SqO3** і **SqO4** та **SqCN3** і **SqCN4** мають однакову хромофорну систему, дослідження впливу сечовини на сквараїни проводили тільки для **SqO3** та, **SqCN3**, гідрофобні властивості яких дозволяють вивчити вплив сечовини на утворення агрегатів барвників.

Виявилось, що присутність сечовини в кількості до 7 М для барвника **SqO3** змінює положення максимумів поглинання та флуоресценції на 5 нм у довгохвильову область, які становлять 627 нм при 7 М сечовини, при цьому величина абсорбції майже не змінюється (рис. 3.17 (а, в)).

Максимум флуоресценції також зсувається батохромно і в 7 М сечовини становить 638 нм, а інтенсивність флуоресценції зростає у 1.5 рази (рис. 3.17 (б, з)).

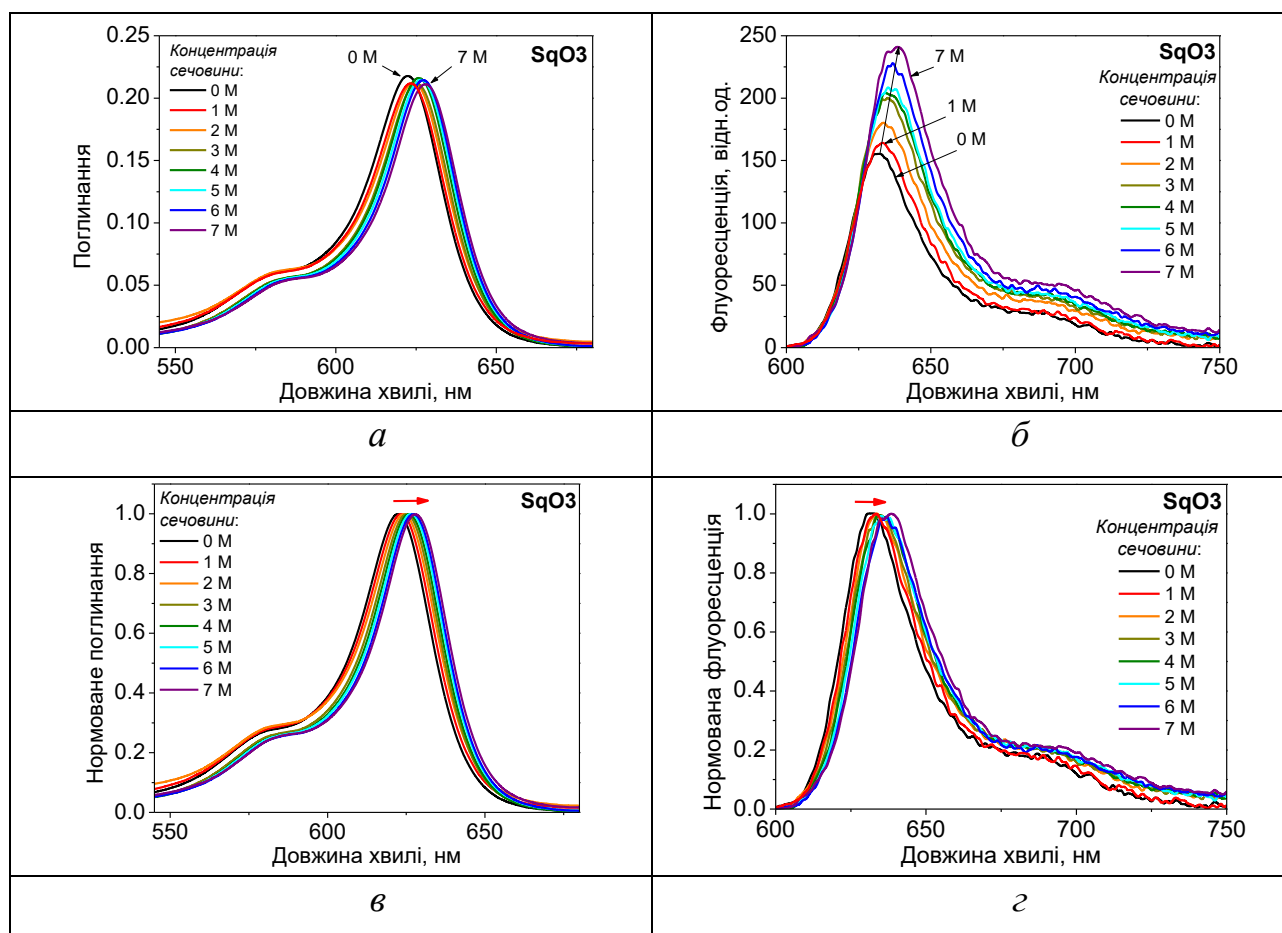


Рисунок 3.17 Спектри поглинання (*a*) і флуоресценції (*б*) та нормовані спектри поглинання (*в*) і флуоресценції (*г*) **SqO3** в розчинах сечовини ( $c_{\text{SqO3}}=1$  мкМ,  $c_{\text{сечовини}}=0-7\text{М}$ )

Наявність сечовини не впливає на форму та напівширину спектрів поглинання барвника, що виключає сольватаційні ефекти пов'язані з агрегацією. Тем не менш, довгохвильовий зсув спектральних смуг вказує на те, що сечовина змінює полярність та гідрофобно-гідрофільні характеристики водного середовища, в якому розчинено барвник [128].

Істотно більше під впливом сечовини змінює свої властивості **SqCN3** (рис. 3.18).

Як і у випадку **SqO3**, при збільшенні концентрації сечовини спектри поглинання та флуоресценції **Sq CN3** мають довгохвильовий зсув на 6 нм та 5 нм і становлять, відповідно 660 нм і 675 нм. При цьому інтенсивність спектральних смуг зростає в 1.3 рази для поглинання та у 2.3 рази для флуоресценції. Проте, на відміну від оксоквараїну, напівширина смуги поглинання **SqCN3** зменшується з  $1250\text{ см}^{-1}$  у РВ до  $900\text{ см}^{-1}$  у 7 М сечовини,

що пов'язано зі зменшенням агрегації цього барвника зі зростанням кількості сечовини у розчині (рис. 3.18 (в)) [128].

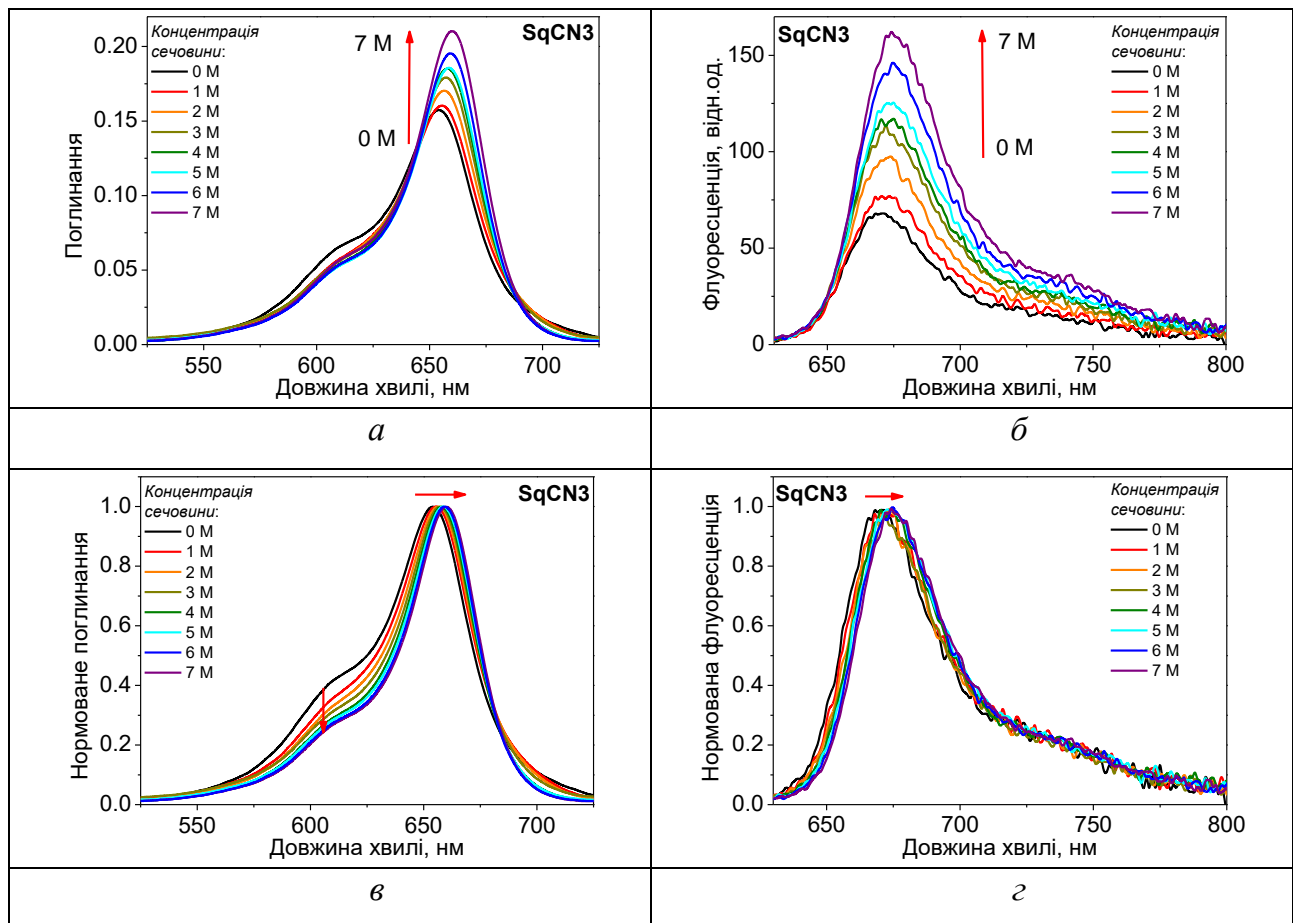


Рисунок 3.18 Спектри поглинання (а) і флуоресценції (б) та нормовані спектри поглинання (в) і флуоресценції (г) **SqCN3** в розчинах сечовини ( $c_{\text{SqCN3}}=1$  мкМ,  $c_{\text{сечовини}}=0-7$ М)

Стириловий барвник також виявився чутливим до присутності сечовини у розчині (рис. 3.19). При переході від водного буфера до 7 М розчину сечовини, спектр поглинання **Styryl** зсувається батохромно на 9 нм, та сягає 465 нм, а спектр флуоресценції, навпаки, має незначний короткохвильовий зсув на  $\sim 2$  нм. При цьому, інтенсивності та напівширини як поглинання, так і випромінювання зростають, що вказує не тільки на збільшення агрегації барвника, а також і на наявність сольватаційних ефектів.

Таким чином, зміни положення та напівширин спектральних смуг барвників доводить, що сечовина може впливати не тільки на полярність та



гідрофобно-гідрофільні характеристики водного середовища в якому розчинено барвник, але ще й на ступінь агрегації барвника.

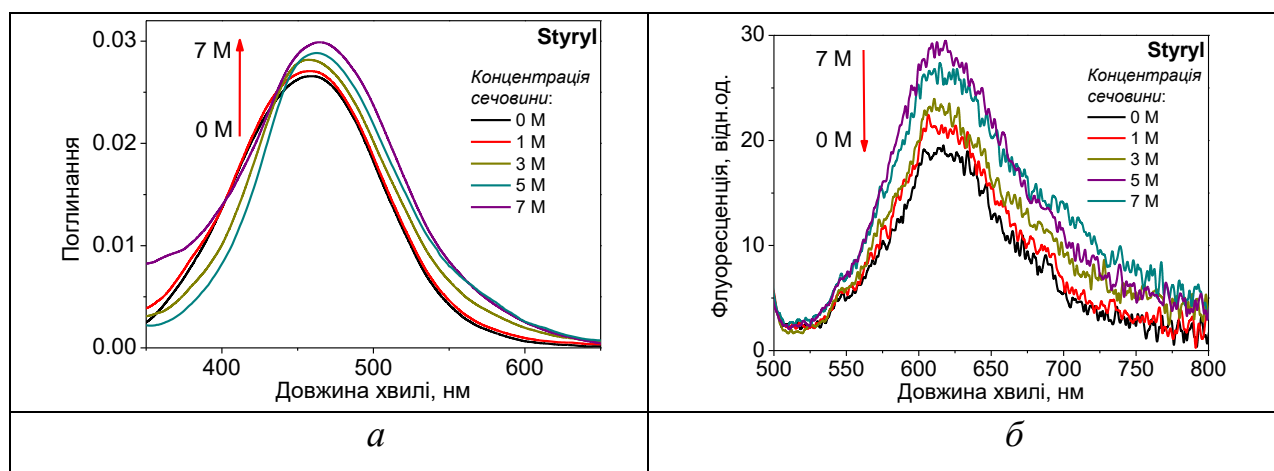


Рисунок 3.19 Спектри поглинання (а) і флуоресценції (б) **Styryl** в розчинах сечовини ( $c_{\text{Styryl}}=1 \text{ мкМ}$ ,  $c_{\text{сечовини}}=0-7\text{М}$ )

Однак, треба зауважити, що спектральні зміни, яких зазнають барвники у розчинах сечовини є набагато меншими, ніж, наприклад, при утворенні комплексів, тому в подальшому ми їх не враховували.

### 3.6 Вплив сечовини на спектральні властивості барвників у комплексах з протеїнами

Далі ми дослідили вплив сечовини на комплексоутворення сквараїнових барвників з БСА. Для цього до розчину БСА і сечовини в 10 мМ фосфатном буфері додавали розчин барвника. Було встановлено, що сечовина може змінювати спектрально-люмінесцентні характеристики цих комплексів — положення та інтенсивності спектральних смуг. Зміни цих характеристик залежать не тільки від концентрації сечовини, але й від терміну взаємодії барвника з БСА, тобто від часу, який пройшов з моменту додавання барвника до розчину БСА, що містить сечовину. Це пов'язано з тим, що встановлення термодинамічної рівноваги у системі "барвник—БСА" (формула 3.2) потребує певного часу. Тому, перш за все, було вивчено **кінетику взаємодії барвника з БСА при різних концентраціях сечовини** та визначено час, необхідний для встановлення рівноваги. Це дослідження проведено додаванням сквараїнів

**SqO3** та **SqCN3** ( $c_{\text{барвника}} \sim 1 \text{ мкМ}$ ) до розчину БСА ( $c_{\text{БСА}} = 1 \text{ мкМ}$ ) у фосфатному буфері (рН 7.4) та у розчинах сечовини з концентрацією від 1 до 7М.

Виявилося, що присутність низьких концентрацій сечовини потребує найбільший час на встановлення рівноваги, а збільшення концентрації сечовини прискорює цей процес. Такий висновок добре узгоджується з законом діючих мас у кінетиці, згідно з яким швидкість реакції пропорційна концентраціям компонентів, що реагують (формула 3.4), тобто концентраціям барвника ( $c_{\text{барвника}}$ ) і БСА ( $c_{\text{БСА}}$ ), які в цих експериментах залишалися постійними, та концентрації сечовини ( $c_{\text{сечовина}}$ ), що змінювалася.

$$v = k c_{\text{Барвника}} c_{\text{БСА}} c_{\text{Комплексх}} c_{\text{сечовина}}, \quad (3.4)$$

де  $k$  — константа швидкості реакції.

Дійсно, зміни у смугах поглинання сквараїна **SqO3** ( $c_{\text{sqo3}} = 1 \text{ мкМ}$ ) при утворенні комплексу з БСА ( $c_{\text{БСА}} = 1 \text{ мкМ}$ ) завершуються за 3–4 хвилини у відсутності сечовини (рис. 3.20 (а, б)), 1–2 хвилини при  $c_{\text{сечовина}} = 1 \text{ М}$  (рис. 3.20 (в, г)) і менше 1 хвилини при  $c_{\text{сечовина}} = 2 \text{ М}$  (рис. 3.20 (д, е)). Спектральні зміни полягають у невеликому підвищенні (у відсутності сечовини) або зменшенні при концентрації сечовини 1 М абсорбції, довгохвильовому зміщенні смуги поглинання і флуоресценції. При більших концентраціях сечовини характер спектральних змін у часі визначити не вдалося через їх високу швидкість.

При утворенні комплексу сквараїна **SqCN3** ( $c_{\text{sqcn3}} = 1 \text{ мкМ}$ ) з БСА ( $c_{\text{БСА}} = 1 \text{ мкМ}$ ) у відсутності сечовини спектральні зміни спостерігаються протягом 6 хвилин (рис. 3.21 (а, б)). При додаванні сечовини комплексоутворення прискорюється (рис. 3.21 (в–е)) і при концентрації сечовини 3 М завершується вже за 2–3 хвилини (рис. 3.21 (ж, з)).

Характер спектральних змін у часі залежить від вмісту сечовини (рис. 3.21). В усіх випадках спостерігається довгохвильове зміщення смуги поглинання і флуоресценції до 10 нм, але зростання спектральних смуг у

відсутності сечовини (рис. 3.21 (а, б)) поступово змінюється на зменшення при  $c_{\text{сечовини}} = 3 \text{ М}$  (рис. 3.21 (ж, з)).

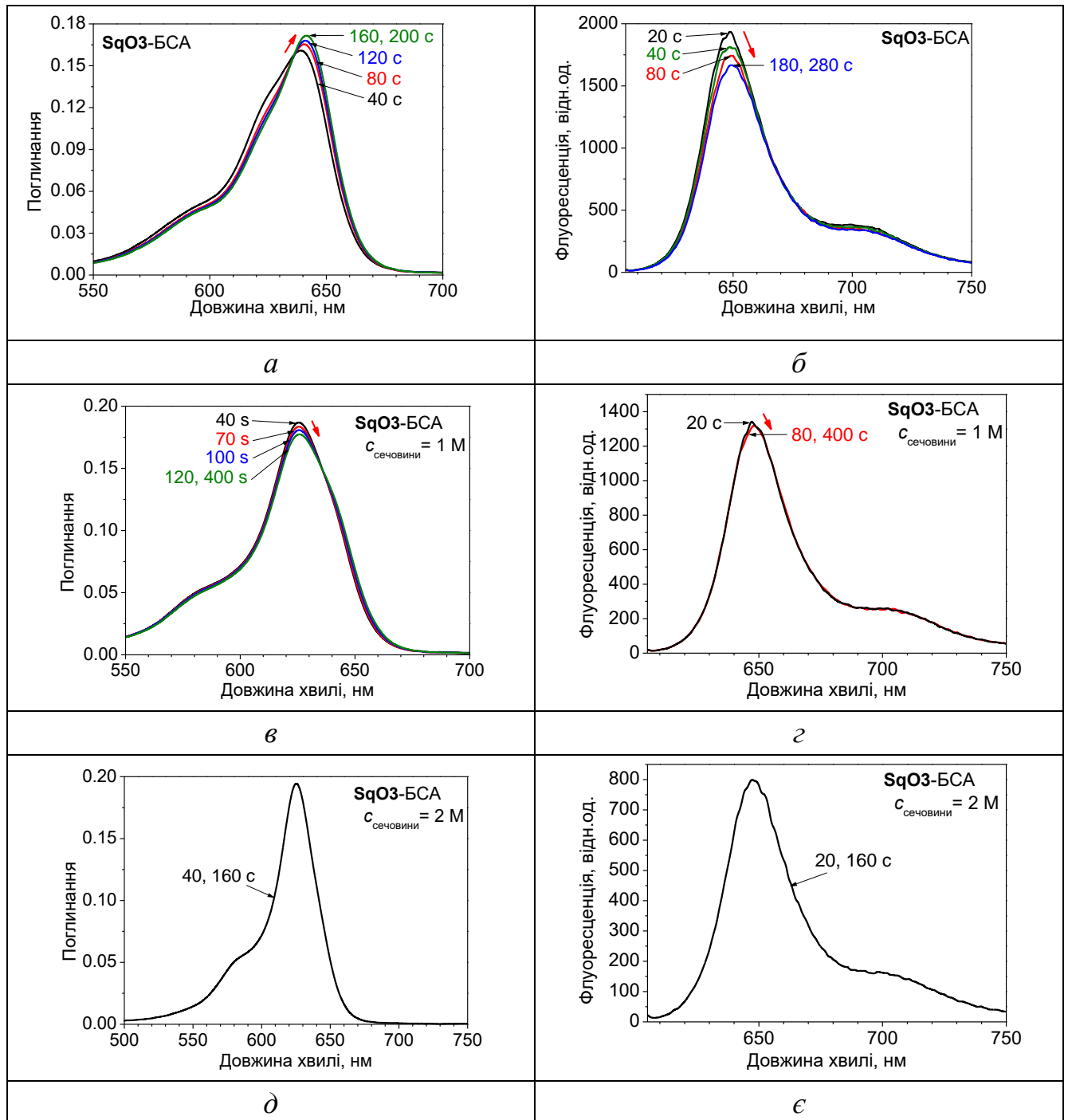
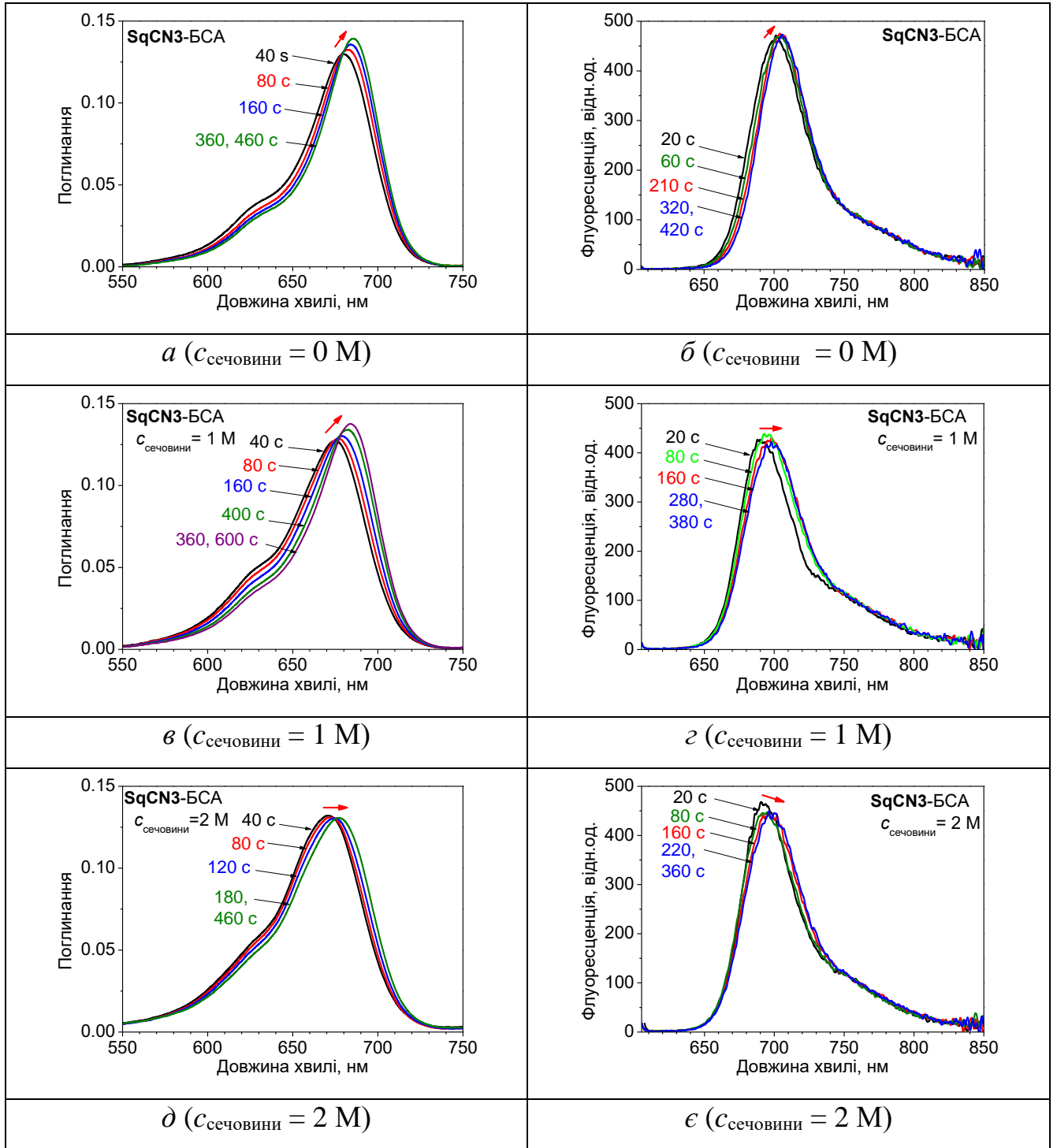


Рисунок 3.20 Зміни смуг поглинання (а, в, д) і флуоресценції (б, г, е) сквараїна **SqO3** ( $c_{\text{sqo3}} = 1 \text{ мкМ}$ ) при утворенні комплексу з БСА ( $c_{\text{бса}} = 1 \text{ мкМ}$ ) у часі у відсутності (а, б) та в присутності 1 М (в, г) і 2 М (д, е) сечовини



## Продовження рисунку 3.21

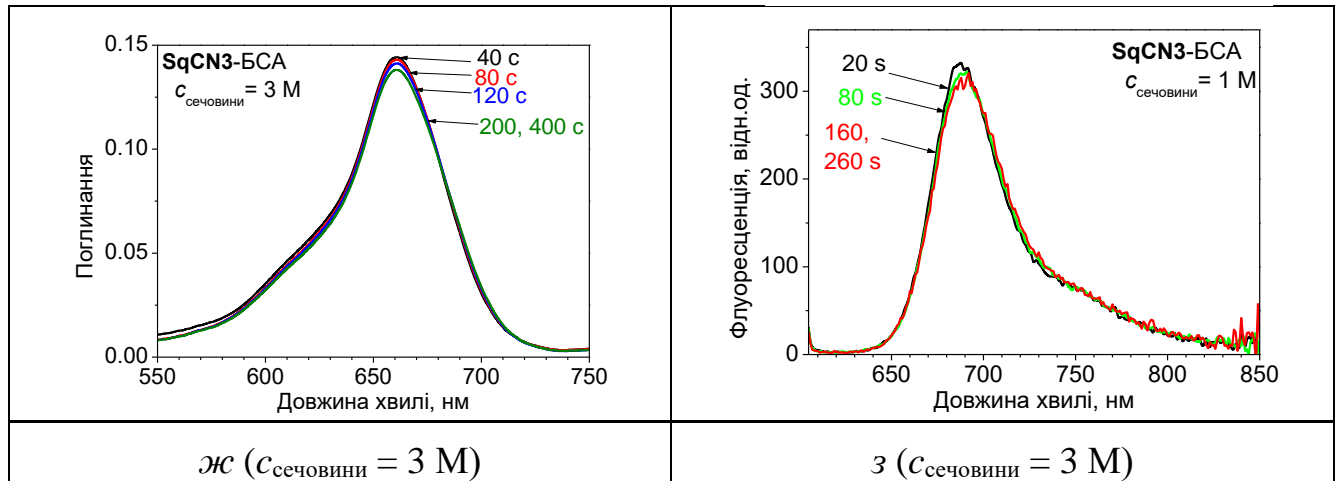


Рисунок 3.21 Зміни смуг поглинання і флуоресценції сквараїна **SqCN3** ( $c_{\text{барвника}} = 1 \mu\text{M}$ ) при утворенні комплексу з БСА ( $c_{\text{БСА}} = 1 \mu\text{M}$ ) у часі у відсутності (а, б) та присутності 1 М (в, г), 2 М (д, е) і 3 М (ж, з) сечовини

Далі ми проаналізували залежність спектральних та фотофізичних характеристик комплексів сквараїнових барвників з БСА у присутності різних концентрацій сечовини після досягнення рівноваги, тобто у **термодинамічно контрольованих умовах**. Зміни форм смуг поглинання та випромінювання комплексів сквараїнів **SqO3** і **SqCN3** представлені, на [рис. 3.22](#), а концентраційні залежності їх абсорбцій та інтенсивностей флуоресценції — на [рис. 3.23](#). На цих та інших рисунках спектри флуоресценції виправлено з врахуванням спектральної чутливості спектрофлуориметру та ефекту внутрішнього фільтру.

З'ясувалося, що збільшення концентрації сечовини від нуля до 7 М приводить до змін форми, положення та інтенсивності смуг поглинання обох комплексів, а також до короткохвильового зсуву та значного зниження інтенсивності смуг флуоресценції ([рис. 3.22, 3.23](#)) [128].

У той час як смуги флуоресценції закономірно зміщуються у короткохвильову область на 14 нм для протеїнового комплексу сквараїна **SqO3** і на 24 нм для **SqCN3**, а їх інтенсивності зменшуються, відповідно, у 5.6 і 3.0 рази, зміни в спектрах поглинання носять більш складний характер. При підвищенні концентрації сечовини смуги поглинання обох барвників закономірно зсуваються у короткохвильову область, але їх інтенсивність спочатку зменшується, а напівширина збільшується, після чого інтенсивність

знову зростає, а напівширина зменшується. Мінімум абсорбції протеїнового комплексу сквараїна **SqO3** досягається при концентрації сечовини приблизно 1 М (рис. 3.23 (а)), а для комплексу сквараїна **SqCN3** — при  $c_{\text{сечовини}} \approx 2.7$  М (рис. 3.23 (в)) [128].

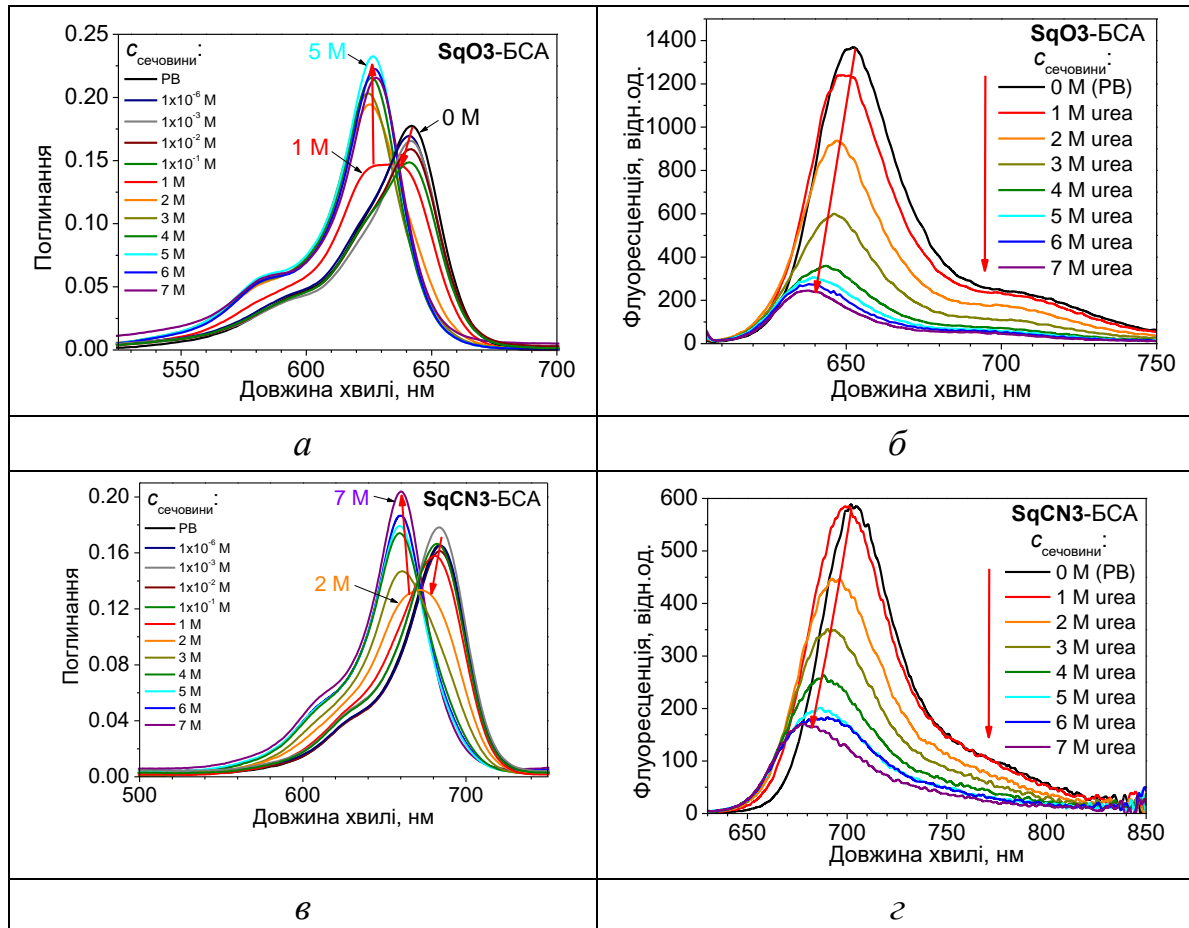


Рисунок 3.22 Залежність смуг поглинання (а) та флуоресценції (б) комплексу **SqO3**-БСА і смуг поглинання (в) та флуоресценції (г) комплексу **SqCN3**-БСА від концентрації сечовини ( $c_{\text{SqO3}} = 0.87$  мкМ,  $c_{\text{SqCN3}} = 1$  мкМ,  $c_{\text{БСА}} = 1$  мкМ)

Такий складний характеру змін смуги поглинання (наявність мінімуму на графіках залежності абсорбції від концентрації сечовини) пов'язано з переходом барвника з протеїнової фази до водної при збільшенні концентрації сечовини. У цих двох фазах барвник має різну смугу поглинання і по-різному реагує на зміни концентрації сечовини. Для відокремлення та аналізу індивідуальних смуг поглинання барвника (спектральних компонентів) у кожній фазі ми провели математичне розділення експериментальних спектрів протеїнових комплексів сквараїнів **SqO3** (рис. 3.24) і **SqCN3** (рис. 3.25).

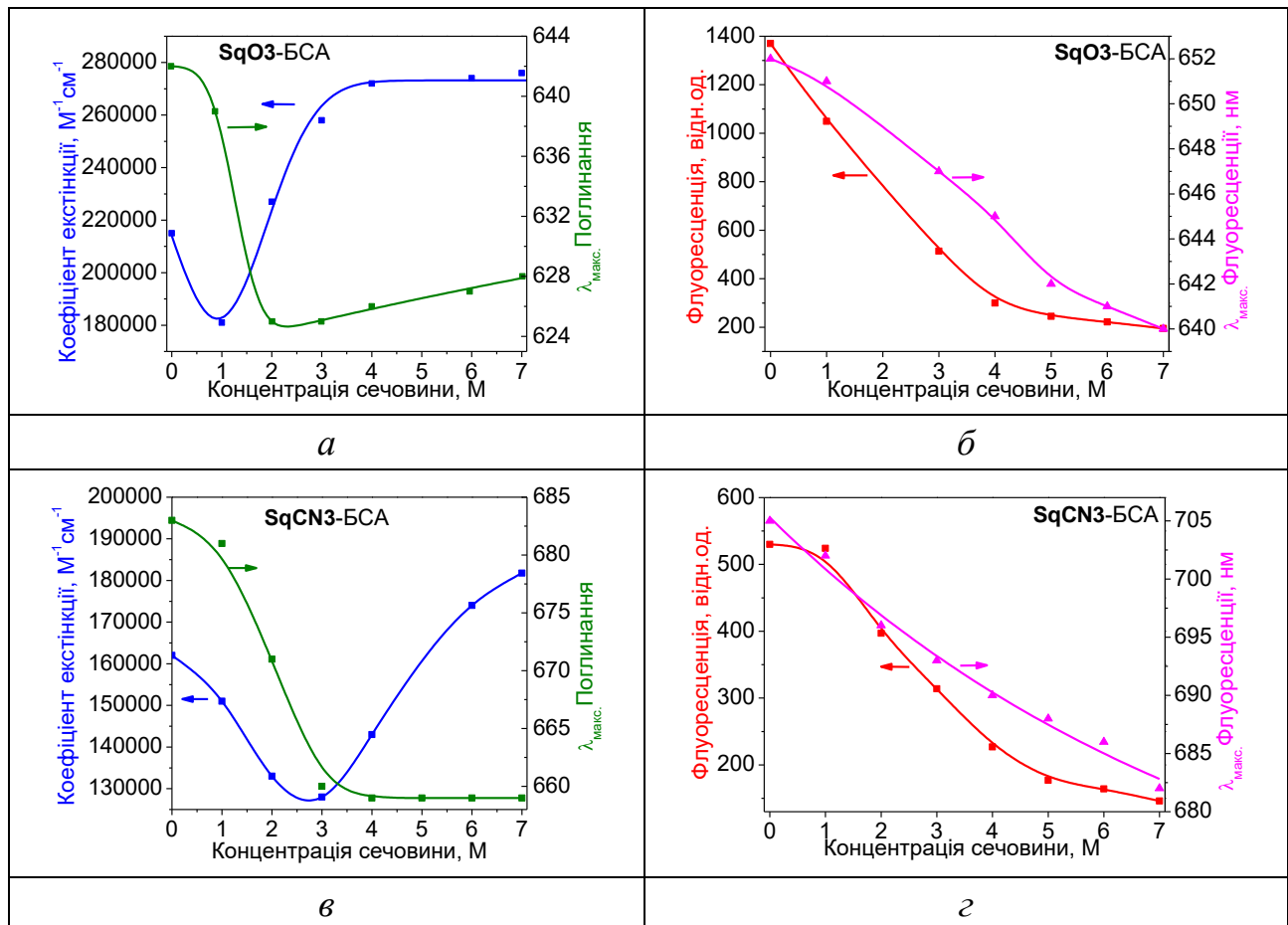
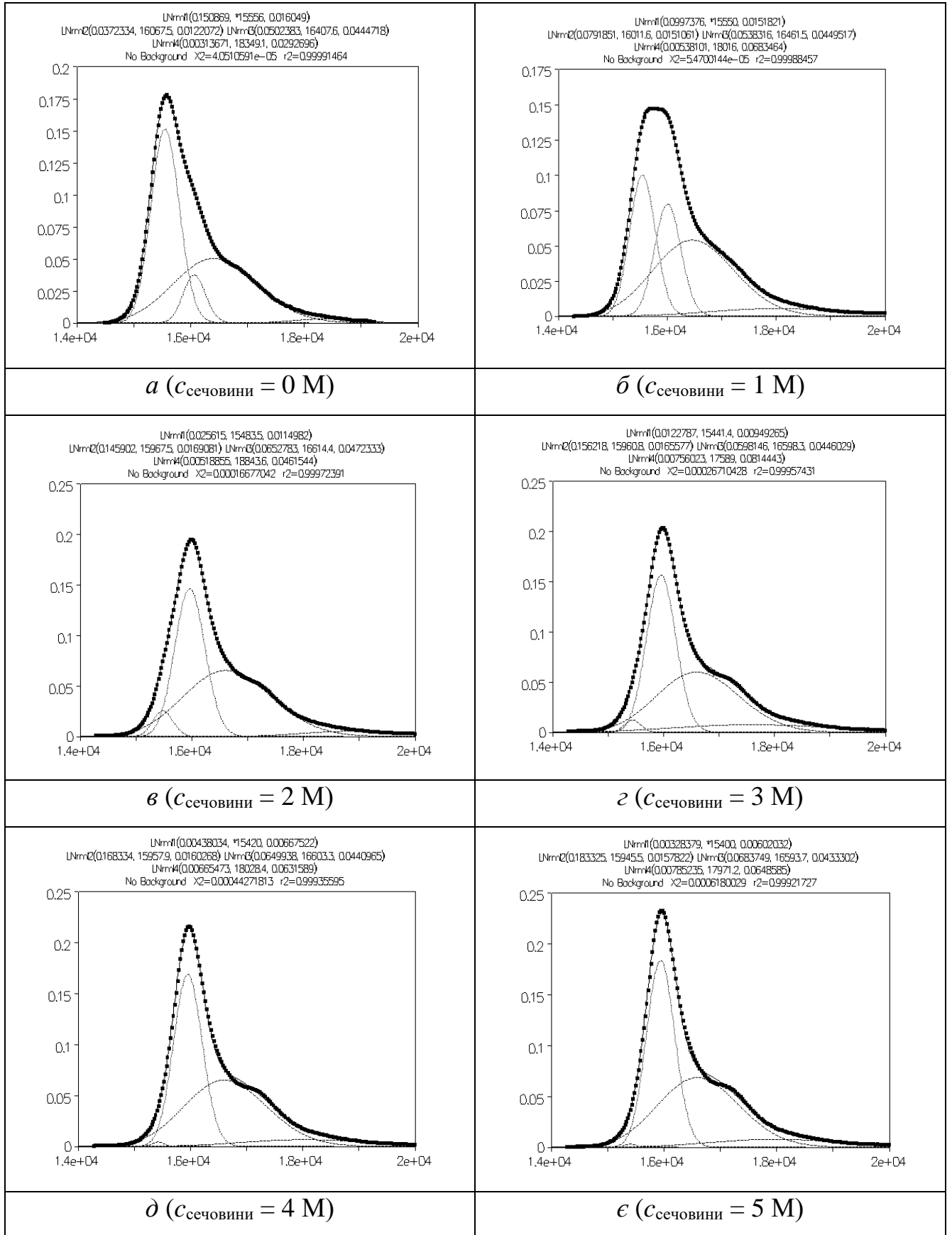


Рисунок 3.23 Залежність коефіцієнта екстинкції і довжини хвилі поглинання (а, в), а також інтенсивності і довжини хвилі флуоресценції (б, з) комплексів скварайнів **SqO3** ( $c_{\text{Барвника}} = 0.87$  мкМ) (а, б) і **SqCN3** ( $c_{\text{Барвника}} = 1$  мкМ) (в, з) з БСА ( $c_{\text{БСА}} = 1$  мкМ) від концентрації сечовини

Розділення було виконано у шкалі частот з використанням чотирьох функцій логнормальних розподілів, дві з яких (**перша і друга**) моделювали смуги поглинання барвника у двох різних фазах, **третя** функція моделювала коливальні смуги барвника у двох фазах (не було можливості їх адекватного розділення двома функціями), а **четверта** функція моделювала короткохвильову частину експериментального спектру поглинання, яка нас не цікавила.





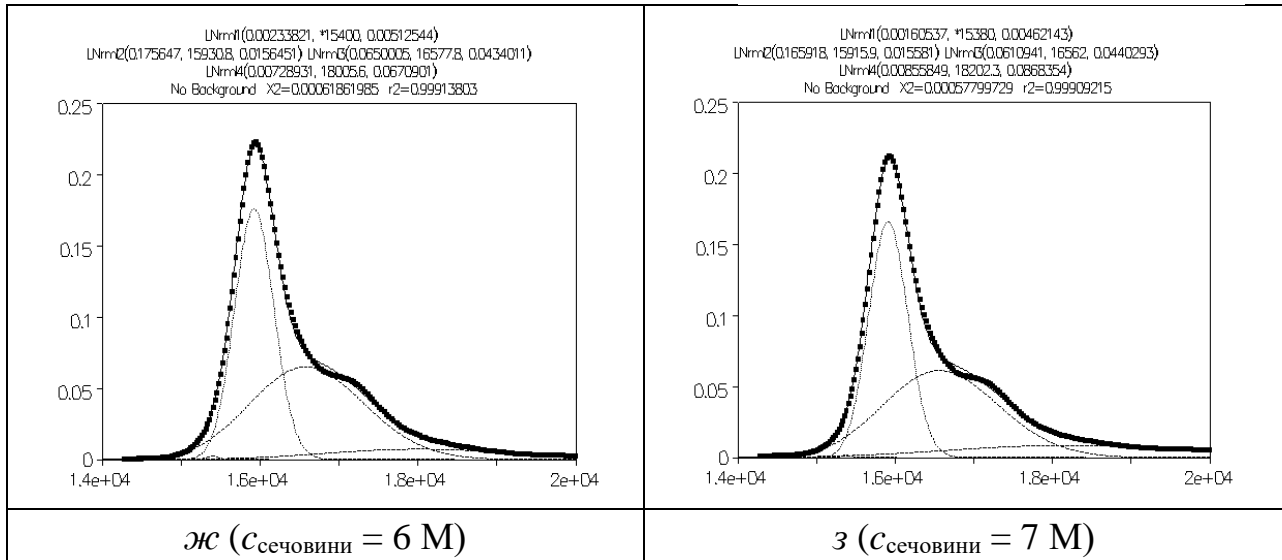
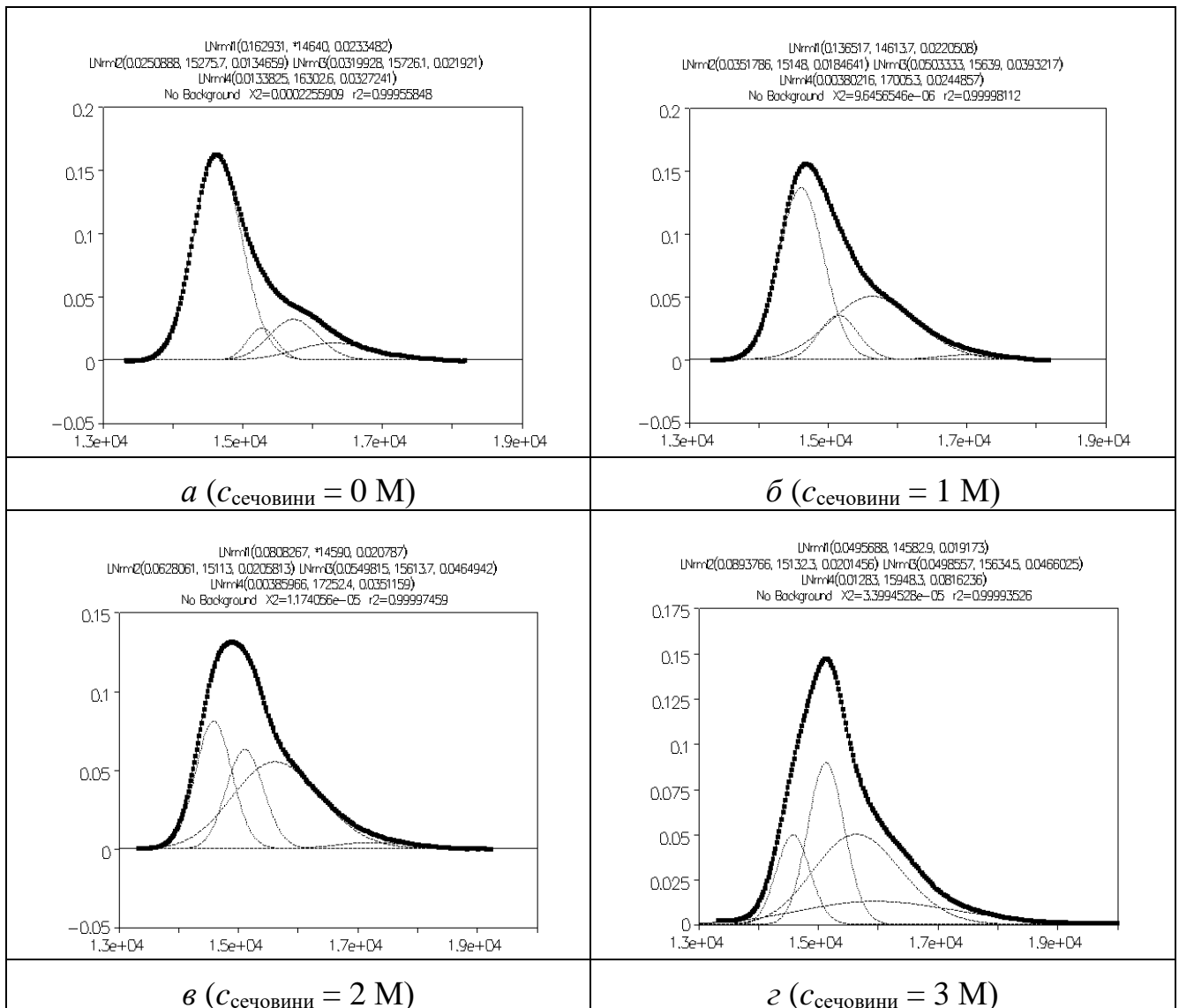


Рисунок 3.24 Математичне розділення експериментальних смуг поглинання комплексу скваріаїна **SqO3** ( $c_{\text{SqO3}} = 0.87 \text{ мкМ}$ ) з БСА ( $c_{\text{БСА}} = 1 \text{ мкМ}$ ) у відсутності (а) та присутності 1 М (б), 2 М (в), 3 М (г), 4 М (д), 5 М (е), 6 М (ж), 7 М (з) сечовини у фосфатному буфері (рН 7.4)



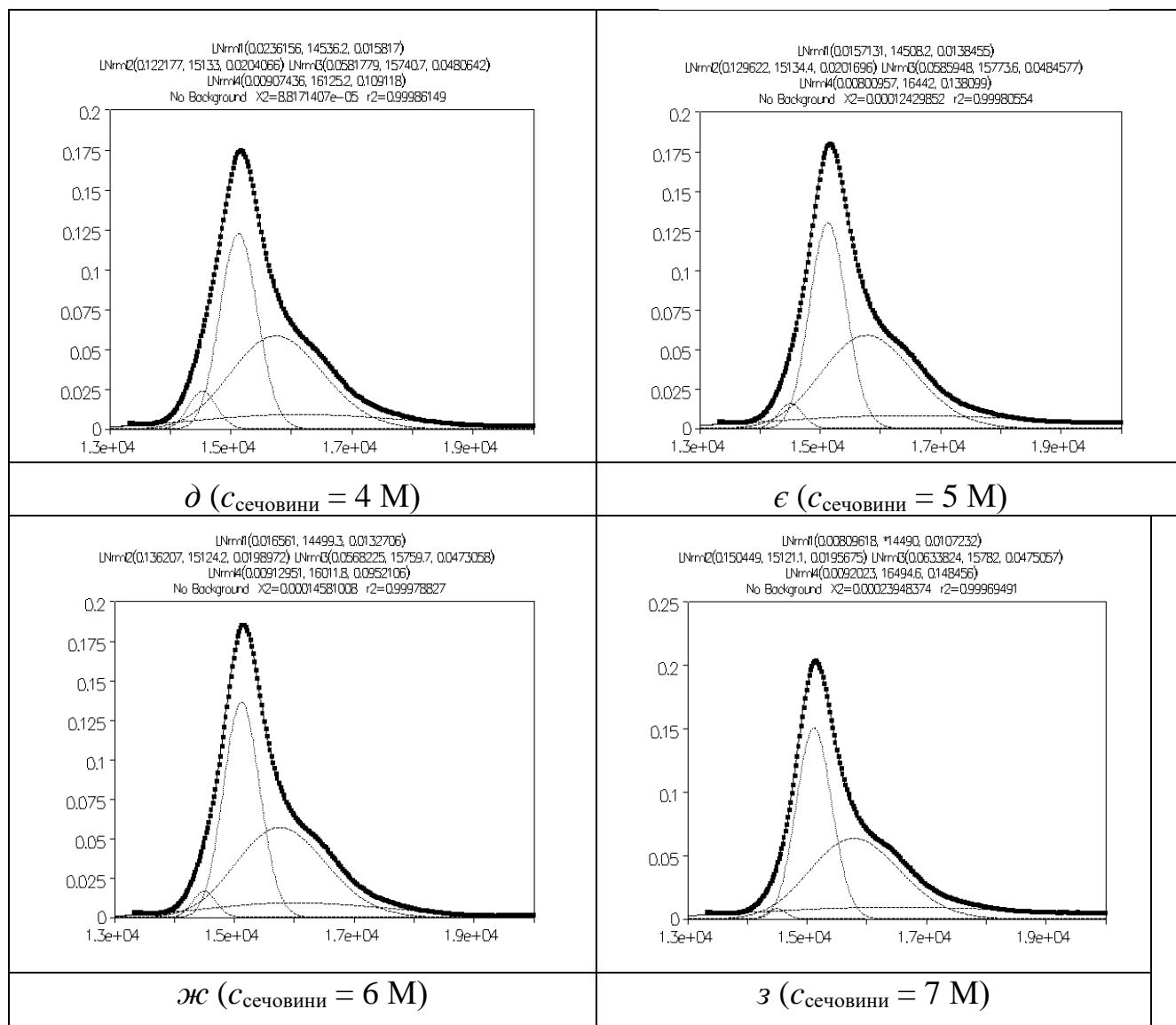


Рисунок 3.25 Математичне розділення експериментальних смуг поглинання комплексу сквараїна **SqCN3** ( $c_{\text{SqCN3}} = 1 \text{ мкМ}$ ) з БСА ( $c_{\text{БСА}} = 1 \text{ мкМ}$ ) у відсутності (а) та присутності 1 М (б), 2 М (в), 3 М (г), 4 М (д) сечовини у фосфатному буфері (pH 7.4)

Далі було проведено аналіз індивідуальних компонентів, одержаних в результаті математичного розділення експериментальних спектрів. Цей аналіз показав, що при збільшенні концентрації сечовини у РВ до  $\sim 4 \text{ M}$  інтенсивність (абсорбція) **першої** (довгохвильової) компоненти протеїнових комплексів сквараїнів **SqO3** і **SqCN3** зменшується, а **другої** (короткохвильової) компоненти — зростає (рис. 3.26 (а, в)).

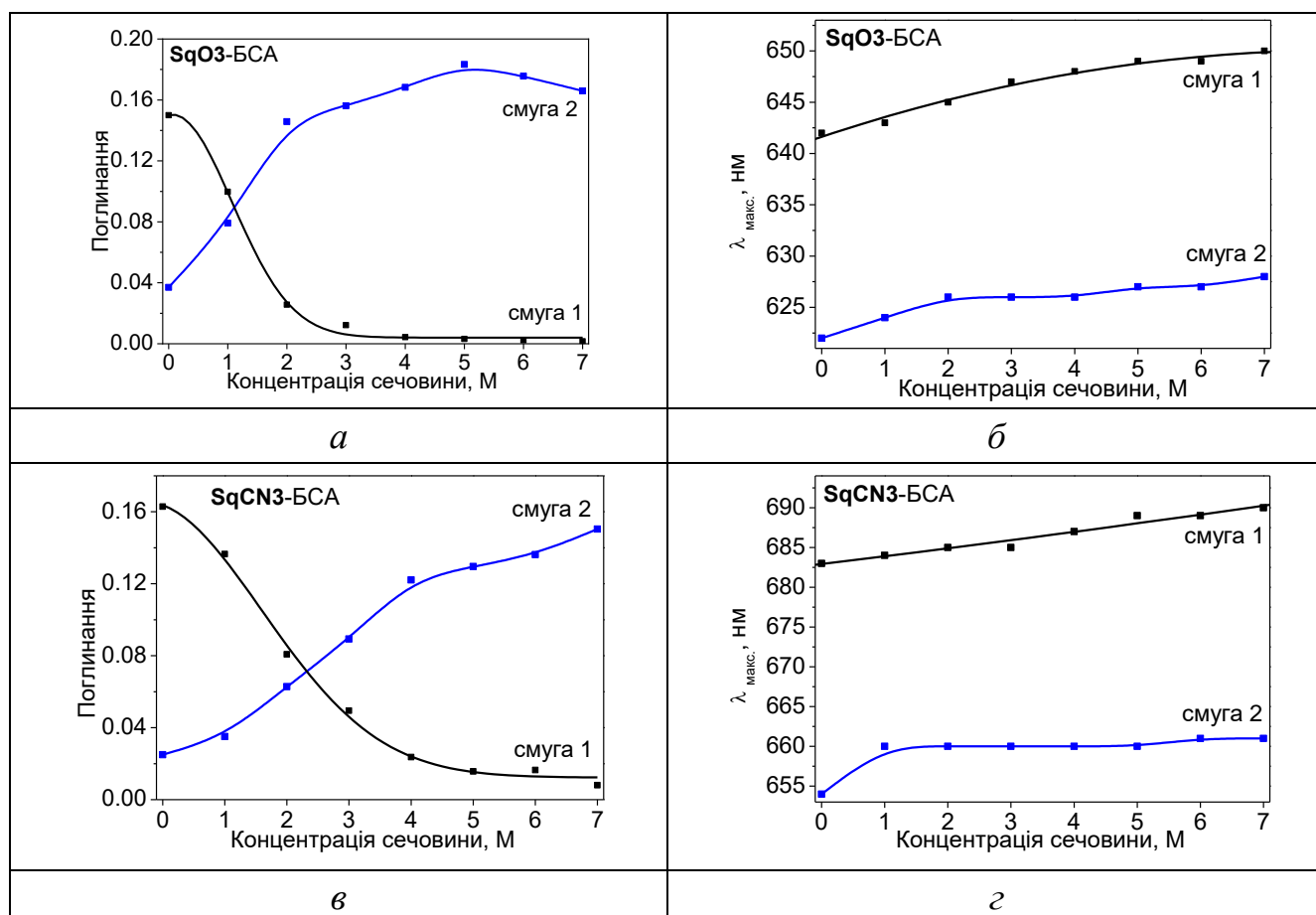


Рисунок 3.26 Залежність абсорбції (а, в) та положення максимуму (б, з) першої і другої компоненти смуги поглинання протеїнових комплексів скварайнів **SqO3** ( $c_{\text{SqO3}} = 0.87$  мкМ) (а, б) і **SqCN3** ( $c_{\text{SqCN3}} = 1$  мкМ) (в, з) з БСА ( $c_{\text{BSA}} = 1$  мкМ) від концентрації сечовини

Максимуми **першої** і **другої** компоненті спектрів поглинання протеїнових комплексів скварайнів **SqO3** і **SqCN3** мають тенденцію зміщуватися у довгохвильову область при збільшенні концентрації сечовини (рис. 3.26 (б, з)).

Положення максимумів окремих компонент при різних концентраціях сечовини зведено у табл. 3.4, де для порівняння надано також максимуми поглинання і флуоресценції скварайнових барвників в фосфатному буфері у вільному стані, в присутності сечовини та в комплексах з БСА без сечовини. З представлених даних видно, що незалежно від концентрації сечовини положення **першої** компоненти (643–650 нм для **SqO3** і 684–690 нм для **SqCN3**) наближається до максимуму поглинання комплексів з БСА у відсутності сечовини (642 нм для **SqO3** і 683 нм для **SqCN3**). Положення **другої** компоненти (624–628 нм для **SqO3** і 660–661 нм для **SqCN3**) співпадає з максимумом

поглинання барвника у присутності сечовини без БСА ( $c_{\text{сечовини}} = 7 \text{ М}$ , 626 нм для **SqO3** і 660 нм для **SqCN3**). Таким чином, **перша** компонента відповідає молекулам барвника, що знаходяться в комплексі з БСА, а **друга** — молекулам барвника, що не зв'язані з протеїном і взаємодіють лише з сечовиною. З даних у [таблиці 3.4](#) також витікає, що зростання концентрації сечовини змушує барвник переходити з протеїнової фази (з комплексу) до водного розчину, що є наслідком конформаційних змін в молекулах БСА, тобто розгортання їх третинної структури.

Таблиця 3.3

**Залежність довжини хвилі поглинання і флуоресценції скварайнів **SqO3** і **SqCN3** від концентрації сечовини**

Барвник	Компонента	Положення максимумів двох компонент (1 і 2) в спектрах поглинання комплексу з БСА (математичне розділення)								Без БСА (експеримент)	
		$c_{\text{сечовини}}, \text{ М}$								$c_{\text{сечовини}}, \text{ М}$	
		0 М	1 М	2 М	3 М	4 М	5 М	6 М	7 М	0 М	7 М
<b>SqO3</b>	Погл. 1	<b>642</b>	643	645	647	648	649	649	650	—	—
	Погл. 2	<b>622</b>	624	626	626	626	627	627	628	<b>622</b>	626
	Флуор.	<b>652</b>	650	647	646	643	640	639	637	<b>632</b>	638
<b>SqCN3</b>	Погл. 1	<b>683</b>	684	685	685	687	689	689	690	—	—
	Погл. 2	<b>654</b>	660	660	660	660	660	661	661	<b>654</b>	660
	Флуор.	<b>703</b>	703	700	955	693	687	684	684	<b>670</b>	675

Таким чином, чутливість барвників до конформаційних змін протеїнів можна оцінювати за зміною інтенсивності флуоресценції при зростанні концентрації сечовини у розчині. Графік залежності визначаємого параметру від концентрації денатуранту відповідає залежності параметру від конформації протеїну [176]. Величину динамічного діапазону (ДД) визначали як відношення інтенсивностей флуоресценції на рівні 90 % та 10% кривої (рис. 3.27) [177].

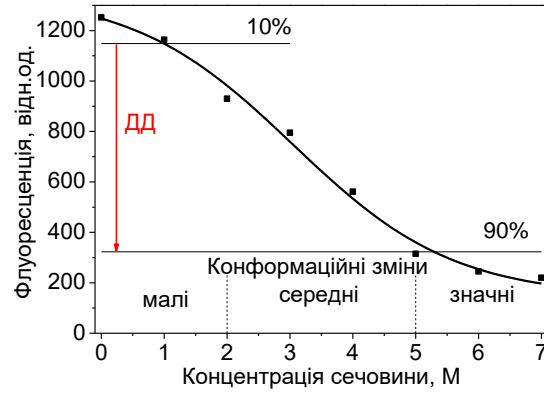
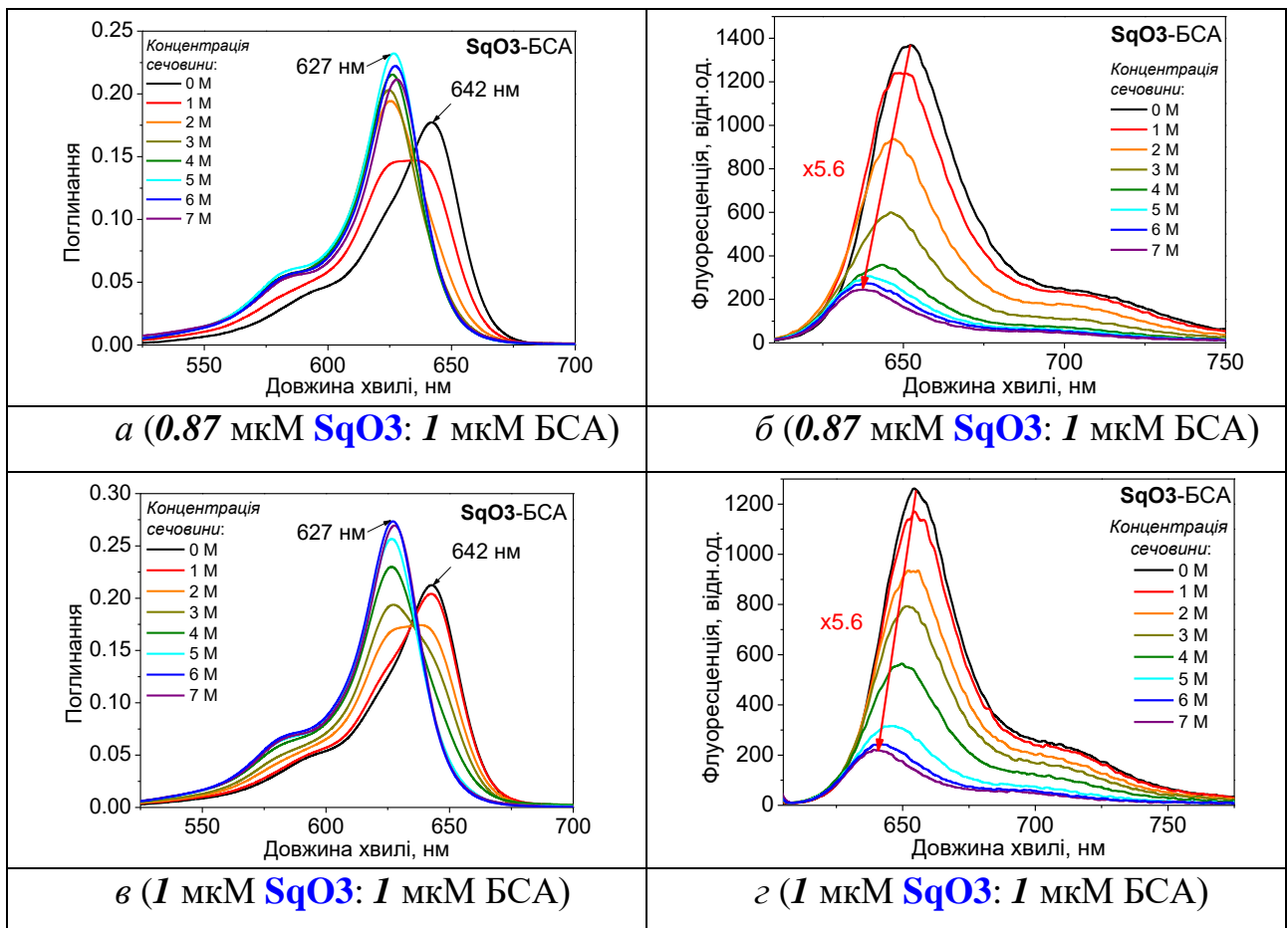


Рисунок 3.27 Визначення динамічного діапазону (ДД) на прикладі комплексу **SqO3-БСА**

### 3.6.1 Вплив сечовини на комплекси **SqO3** з протеїнами

На рис. 3.28 наведено спектри поглинання та випромінювання **SqO3** у комплексах з альбумінами бика в розчинах сечовини з концентрацією до 7 М.



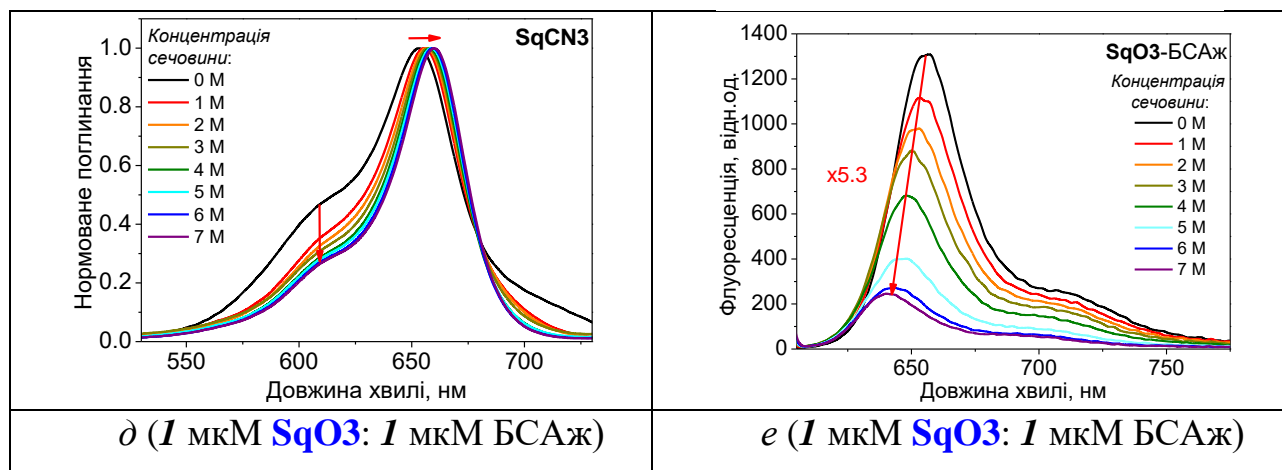


Рисунок 3.28 Спектри поглинання та флуоресценції  $0.87 \mu\text{M SqO3}: 1 \mu\text{M BSA}$  (а, б),  $1 \mu\text{M SqO3}: 1 \mu\text{M BSA}$  (в, г),  $1 \mu\text{M SqO3}: 1 \mu\text{M BSAж}$  (д, е) у розчинах сечовини від 0 до 7 М

Комплекс **SqO3**-БСА ми дослідили при двох мольних концентраціях:  $0.87 \text{ SqO3}: 1 \text{ БСА}$  (рис. 3.28 (а, б)) та  $1 \text{ SqO3}: 1 \text{ БСА}$  (рис. 3.28 (в, г)). Для комплексу  $1 \text{ SqO3}: 1 \text{ БСА}$  додавання 1 М сечовини призводить до зниження інтенсивності поглинання при 642 нм (поглинання барвника в комплексі) та появи невеликого плеча при  $\sim 627$  нм (смуга поглинання **SqO3** у розчинах сечовини), що є ознакою доступності барвника водній фазі (рис. 3.28 (в)) [128]. При концентрації сечовини 2 М, смуги поглинання барвника у комплексі та у розчині майже однакові, тому напівширина спектру значно розширена. Збільшення напівширини поглинання спостерігаються і для комплексу  $0.87 \text{ SqO3}: 1 \text{ БСА}$ , однак при концентрації сечовини лише 1 М (рис. 3.28 (а)), що свідчить про меншу стійкість комплексу до дії сечовини. Починаючи з 3 М сечовини в кожному із комплексів більшість барвника стає доступна розчину, тому подальший зріст концентрації сечовини призводить до зростання інтенсивності смуги 625 нм та її зсуву до 627 нм, після чого інтенсивність поглинання комплексів знижується [128]. Спектри флуоресценції обох комплексів мають короткохвильовий зсув на 15 нм та їх інтенсивність зменшується у 5.6 разів (рис. 3.28 (б, г)).

Наявність жирних кислот у БСАж, ускладнює утворення комплексів **SqO3** з денатурованим протеїном. Вже починаючи з 1 М сечовини, значна частина барвника переходить з протеїнової фази до розчину, а при 2 М сечовини,

максимум поглинання комплексу **SqO3**-БСАЖ становить 627 нм, що відповідає знаходженню більшості барвника у розчині (рис. 3.28 (д)). Хоча комплексоутворення **SqO3**-БСАЖ більш чутливе до конформації протеїну, ніж у випадку еквімолярного комплексу **SqO3**-БСА, це майже не впливає на зміну інтенсивності флуоресценції **SqO3**-БСАЖ, яка змінюється у 5.3 рази (рис. 3.28 (е)), а спектральний зсув не змінюється та дорівнює 15 нм.

Комплекси **SqO3** з альбумінами людини виявилися менш стійкими до дії сечовини, ніж комплекси з альбумінами бика (рис. 3.29).

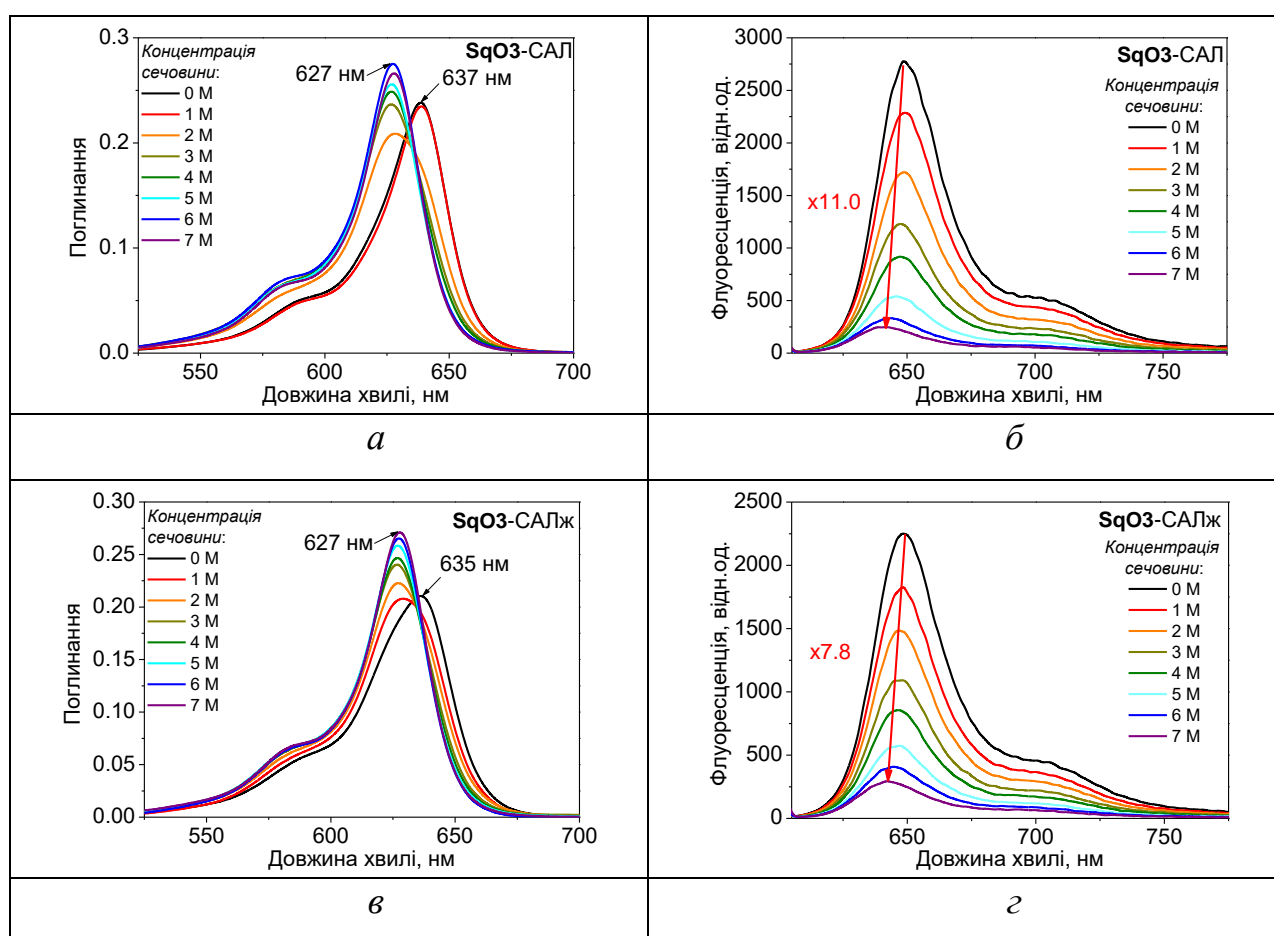


Рисунок 3. 29 Спектри поглинання та флуоресценції **SqO3**-САІ (*а*, *б*) та **SqO3**-САІж (*в*, *г*) у розчинах сечовини від 0 до 7 М ( $c_{sqo3}=1\text{мкМ}$ ,  $c_{\text{протеїнів}}=1\text{мкМ}$ )

У відсутності жирних кислот, при концентрації сечовини 2 М смуга поглинання комплексу змінюється з 637 нм (комплекс) на 627 нм (розчин) з подальшим зростанням її інтенсивності (рис. 3.29 (*а*)). Ще меншу стійкість до дії сечовини виявляє **SqO3**-САІж, вже починаючи з 1 М більшість барвника стає доступною розчиннику (рис. 3.29 (*в*)). Незважаючи на досить низьку стійкість

комплексів **SqO3** з альбумінами людини до дії сечовини, зміна їх інтенсивності флуоресценції значно вищі за комплекси з альбумінами бика та становлять 11.0 разів для **SqO3**-САЛ та 7.8 разів для **SqO3**-САЛж (рис. 3.29 (б, з)). Зсув смуги флуоресценції для обох комплексів становить 8 нм.

З залізовмісним протеїном ПХ сквараїн **SqO3** не утворює стійких комплексів. Навіть у РВ, смуга знаходження барвника в протеїні  $\sim 640$  нм проявляється лише як плече, а максимум поглинання комплексу становить 627 нм (рис 3.30 (а)), тобто більшість барвника доступна водному розчину.

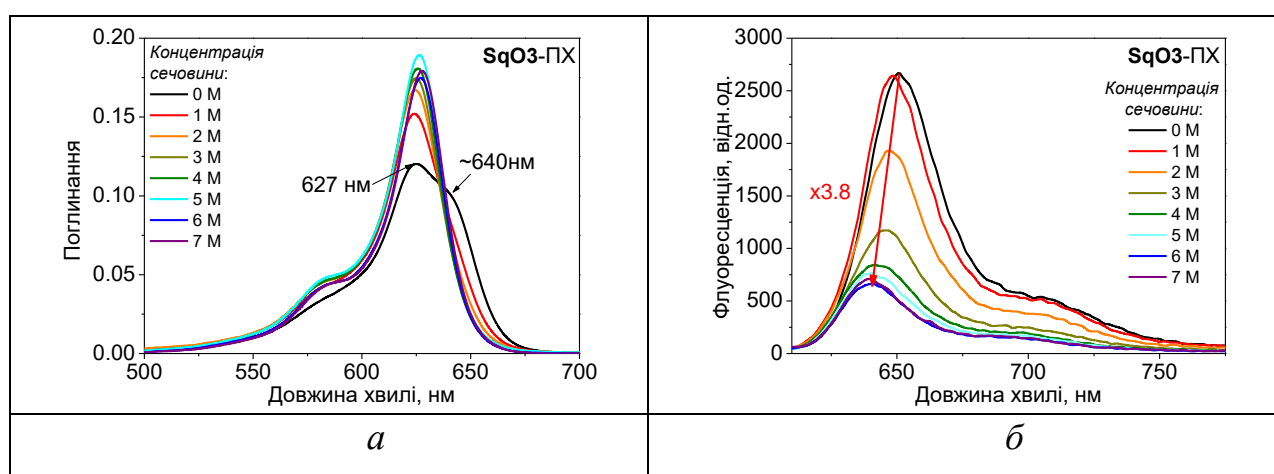


Рисунок 3.30 Спектри поглинання (а) та флуоресценції (б) **SqO3**-ПХ у розчинах сечовини від 0 до 7 М ( $c_{\text{SqO3}}=1$  мкМ,  $c_{\text{ПХ}}=1$  мкМ)

Додавання до комплексу сечовини призводить до ще більшої сольватації розчинником **SqO3**, в наслідок чого інтенсивність поглинання зростає до концентрації сечовини 5 М, а при подальших концентраціях сечовини інтенсивність абсорбції зменшується. Смуга флуоресценції **SqO3**-ПХ зсувається на 12 нм у коротку область, а її інтенсивність знижується у 3.8 рази (рис. 3.30 (б)).

Далі ми визначили ДД та діапазон конформаційних змін протеїнів до яких чутливі барвники (рис. 3.31).

Комплекси **SqO3** з бичачими альбумінами майже не відрізняються за ДД, однак відрізняються за діапазоном конформацій протеїнів до яких чутливі. Для комплексу  $0.87$  мкМ **SqO3**:  $1$  мкМ БСА цей діапазон становить 0.8-4.0 М



сечовини (рис. 3.31 (а)), а збільшення концентрації барвника розширює діапазон чутливості **SqO3** до 5.3 М (рис. 3.31 (б)).

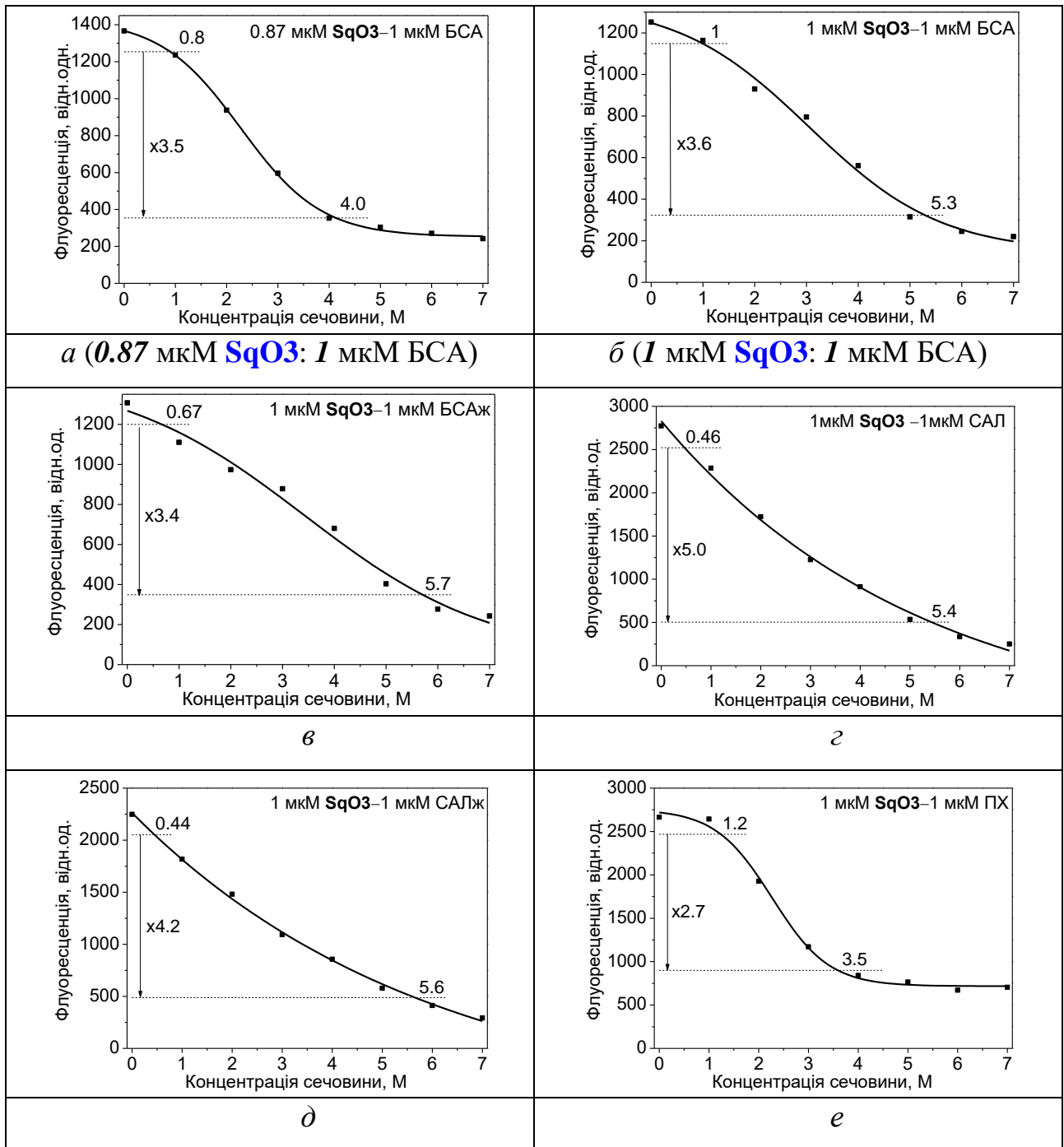


Рисунок 3.31 Залежність інтенсивності флуоресценції від концентрації сечовини для 0.87 мкМ **SqO3**: 1 мкМ БСА (а), 1 мкМ **SqO3**: 1 мкМ БСА (б), 1 мкМ **SqO3**: 1 мкМ БСАЖ (в), 1 мкМ **SqO3**: 1 мкМ САЛ (г), 1 мкМ **SqO3**: 1 мкМ САЛЖ (д), 1 мкМ **SqO3**: 1 мкМ ПХ (е)

В комплексах з БСАЖ **SqO3** діапазон стає ще більшим та становить 0.67-5.7 М сечовини, що свідчить про чутливість барвника до майже всіх

конформаційних станів протеїну. В комплексах з альбумінами людини **SqO3** також чутливий до великого діапазону конформацій протеїнів (рис. 3.31 (z, d)), що, як і у випадку альбумінів бика, незначною мірою зростає при наявності жирних кислот в протеїні. За ДД чутливість барвника в комплексі з САЛ в ~1.2 рази більша ніж комплексі з САЛЖ (рис. 3.31 (z)), та в ~1.4 рази більша за чутливість з альбумінами бика. До конформаційних змін ПХ **SqO3** чутливий в дуже вузькому діапазоні (рис. 3.31 (e)), який значно менший, відносно альбумінів. Величина ДД, яка дорівнює лише 2.7 рази, також є найменшою серед досліджених протеїнів. Скоріш за все це пов'язано з малими розмірами ПХ, що ускладнює утворення комплексу з барвником.

Таким чином, **SqO3** має більшу чутливість до конформаційних змін при еквімолярних концентраціях з БСА, а наявність жирних кислот в альбумінах підвищує діапазон конформацій протеїну, які можна реєструвати за допомогою барвника.

### 3.6.2 Вплив сечовини на комплекси **SqCN3** з протеїнами

Спектрально-люмінесцентні зміни для комплексів **SqCN3** є дуже близькими до **SqO3**. Додавання до комплексів сечовини призводить до поступового збільшення напівширини спектрів поглинання та зростанню абсорбції на 660 нм (поглинання вільного барвника у розчині сечовини). В спектрах флуоресценції, максимум зсувається у короткохвильову область, а інтенсивність смуги зменшується.

З альбумінами бика **SqCN3** утворює стійкі комплекси, при концентрації 5 М сечовини співвідношення смуг поглинання у розчині (660 нм) та у комплексах майже однакові (рис. 3.32 (a, в)), а при 6 М сечовини в спектрах поглинання все ще проявляються ознаки утворення комплексів, хоча більша частина барвника знаходиться у розчині [128]. Зміни в інтенсивності флуоресценції для обох комплексів досить близькі та становлять 3.5 рази для **SqCN3**-БСА і 3.1 рази для **SqCN3**-БСАЖ (рис. 3.32 (б, г)). Спектральні зсуви

значно більші, ніж у випадку комплексів **SqO3**, та дорівнюють 23 нм для **SqCN3-БСА** і 24 нм для **SqCN3-БСАж**.

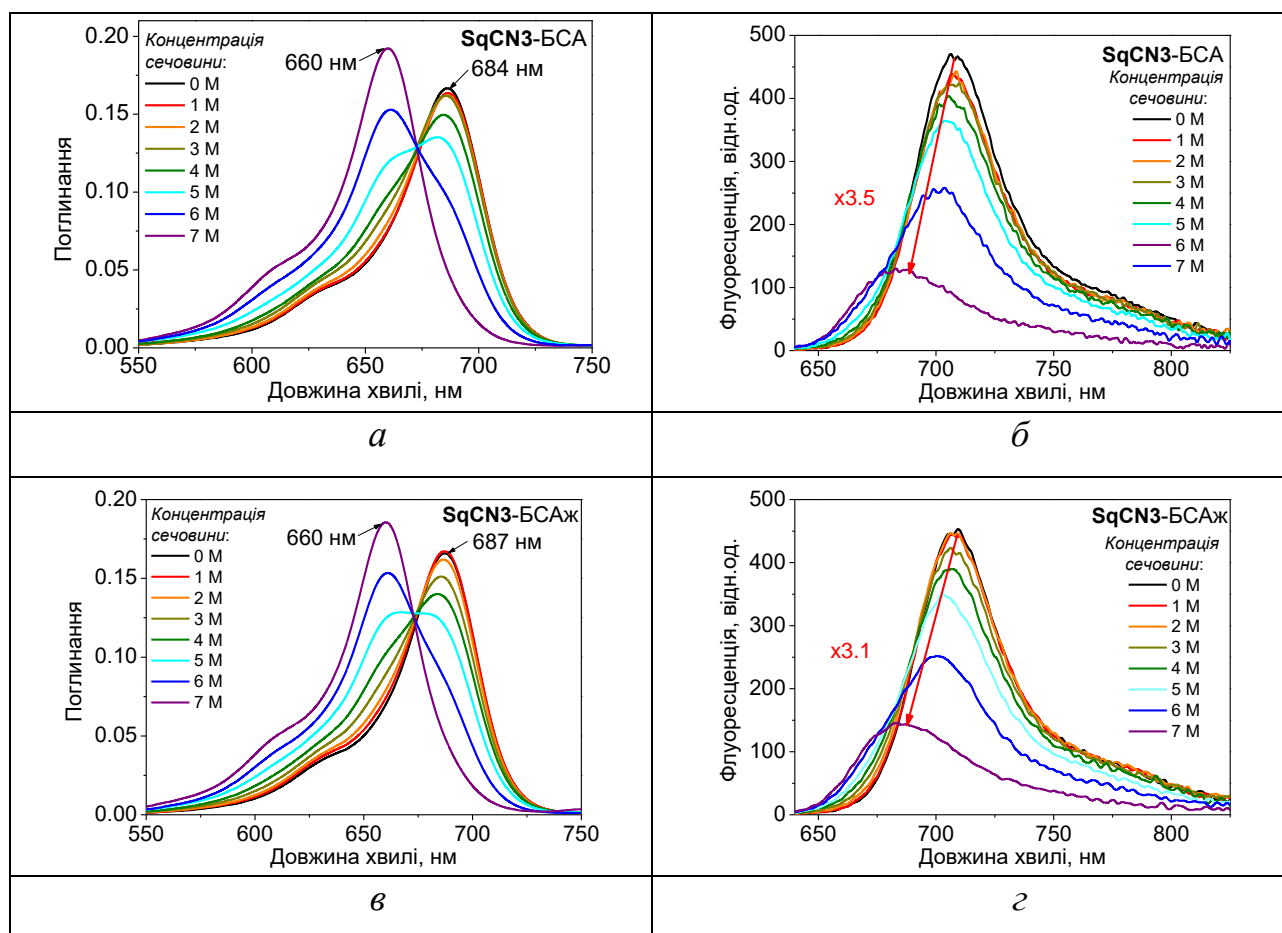


Рисунок 3.32 Спектри поглинання та флуоресценції **SqCN3-БСА** (а, б) та **SqCN3-БСАж** (в, г) у розчинах сечовини від 0 до 7 М ( $c_{\text{SqCN3}}=1\text{мкМ}$ ,  $c_{\text{протеїнів}}=1\text{мкМ}$ )

З альбумінами людини **SqCN3** також утворює комплекси стійкі до сечовини (рис. 3.33 (а, в)). Додавання до комплексів сечовини в кількості від 1 М до 4 М не впливає на положення максимумів поглинання комплексів при 686 нм, що свідчить про знаходження більшої кількості барвника у протеїновій фазі. При збільшенні концентрації сечовини у розчині, здатність барвника до утворення комплексів з протеїнами значно знижується та більшість **SqCN3** переходить до розчину, що зсуває максимуми поглинання комплексів до 660 нм (рис. 3.33 (а, в)) [128]. Інтенсивності флуоресценції комплексів **SqCN3-САЛ** та **SqCN3-САЛж** змінюється, відповідно у 4 та 3.1 рази. Спектральні зсуви флуоресценції для **SqCN3-САЛ** і **SqCN3-САЛж** становлять відповідно 23 нм і 26 нм.

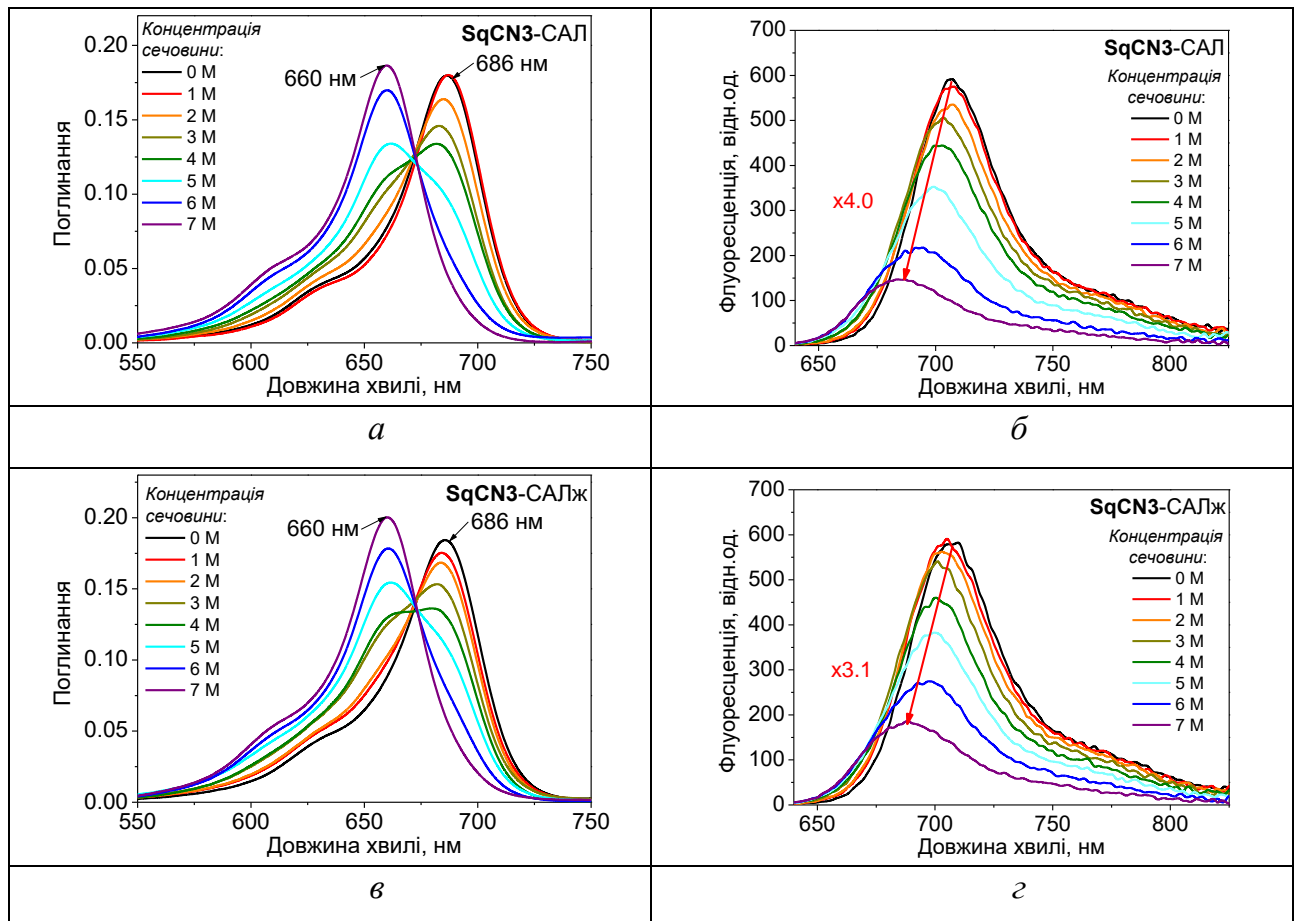


Рисунок 3.33 Спектри поглинання та флуоресценції **SqCN3-CAL** (а, б) та **SqCN3-CALЖ** (в, г) у розчинах сечовини від 0 до 7 М ( $c_{\text{SqCN3}}=1\text{мкМ}$ ,  $c_{\text{протеїнів}}=1\text{мкМ}$ )

Вплив сечовини на спектри поглинання та випромінювання комплексів **SqCN3-ПХ** наведено на [рис 3.34](#). Діціанометиленовий сквараїн утворює комплекс з ПХ, що має максимум поглинання 679 нм. В наслідок розгортання протеїну, при 2 М сечовини барвник переходить до водної фази з максимум поглинання комплексу 660 нм. Подальше додавання сечовини до комплексу призводить до зростання інтенсивності смуги 660 нм. Інтенсивність випромінювання комплексу зменшується у 3.2 рази. Спектральні зсуви поглинання та флуоресценції становлять, відповідно, 19 нм і 24 нм.

На відміну від оксоскваїну **SqO3**, діціанометиленовий сквараїн **SqCN3** має меншу чутливість до конформаційних змін протеїнів. Хоча комплекси **SqCN3** з бичачими альбумінами мають досить великі квантові виходи ([табл. 3.3](#)), ДД флуоресцентних змін комплексів під дією сечовини є

невеликими, та дорівнюють 2.7 для **SqCN3**-БСА та 2.4 для **SqCN3**-БСАЖ (рис. 3.35 (а, б)).

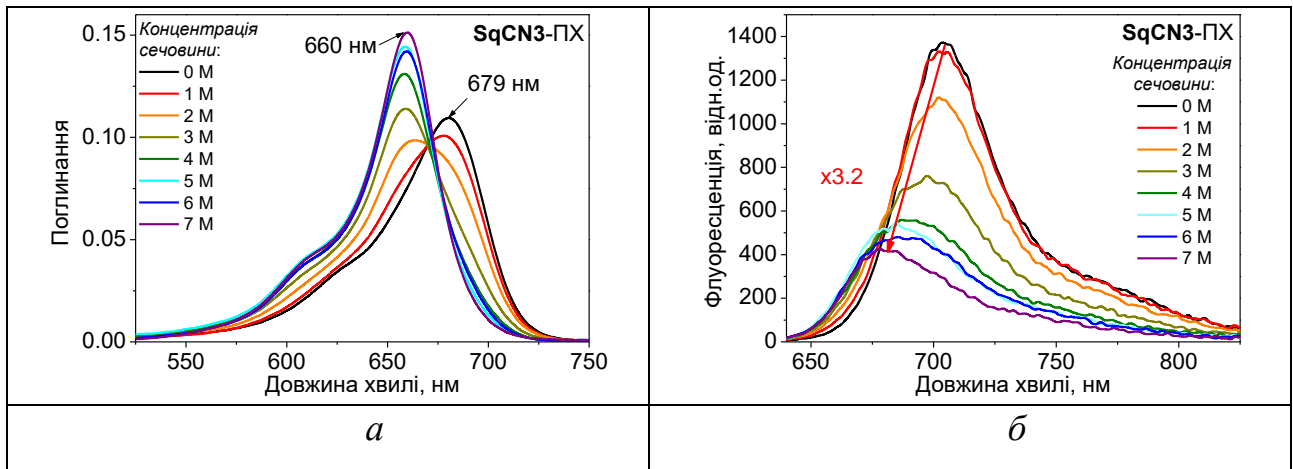
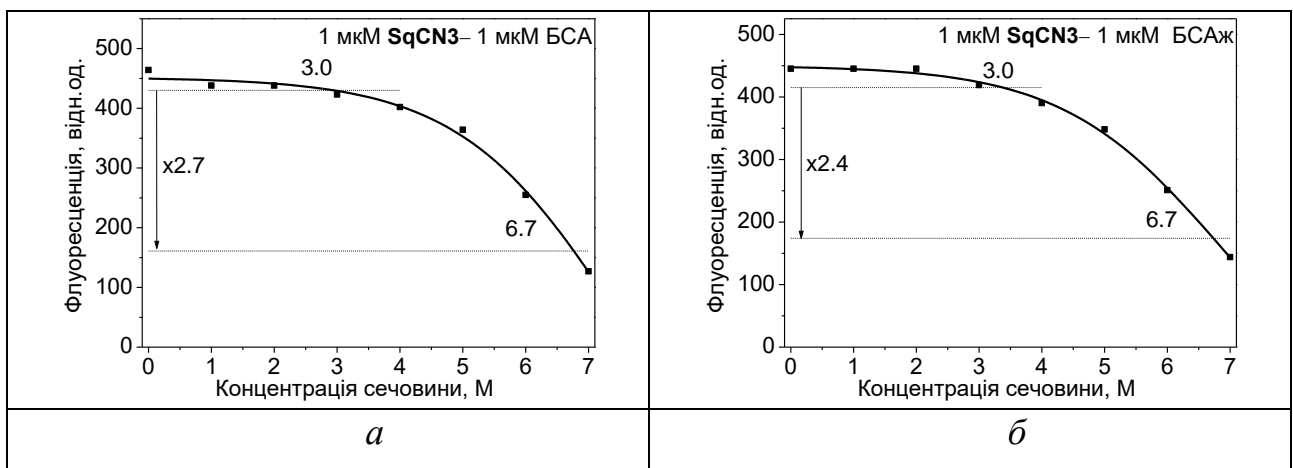


Рисунок 3.34 Спектри поглинання (а) та флуоресценції (б) комплексів **SqCN3**-ПХ у розчинах сечовини від 0 до 7 М ( $c_{\text{SqCN3}}=1\text{мкМ}$ ,  $c_{\text{ПХ}}=1\text{мкМ}$ )

Це можна пояснити значною стійкістю комплексів до впливу сечовини, через що сольватифлуорофорні ефекти внаслідок розгортання протеїнів відбуваються тільки у невеликому діапазоні при значних концентраціях сечовини. При цьому наявність жирних кислот в БСАЖ не впливає на цей діапазон (рис. 3.35 (а, б)).



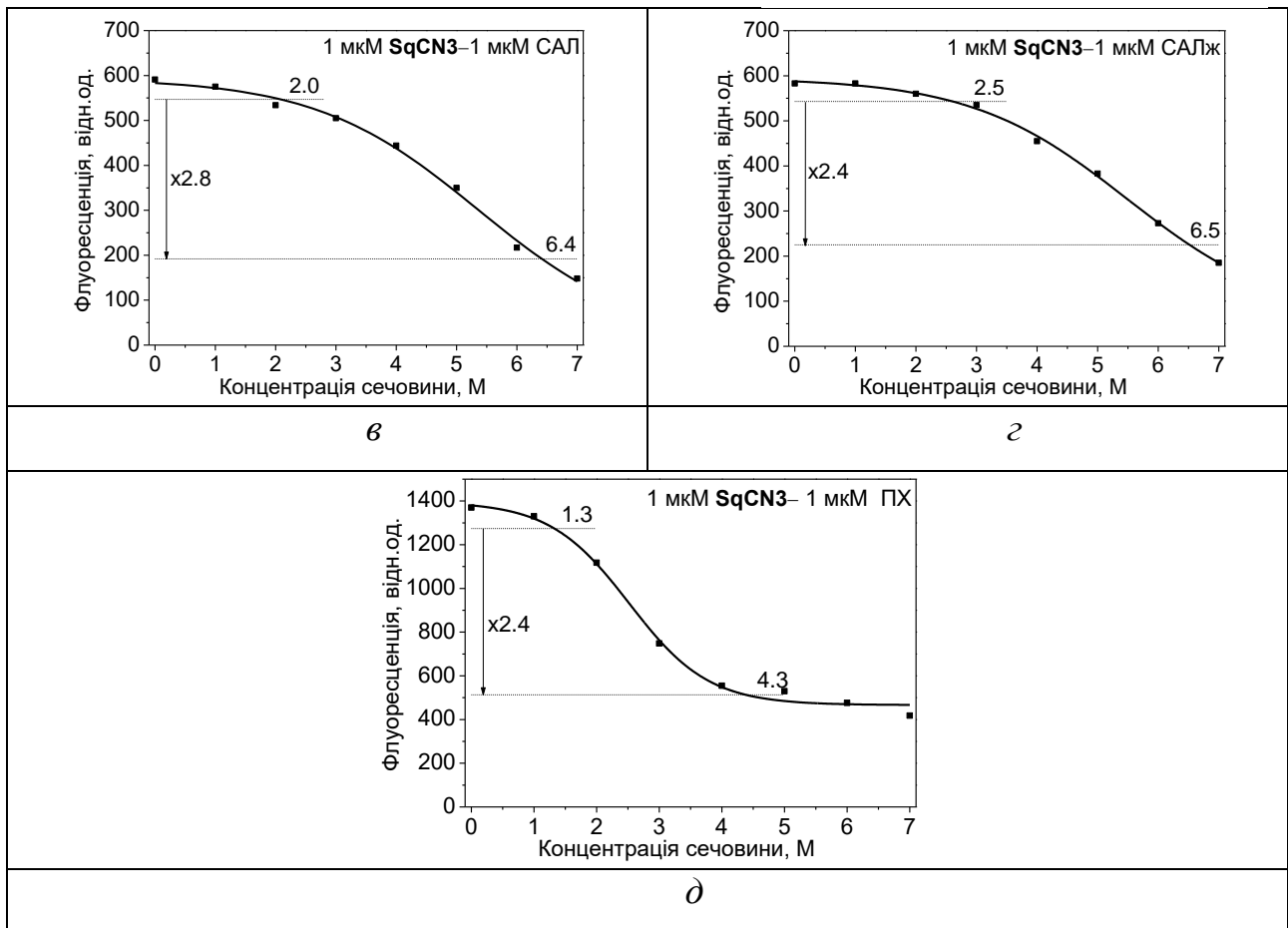


Рисунок 3.35 Залежність інтенсивності флуоресценції від концентрації сечовини комплексів **SqCN3** з протеїнами ( $c_{\text{SqCN3}}=1\text{ мкМ}$ ,  $c_{\text{протеїн}}=1\text{ мкМ}$ )

Аналогічно до комплексів **SqCN3** з бичачими альбумінами, комплекси **SqCN3**-САЛ та **SqCN3**-САЛж також мають значну стійкість до впливу сечовини. Через це, барвник також не виявляє чутливості до малих конформаційних змін альбумінів людини та має невисокі значення ДД флуоресцентних змін, що становлять 2.8 для **SqCN3**-САЛ та 2.4 для **SqCN3**-САЛж (рис 3.35 (b, z)). Діапазон концентрацій сечовини, при яких барвник чутливий до конформаційних змін, для альбумінів людини дещо більший ніж для альбумінів бика та на відміну від **SqCN3**-БСАж, зменшується при наявності жирних кислот. Для **SqCN3**-ПХ величина ДД дорівнює 2.4 та є подібною до таких для комплексів з альбумінами людини і бика. Діапазон концентрацій сечовини при яких барвник чутливий до конформаційних змін ПХ дорівнює 1.3-4.3 М, що відповідає малим та середнім конформаційним змінам.

Таким чином, сквараїн **SqCN3** утворює стійки комплекси з альбумінами та не чутливий до їх малих конформаційних змін, проте навпаки чутливий до малих конформаційних змін в ПХ.

### 3.6.3 Вплив сечовини на комплекси **Styryl** з протеїнами

Додавання сечовини до комплексів **Styryl** з протеїнами не призводить до суттєвих спектральних змін в спектрах поглинання, проте впливає на спектри випромінювання, тому в подальшому наведені тільки спектри флуоресценції комплексів.

Як було зазначено у розд. 2, стирил **Styryl** має позитивний сольватифлуорохромізм, тому для протеїнових комплексів **Styryl**, зі збільшенням кількості сечовини у розчині спектри флуоресценції комплексів зсуваються у довгохвильову область, а їх інтенсивність знижується [146].

Для комплексів **Styryl** з альбумінами бика наявність жирних кислот зменшує полярність оточення барвника, через що максимуми флуоресценції **Styryl**-БСАж при 0 М та 7 М сечовини на 5 нм коротші за **Styryl**-БСАж (рис 3.36).

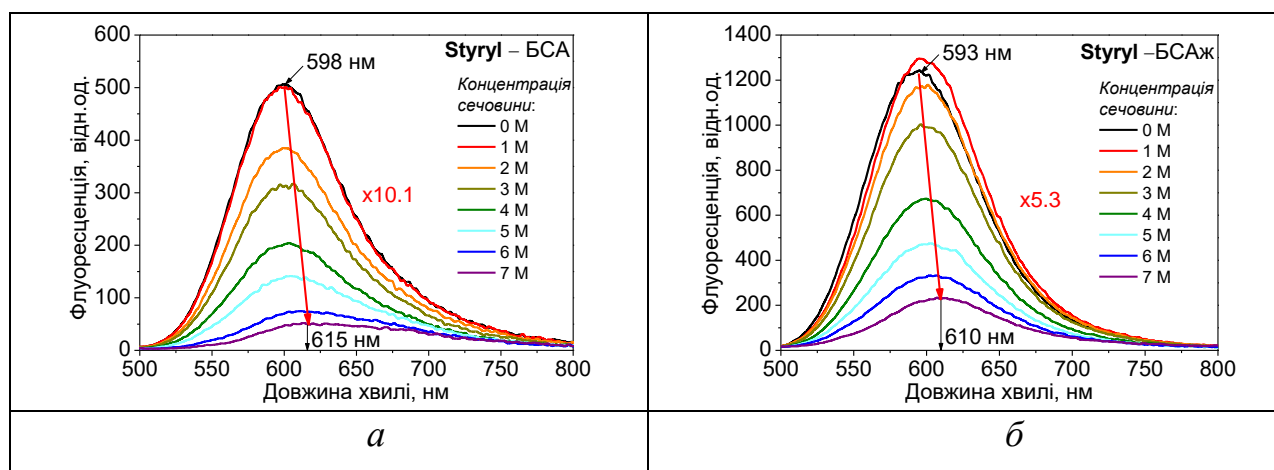


Рисунок 3.36 Спектри поглинання флуоресценції комплексів **Styryl**-БСА (*a*) та **Styryl**-БСАж (*б*) у розчинах сечовини від 0 до 7 М ( $c_{\text{Styryl}}=1\text{мкМ}$ ,  $c_{\text{протеїнів}}=1\text{мкМ}$ )

Положення максимуму при 615 нм відповідає випромінюванню вільного барвника у розчині сечовини з концентрацією 7 М, тобто при розгортанні БСА

**Styryl** повністю переходить до водної фази. Незначне підвищення інтенсивності флуоресценції **Styryl**-БСАЖ при 1 М сечовини, скоріш за все пов'язано з ефектами взаємодії **Styryl** з жирними кислотами, які, внаслідок зміни конформації протеїну, стають більш доступними для барвника. Зміна інтенсивності флуоресценції **Styryl**-БСА становить 10.1 рази, що майже у два рази більше ніж для **Styryl**-БСАЖ для якого інтенсивність флуоресценції знижується лише у 5.3 рази.

Складний характер змін мають і спектри випромінювання комплексів **Styryl** з альбумінами людини (рис 3.37). При 0 М сечовини максимуми обох комплексів становлять 601 нм, а додавання сечовини призводить спочатку до зростання інтенсивності смуг флуоресценції, потім до їх зниження та складної зміни положення максимуму.

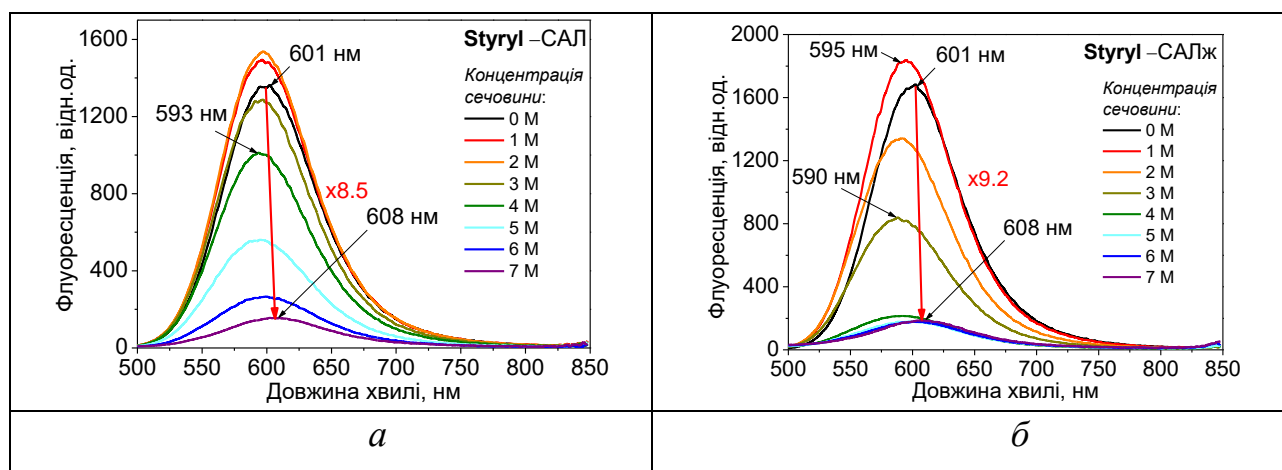


Рисунок 3.37 Залежність інтенсивності флуоресценції **Styryl**-САЛ (а) та **Styryl**-САЛЖ (б) від концентрації сечовини ( $c_{\text{Styryl}}=1\text{мкМ}$ ,  $c_{\text{протеїн}}=1\text{мкМ}$ )

Так, сечовина в кількості 1–2 М призводить до зростання інтенсивності флуоресценції **Styryl**-САЛ. При більших концентраціях сечовини інтенсивність випромінювання комплексу знижується, а максимум зсувається до 593 нм та при 6 М відбувається зворотній зсув спектрів у довгохвильову область до 608 нм. Схожі зміни відбуваються і для комплексу **Styryl**-САЛЖ. При 1 М сечовини спектр флуоресценції комплексу зростає за інтенсивністю, а максимум зсувається у короткохвильову область на 6 нм. При 2–3 М сечовини інтенсивність випромінювання зменшується, а максимум сягає 590 нм.



Починаючи з 4 М сечовини максимум спектру флуоресценції комплексу зміщується у довгохвильову область до 608 нм при 7 М. Такі складні зміни спектрів флуоресценції комплексів відбуваються внаслідок змін мікрооточення **Styryl** при розгортанні протеїнів. При малих концентраціях сечовини розпушення щільної упаковки протеїнів допускає більшу доступність барвника для вбудови у гідрофобні кишені протеїнів, що підвищує інтенсивність флуоресценції та зсуває максимуми у короткохвильову область. При значних концентраціях сечовини протеїни денатурують та їх гідрофобні області стають доступними для розчинника, що збільшує полярність оточення барвника і, як наслідок, максимуми флуоресценції комплексів зсуваються у довгохвильову область [146]. Присутність жирних кислот в альбумінах людини підвищує зміни флуоресценції **Styryl**, для **Styryl**-САЛ інтенсивність зменшується в 8.5 разів, а для **Styryl**-САЛЖ в 9.2 рази.

У комплексі з ПХ максимум флуоресценції послідовно зсувається у довгохвильову область з 596 нм (комплекс) до 615 нм (розчин сечовини) (рис. 3.38). Інтенсивність флуоресценції **Styryl**-ПХ знижується у діапазоні концентрацій сечовини від 1 М до 5 М та незначною мірою зростає при концентраціях 6-7 М. Такі спектральні прояви комплексу можуть бути пов'язані з переходом барвника від протеїнової фази до водного середовища.

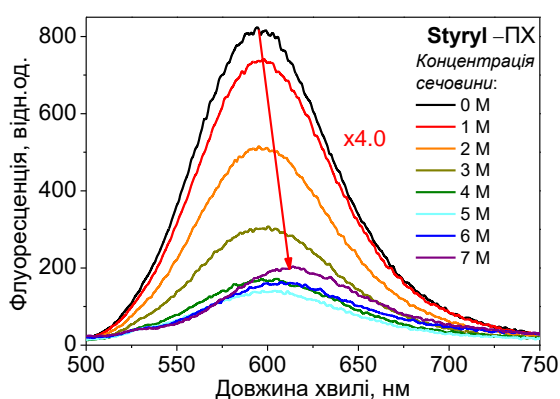


Рисунок 3.38 Залежність інтенсивності флуоресценції від концентрації сечовини ( $c_{\text{Styryl}}=1\text{мкМ}$ ,  $c_{\text{протеїн}}=1\text{мкМ}$ )

Інтенсивність флуоресценції комплексу **Styryl**-ПХ у присутності сечовини змінюється у 4 рази.

Флуоресцентний відгук стирилу **Styryl** на конформаційні зміни протеїнів в більшій мірі залежить від протеїну, ніж для сквараїнів (рис. 3.39). В альбумінах бика, присутність жирних кислот зменшує ДД флуоресцентних змін у  $\sim 1.4$  рази, з 4.8 для **Styryl**-БСА до 3.4 для **Styryl**-БСАж, та знижує чутливість барвника до малих конформаційних змін (рис. 3.39 (а, б)).

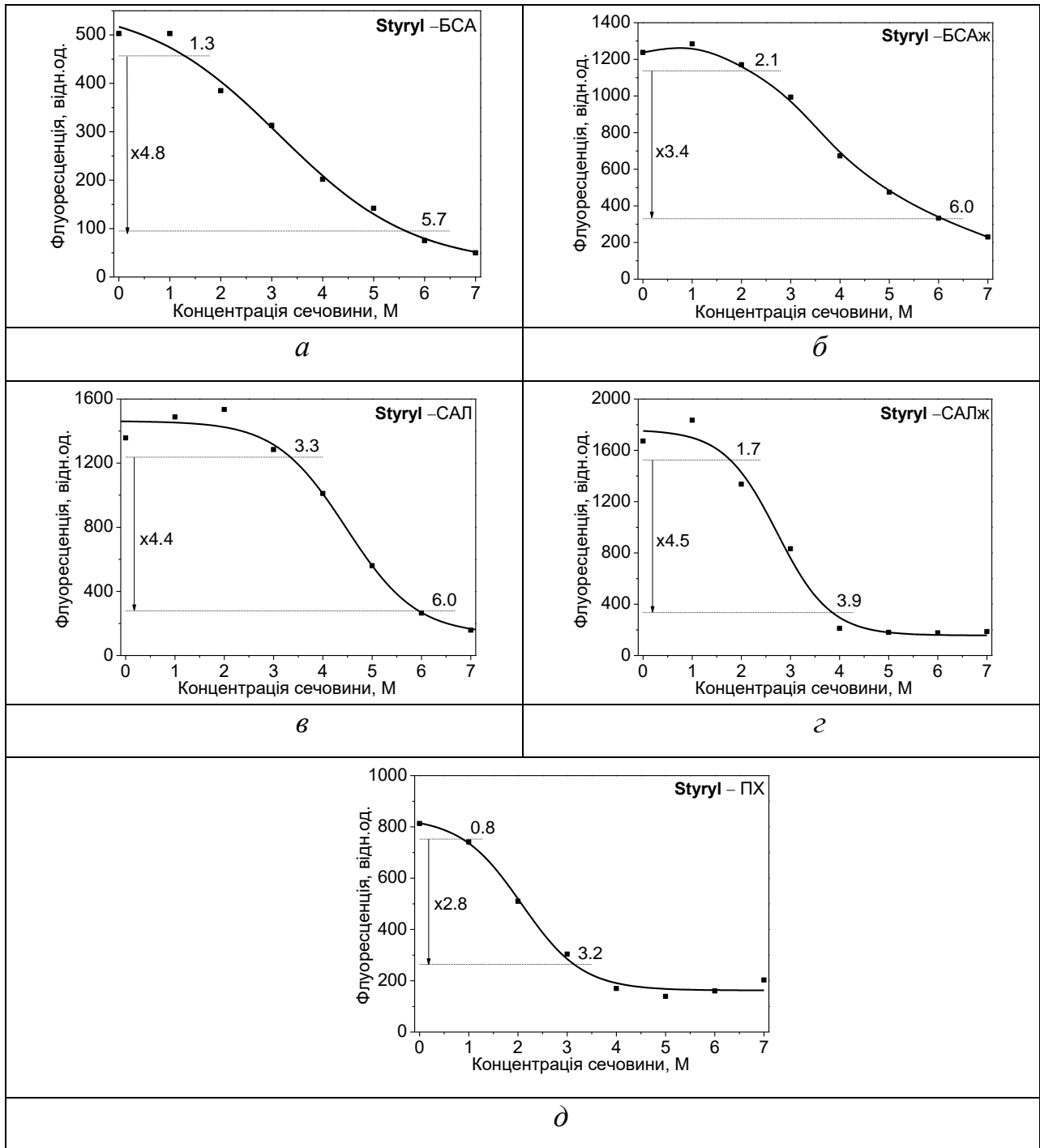


Рисунок 3.39 Залежність інтенсивності флуоресценції від концентрації сечовини комплексів **Styryl** з протеїнами ( $c_{\text{styryl}}=1\text{мкМ}$ ,  $c_{\text{протеїнів}}=1\text{мкМ}$ )

Чутливість барвника **Styryl** до конформаційних змін САЛ і САЛЖ майже не відрізняється за ДД, однак знаходиться у різному діапазоні конформаційних станів протеїнів. (рис. 3.39 (в, з)). У комплексі з САЛ барвник чутливий до великих конформаційних змін, в той час як у комплексі з САЛЖ до середніх. Зміни інтенсивності флуоресценції **Styryl**-ПХ (ДД=2.8) знаходиться на рівні чутливості сквараїнів, а флуоресцентний відгук барвника відбувається при малих і середніх конформаційних змінах протеїну (рис. 3.39 (д)).

### Висновки до розділу 3

1. Для отримання стабільних комплексів барвників з БСА необхідний час, протягом якого відбувається поступове зміщення максимуму спектра флуоресценції. При цьому спектральні властивості комплексів залежать від концентрації БСА, та при його певній концентрації відбувається насичення, тобто відсутність подальших спектральних змін. Найбільш придатними є барвники, для яких насичення відбувається при співвідношенні, близькому до еквімолярного.

2. Гідрофобні барвники **SqB1**, **SqCN1** і **nor-SqCN1** значно агрегують у присутності БСА, а з гідрофільними – **SqO2**, **SqB2**, **nor-SqO2**, **nor-SqB2**, **SqO4**, **SqCN4** за спектрами поглинання та флуоресценції утворення комплексів не відбувається. Найбільші спектральні зміни при утворенні комплексів спостерігаються для оксо- (**SqO1**, **nor-SqO1**, **SqO3**), диціанометиленових (**SqCN3**) сквараїнів та стирилового (**Styryl**) барвників, що не містять сульфогруп. При утворенні комплексів з БСА спектральні смуги барвників зсуваються у довгохвильову частину спектра на 10–36 нм відносно максимумів у водних розчинах, при цьому квантові виходи зростають до 47 разів. Норсквараїни є менш чутливими до присутності протеїну (БСА), ніж сквараїнові барвники, оскільки їх квантові виходи у присутності БСА змінюються в меншій мірі.

3. Дослідження комплексоутворення **SqO3**, **SqCN3** та **Styryl** з шістьма модельними протеїнами виявило, що спектральні властивості та квантові виходи

барвників залежать від типу протеїну, з яким утворюють комплекс. Відносно водного розчину, у присутності альбумінів (молекулярна маса ~66 кДа) барвники мають більші спектральні зміни, ніж з лізоцимом (найменший з досліджених протеїнів, з молекулярною масою 15 кДа). Сквараїни мають більшу чутливість до САЛ та присутності в ньому жирних кислот. Стирил, навпаки, має більшу чутливість до БСА та наявності у нього жирних кислот. В комплексах з ПХ барвники агрегують, через що їх напівширини поглинання збільшуються, а квантові виходи знижуються.

4. У розчинах сечовини **SqO3**, **SqCN3** та **Styryl**, Відносно властивостей барвників у РВ, максимуми поглинання/флуоресценції барвників зсуваються у довгохвильову область, а квантові виходи незначним чином зростають. Але зміни, що спостерігаються, є набагато меншими, ніж при утворенні комплексів з протеїнами.

5. Характер спектральних змін комплексів **SqO3**, **SqCN3** з БСА у часі залежить від концентрації сечовини у розчині. Присутність низьких концентрацій сечовини потребує найбільшого часу на встановлення рівноваги, а збільшення концентрації сечовини прискорює цей процес. Зростання концентрації сечовини змушує барвник переходити з протеїнової фази (з комплексу) до водного розчину, що є наслідком конформаційних змін в молекулах БСА, тобто розгортання їх третинної структури.

6. При денатурації, динамічний діапазон інтенсивності флуоресценції **SqO3**, **SqCN3** та **Styryl** змінюється у залежності від протеїну, з яким барвники утворюють комплекс. Найбільшу чутливість до конформаційних змін **SqO3** виявляє у комплексі з САЛ, **Styryl** з БСА, у той час як **SqCN3** не проявляє явної селективності до певного протеїну. Найменшу чутливість до конформаційних змін барвники мають у комплексі з ПХ.

Основні положення розділу 3 викладені у публікаціях автора [123, 125, 128, 146].

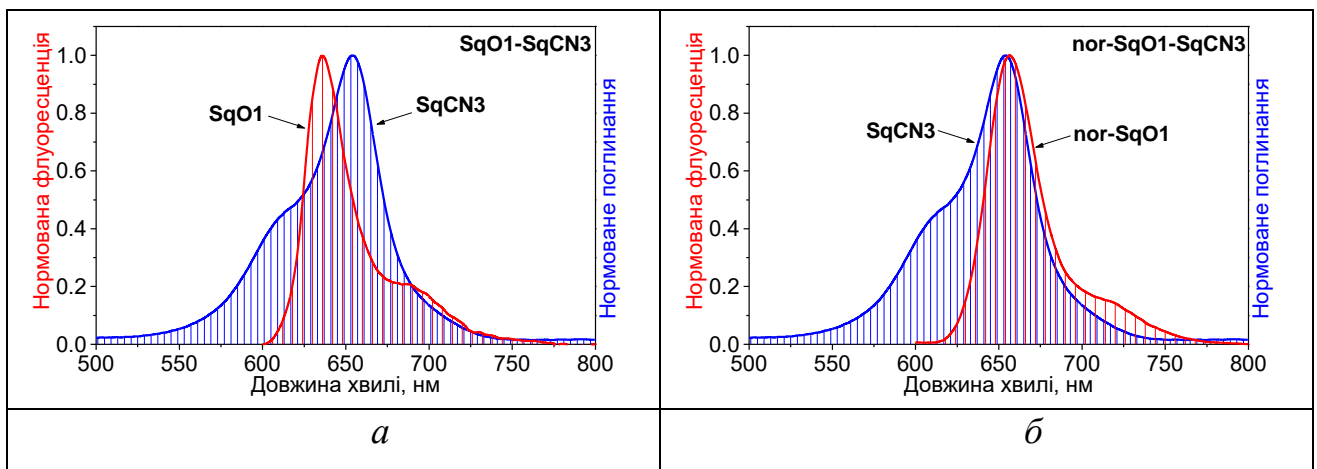
## РОЗДІЛ 4

### ВИКОРИСТАННЯ ДОНОРНО-АКЦЕПТОРНИХ ПАР БАРВНИКІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНФОРМАЦІЙНИХ ЗМІН ПРОТЕЇНІВ

#### 4.1 Донорно-акцепторні FRET пари барвників

У попередньому розділі ми обрали барвники для дослідження у FRET парах, які згідно їх максимумів поглинання та випромінювання, було розділено на пари: **SqO1-SqCN3**, **nor-SqO1-SqCN3**, **SqO3-SqCN3** та **Styryl-SqO3**. Таким чином, оксоскваїни, норскваїни та стириловий барвники використовували як донори, а в якості акцепторів були взяті довгохвильовий діціанометиленовий **SqCN3** та **SqO3**, який виступав акцептором для стирилового барвника. Тобто, скваїн **SqO3**, був використаний і як донор і як акцептор.

Залежність переносу енергії від відстані (розд.1), дозволяє використовувати метод FRET для визначення відстані між макромолекулами або частинами однієї біологічної молекули. Необхідною умовою для переносу енергії за механізмом Ферстера є перекриття спектру випромінювання донору зі спектром поглинання акцептору. Обрані нами барвники в комплексах з БСА мають добре перекриття спектрів (рис. 4.1), тому можуть утворювати донорно-акцепторні пари з ефективним ферстерівським резонансним переносом енергії електронного збудження (FRET).



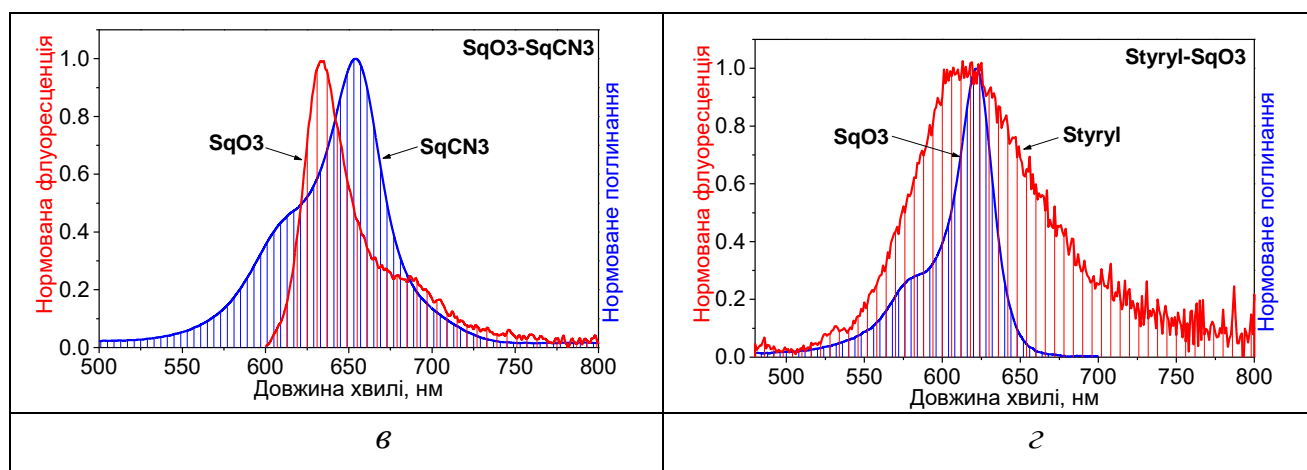


Рисунок 4.1 Перекриття спектрів флуоресценції донорів зі спектрами поглинання акцепторів в донорно-акцепторних парах **SqO1-SqCN3** (а), **nor-SqO1-SqCN3** (б), **SqO3-SqCN3** (в) та **Styryl-SqO3** (г) у присутності БСА

На основі експериментальних спектрів поглинання та флуоресценції барвників, їх квантових виходів та коефіцієнтів екстинкції ми розрахували інтеграл перекривання ( $J$ ) спектрів поглинання акцептору зі спектром флуоресценції донору, а також ферстерівський радіус резонансного переносу енергії ( $R_0$ ), що характеризують відстань, на якій ефективність переносу складає 50% [11]. Обчислювання проведено згідно з відомими формулами (розд. 5, формули 5.3, 5.4) [11].

В комплексах донор-БСА-акцептор (**SqO1-БСА-SqCN3**, **nor-SqO1-БСА-SqCN3**, **SqO3-БСА-SqCN3** та **Styryl-БСА-SqO3**), в яких барвники не були зв'язані з протеїном ковалентно, барвники мають добре перекриття спектрів, тому можуть утворювати донорно-акцепторні пари з ефективним FRET, що відображається великими значеннями їх інтегралів перекриття та ферстерівських радіусів (табл. 4.1).

Для спостереження FRET необхідно щоб середньостатистична відстань між молекулами донору і акцептору наближалася до ферстерівського радіусу ( $R_0$ ). При утворенні комплексів з протеїнами обидва барвники переходять з водної фази до протеїнової, що суттєво скорочує відстань між ними.

Таблиця 4.1

Інтеграл перекривання ( $J$ ) та ферстерівські радіуси переносу енергії ( $R_0$ ) для донорно-акцепторних пар

Донорно-акцепторна пара	$J$ , $M^{-1}cm^{-1}nm^4$	$R_0$ , $\text{Å}$
<b>SqO1–SqCN3</b>	$1.32 \times 10^{-12}$	61.4
<b>nor-SqO1–SqCN3</b>	$1.73 \times 10^{-12}$	66.5
<b>SqO3–SqCN3</b>	$1.44 \times 10^{-12}$	64.1
<b>Styryl–SqO3</b>	$0.90 \times 10^{-12}$	52.8

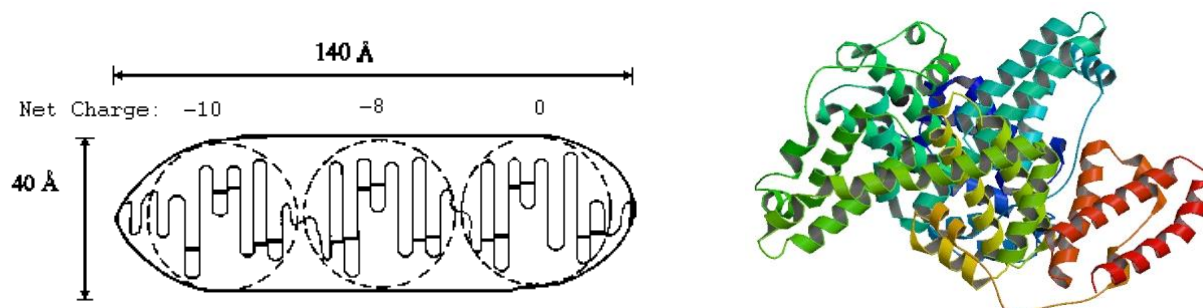


Рисунок 4.2 Модель молекули БСА

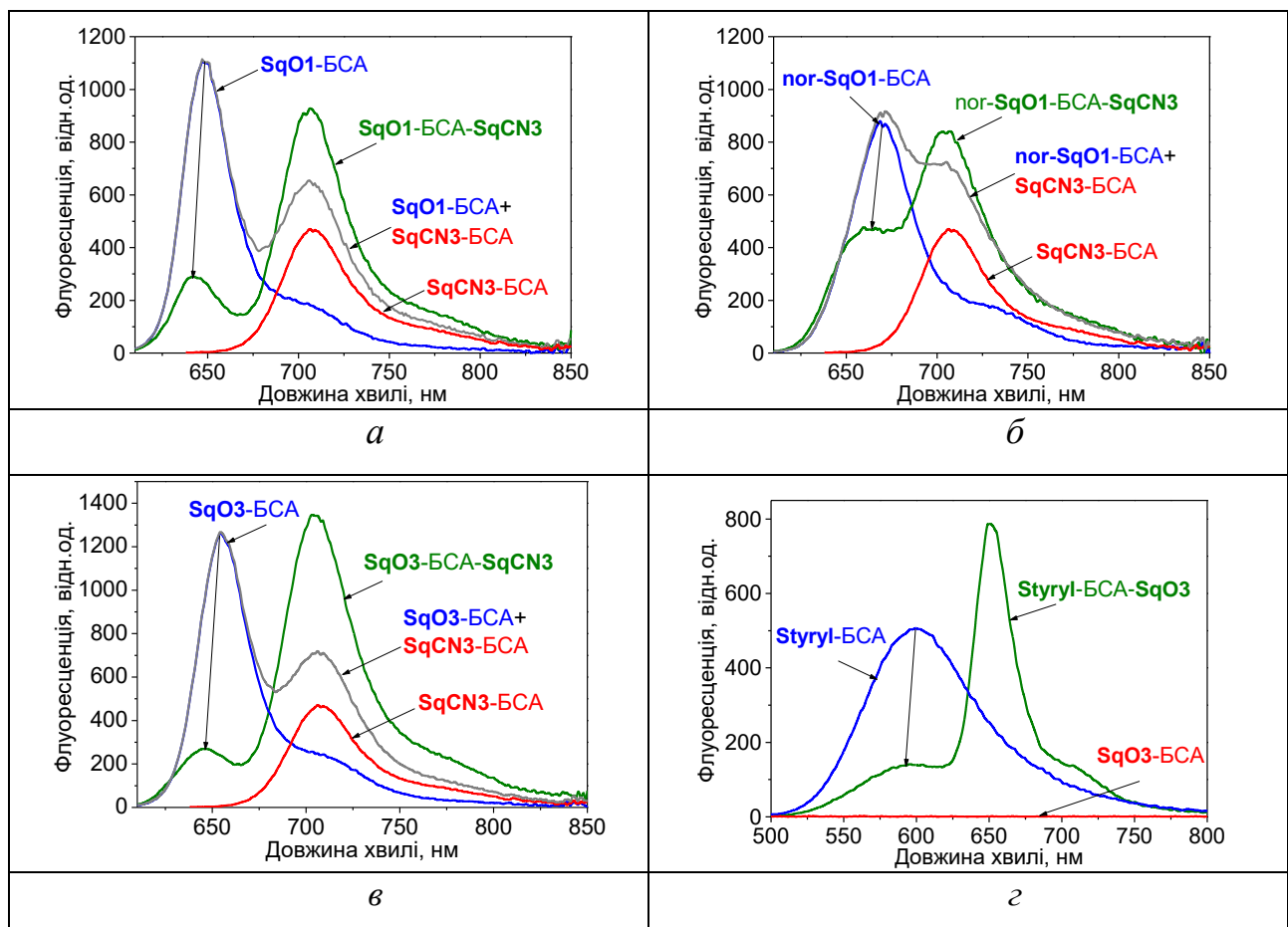
Беручи до уваги те, що для барвників  $R_0 \approx 30\text{--}60 \text{ Å}$  (табл. 4.1), а молекула БСА має розмір приблизно  $140 \text{ Å} \times 40 \text{ Å} \times 40 \text{ Å}$  (рис. 4.2) [178, 179, 180], слід очікувати, що для реалізації FRET та спостереження за змінами його ефективності при конформаційних змінах в молекулі протеїну, потрібно, щоб кожна молекула БСА статистично містила хоча б одну молекулу донора і одну молекулу акцептора, що відповідає обраній раніше (розділ 3) концентрації барвника та протеїну 1 мкМ.

#### 4.2 Перенос енергії з некон'югованого донора на некон'югований акцептор

Після вивчення впливу конформаційних змін протеїнів на властивості барвників в комплексах, ми перейшли до вивчення переносу енергії між двома барвниками, що не пов'язані з протеїном ковалентним зв'язком. Вимірювання

спектрів поглинання та флуоресценції проводили у розчинах сечовини з концентраціями від 0 до 7 М.

В спектрах флуоресценції „донор-БСА-акцептор” присутні дві смуги, що належать, відповідно, донору та акцептору. На [рис 4.3](#) наведено спектри флуоресценції комплексів барвників з БСА, що отримані на одній хвилі збудження: донора у відсутності акцептора (синій), акцептора у відсутності донора (червоний), подвійного комплексу „донор-БСА-акцептор” (зелений) та математичної суми спектрів донору та акцептора (сірий). У порівнянні з сумою спектрів комплексів донору та акцептора, в спектрі подвійного комплексу „донор-БСА-акцептор” смуга флуоресценції донора значно зменшується, в той час як смуга акцептору зростає, що свідчить про перенос енергії між барвниками [181].





## Продовження рисунку 4.3

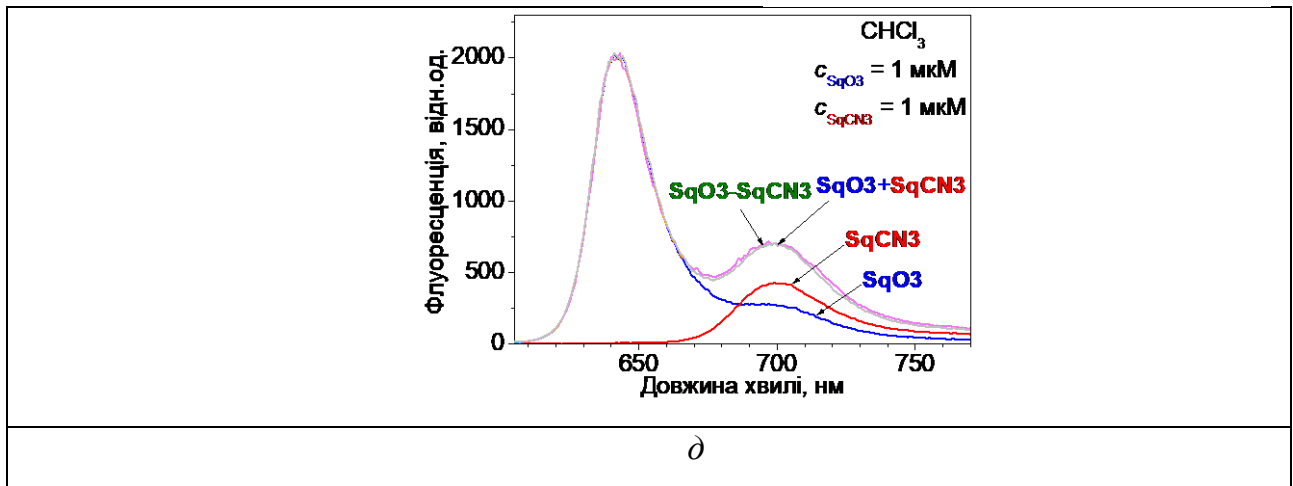


Рисунок 4.3 Спектри флуоресценції комплексів барвників з БСА для пар **SqO1–SqCN3** (а), **nor-SqO1–SqCN3** (б), **SqO3–SqCN3** (в), **Styryl–SqO3** (г) та у хлороформі для пари **SqO3–SqCN3**

У протилежність, якщо переносу енергії між барвниками не відбувається, математична сума спектрів донора та акцептора збігається з експериментальним сумісним спектром барвників. Це продемонстровано на [рис. 4.3](#) (д) для пари **SqO3–SqCN3** в хлороформі, у відсутності протеїну.

Внаслідок переносу енергії, інтенсивність флуоресценції донора у присутності акцептора зменшується, при цьому для всіх донорно-акцепторних пар зберігається співвідношення смуг, при якому інтенсивність смуги акцептора більша за інтенсивність смуги донора. Слід зазначити, що максимуми флуоресценції донорів **SqO1**, **nor-SqO1** та **SqO3** у присутності акцептора **SqCN3** зсуваються на  $\sim 6$  нм у коротку область та наближаються до максимумів випромінювання барвників у водному розчині. Водночас з цим, акцептор **SqCN3** не виявляє спектральних змін, максимум його флуоресценції становить 706 нм, як і в комплексі з БСА у відсутності донора ([табл. 3.3](#)). Отримані данні свідчать про витіснення акцептором **SqCN3** молекул донорів з подвійного протеїнового комплексу до водної фази. У протилежність до сквараїнових FRET-пар, у комплексі **Styryl-БСА-SqO3** обидва барвники мають максимуми флуоресценції, які відповідають знаходженню барвників у комплексі ([табл. 3.3](#)).

На основі даних отриманих зі спектрів флуоресценції донора у відсутності акцептора та флуоресценції подвійного комплексу ми розрахували уявну

ефективність переносу енергії ( $E_{\text{FRET}}$ ) та раціометричний параметр "FRET ratio" (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

**Уявна ефективність переносу енергії ( $E_{\text{FRET}}$ ) та FRET ratio донорно-акцепторних пар в комплексі з БСА**

Комплекс	$E_{\text{FRET}}$ , %	FRET ratio
<b>SqO1-БСА-SqCN3</b>	74	3.03
<b>nor-SqO1-БСА-SqCN3</b>	47	1.05
<b>SqO3-БСА-SqCN3</b>	81	4.82
<b>Styryl-БСА-SqO3</b>	71	4.75

Як можна бачити з отриманих даних, в одному протеїні досить велика розбіжність для пар як за уявною  $E_{\text{FRET}}$ , так і за FRET ratio, а найменші величини, що дорівнюють, відповідно, 47% та 1.05 спостерігаються в комплексі **nor-SqO1-БСА-SqCN3**. Для **nor-SqO1** положення максимуму флуоресценції у подвійному комплексі знаходиться при 663 нм (рис. 4.3), що майже дорівнює 659 нм у водному розчині (табл. 2.1). Враховуючи ці данні, можна зробити висновок, що більшість **nor-SqO1** у присутності **SqCN3** знаходиться не в протеїні, а в водному середовищі. Імовірніше за все, це пов'язано з низькою конформаційною лабільністю норсквараїна [123], через що він не утворює достатньо стійкого комплексу з БСА тому легше витісняється **SqCN3**, аніж подібні до нього сквараїни.

Для подальших досліджень ми обрали дві пари **SqO3-SqCN3** та **Styryl-SqO3**, які виявили найкращі результати. Обидві пари мають більші за інші пари величини FRET ratio, що повинно підвищити динамічний діапазон досліджень конформаційних змін протеїнів із використанням цих пар.

### 4.3 Вплив молярного співвідношення на перенос енергії між некон'югованими барвниками в БСА

На прикладі системи **SqO3-БСА-SqCN3** ми дослідити вплив молярного співвідношення окремих компонентів на перенос енергії між некон'югованими барвниками.

Ми припустили, що зменшення концентрації протеїну, відносно барвників, має підвищити уявну  $E_{\text{FRET}}$  та FRET ratio. Однак, при мольному співвідношенні **1 SqO3: 0.8 БСА: 1 SqCN3**  $E_{\text{FRET}}$  зростає незначною мірою, до 83%, але FRET ratio зменшується у 1.4 рази до 3.32, у порівнянні з системою **1 SqO3: 1 БСА : 1 SqCN3** (рис. 4.4, табл. 4.2).

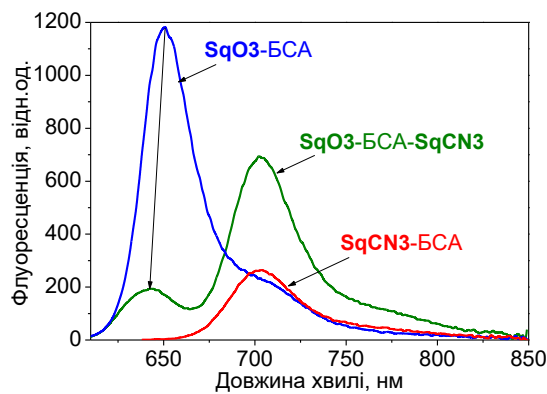


Рисунок 4.4 Спектри флуоресценції комплексів **SqO3** та **SqCN3** з БСА ( $c_{\text{SqO3}}=1$  мкМ,  $c_{\text{БСА}}=0.8$  мкМ,  $c_{\text{SqCN3}}=1$  мкМ)

Оскільки підвищення концентрації обох барвників не призводить до значного покращення уявної  $E_{\text{FRET}}$  та FRET ratio ми змінили концентрацію одного з барвників.

В спектрі поглинання подвійного комплексу при **1 SqO3: 1 БСА: 1 SqCN3** присутні дві смуги з максимумами 627 нм і 684 нм, що належать, відповідно, **SqO3** та **SqCN3** (рис. 4.5).

Згідно з даними у таблиці 3.3 положення смуги 627 нм свідчить про знаходження барвника **SqO3** переважно у водній фазі. Лише невелика частина молекул скварайну **SqO3** утворює комплекс з БСА, що проявляється у вигляді плеча на довгохвильовому схилі першої смуги (приблизно при 642 нм).

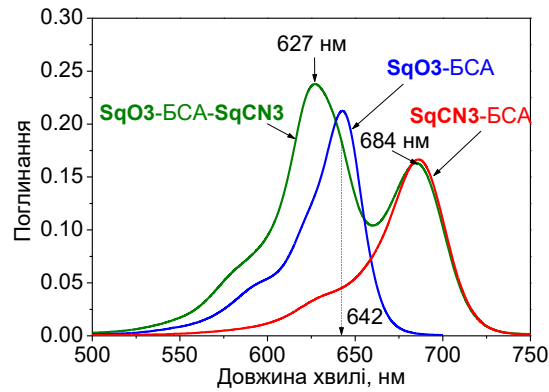


Рисунок 4.5 Спектри поглинання комплексів **SqO3** та **SqCN3** з БСА ( $c_{\text{SqO3}}=1$  мкМ,  $c_{\text{БСА}}=1$  мкМ,  $c_{\text{SqCN3}}=1$  мкМ)

Сквараїн **SqCN3**, як і очікувалося, утворює комплекс з БСА, на що вказує положення максимуму його поглинання при 684 нм та відсутність смуги з максимумом  $\sim 654$  нм, яке було б характерним для цього барвника у водній фазі. Таким чином, додавання сквараїну **SqCN3** до комплексу **SqO3** з БСА призводить до витіснення переважної кількості молекул **SqO3** з протеїнового комплексу до водної фази. Тому, ми збільшили концентрацію **SqO3** в системі до співвідношення **1.5 SqO3:1 БСА:1 SqCN3**. Це підвищило кількість донора, що знаходиться в комплексі з БСА, проте зменшило ефективність FRET до 69% та FRET ratio до 2.9 (рис. 4.6).

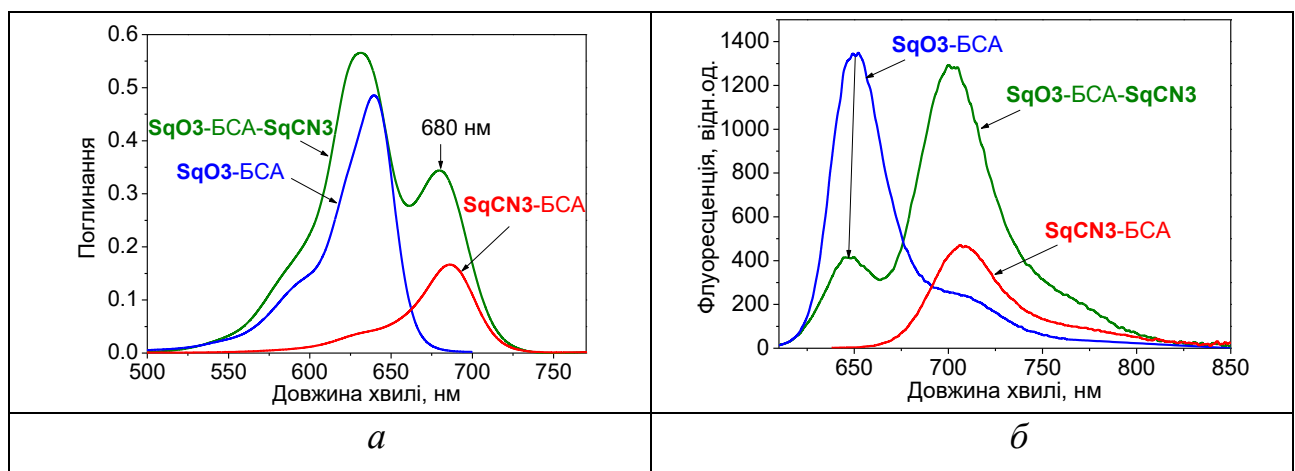


Рисунок 4.6 Спектри поглинання (а) та флуоресценції (б) комплексів **SqO3** та **SqCN3** з БСА ( $c_{\text{SqO3}}=1.5$  мкМ,  $c_{\text{БСА}}=1$  мкМ,  $c_{\text{SqCN3}}=1$  мкМ)

Такий результат можна пояснити лише витісненням **SqCN3** з БСА. Дійсно, максимум поглинання барвника в комплексі з БСА становить 684 нм

(табл. 3.3), а в подвійному комплексі при мольному співвідношенні  $1.5 \text{ SqO3}:1 \text{ BSA}:1 \text{ SqCN3}$  його максимум зсувається в короткохвильову область на 4 нм, що свідчить про перехід барвника до більш гідрофільного оточення. Через це, ми навпаки зменшили концентрацію донора та дослідили систему  $0.87 \text{ SqO3}:1 \text{ BSA}:1 \text{ SqCN3}$  (рис. 4.7).

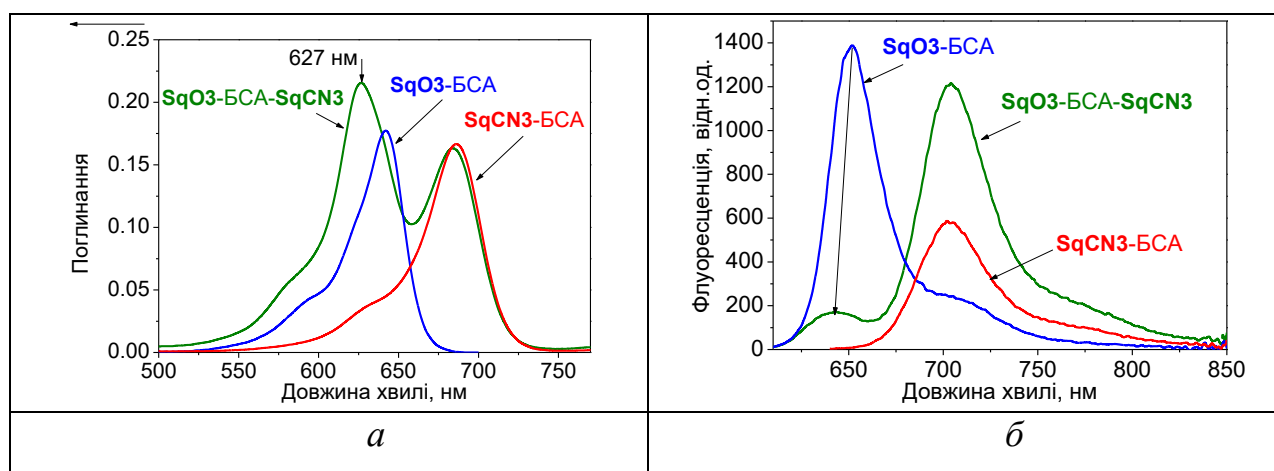


Рисунок 4.7 Спектри поглинання (а) та флуоресценції (б) комплексів **SqO3** та **SqCN3** з БСА ( $c_{\text{SqO3}}=0.87$  мкМ,  $c_{\text{BSA}}=1$  мкМ,  $c_{\text{SqCN3}}=1$  мкМ)

Для цієї системи максимум поглинання донору у присутності акцептора становить 627 нм, тобто **SqCN3**, як і у випадку еквімолярних концентрацій компонентів, витісняє **SqO3** з БСА до водної фази. Однак, величини уявної  $E_{\text{FRET}}$  та FRET ratio не зменшуються, а в протилежність значно збільшуються та сягають, відповідно, 88% та 7.0.

Таким чином, молярне співвідношення компонентів в системі **SqO3**–БСА–**SqCN3** впливає на ефективність переносу енергії та FRET ratio. При еквімолярних концентраціях **SqCN3** витісняє донор з БСА, однак підвищення концентрації **SqO3** призводить до витіснення акцептора та значному зменшенню уявної  $E_{\text{FRET}}$  і FRET ratio. Збільшення концентрації обох барвників відносно БСА не призводить до значних змін уявної  $E_{\text{FRET}}$  та зменшує величину FRET ratio. Однак, при зменшенні концентрації донора, відносно БСА та **SqCN3**, в системі спостерігається значне зростання величин уявної  $E_{\text{FRET}}$  та FRET ratio. Тому ми дослідили вплив конформаційних змін БСА на перенос енергії між барвниками для двох систем  $0.87 \text{ SqO3} : 1 \text{ BSA} : 1 \text{ SqCN3}$  та  $1 \text{ SqO3} : 1 \text{ BSA} : 1 \text{ SqCN3}$ .

#### 4.4 FRET у системі **SqO3**-протеїн-**SqCN3**

За допомогою сквараїнової пари барвників **SqO3-SqCN3** конформаційні зміни БСА ми досліджували при двох концентраціях **SqO3**, які дорівнювали 0.87 мкМ та 1 мкМ.

На **рис. 4.8** наведено спектри поглинання та флуоресценції **SqO3**-БСА-**SqCN3** при концентрації **SqO3** 0.87 мкМ.

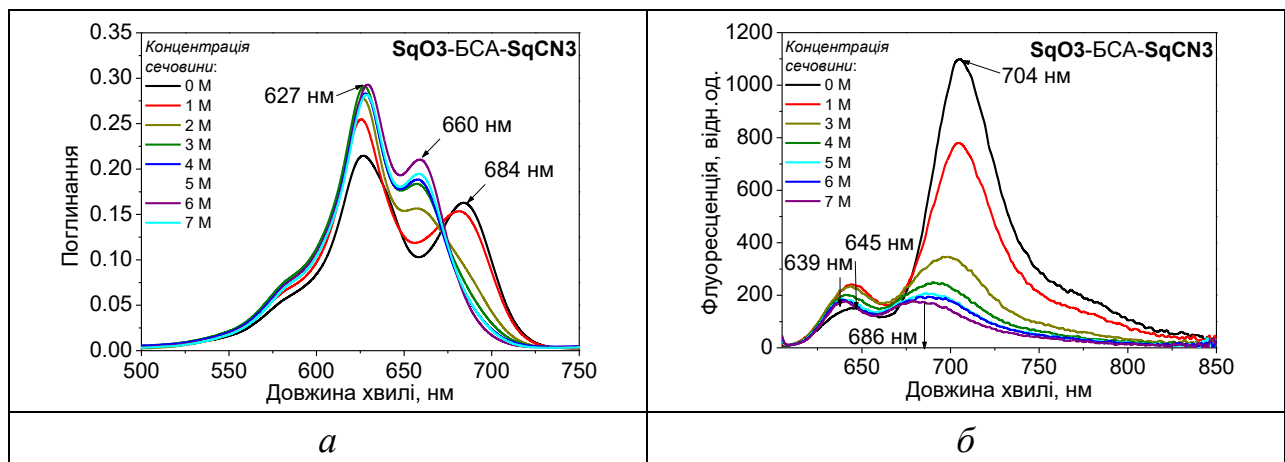


Рисунок 4.8 Спектри поглинання (а) і флуоресценції (б) 0.87 **SqO3**-1 БСА-1 **SqCN3** у розчинах сечовини від 0 до 7 М

Додання сечовини збільшує абсорбцію донору **SqO3** (627 нм) та зменшує абсорбцію акцептору **SqCN3** (684 нм). Максимум індивідуальної смуги **SqO3** відповідає водному оточенню барвника та з ростом концентрації сечовини її інтенсивність зростає (**рис. 4.8 (а)**), тобто **SqCN3** витісняє **SqO3** з гідрофобних кишень протеїну, через що **SqO3** знаходиться на поверхні БСА та стає доступним водному оточенню, утворюючи комплекси за рахунок специфічних або/та електростатичних взаємодій. Індивідуальна смуга поглинання акцептору зазнає значних змін, що призводить до зміни форми спектрів адсорбції. Внаслідок розгортання третинної структури протеїну, барвник **SqCN3** переходить до водної фази, через це при концентрації сечовини  $\sim 3$  М з'являється нова смуга поглинання з максимумом 660 нм, що дорівнює поглинанню вільного барвника у 7 М розчині сечовини [128].

Інтенсивність флуоресценції донору **SqO3** (смуга з максимумом 645 нм) при збільшенні концентрації сечовини до 1÷3 М спочатку зростає в 1.6 рази без

зміщення максимуму, а при більших концентраціях сечовини починає зменшуватися та зсуватися у короткохвильову область до 639 нм. Інтенсивність флуоресценції акцептору **SqCN3** (смуга з максимумом 704 нм) при збільшенні концентрації сечовини знижується у 6.2 рази, а максимум флуоресценції поступово зміщується з 704 нм до 686 нм.

Зазначені зміни в спектрах поглинання та флуоресценції свідчать про розгортання молекули БСА при збільшенні концентрації сечовини, в результаті чого молекули донору і акцептору переходять з протеїну до водної фази. Це призводить до змін в переносі енергії між двома барвниками **рис. 4.9**.

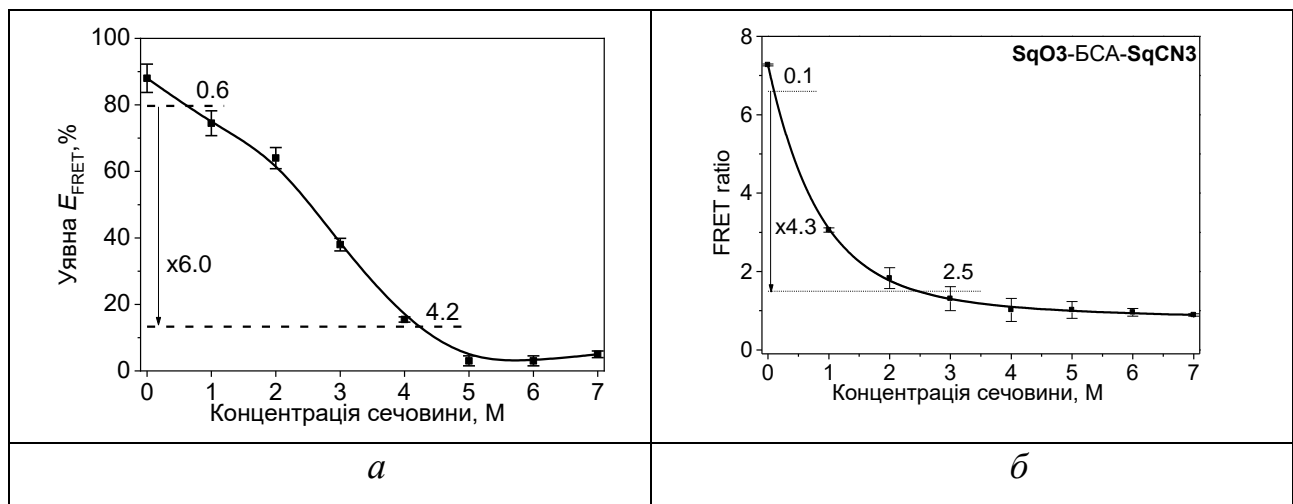


Рисунок 4.9 Залежності уявної  $E_{\text{FRET}}$  (а) та FRET ratio (б) від концентрації сечовини для системи **0.87 SqO3-1 БСА-1 SqCN3**

При наявності надлишку акцептору над донором ефективність переносу енергії змінюється у 6.0 разів (**рис.4.9 (а)**) [182]. За методом  $E_{\text{FRET}}$  зміни відбуваються при концентраціях сечовини 0.6-4.2 М, тобто цей метод чутливий до малих й середніх конформаційних змін БСА. Чутливість методу FRET ratio до конформаційних змін протеїну у 1.4 рази менша, за цим методом ДД сягає лише 4.3 рази. Також зменшується і діапазон конформаційних змін, які можливо реєструвати за цим методом. За методом FRET ratio в системі **0.87 SqO3-1 БСА-1 SqCN3** можливо виявити тільки малі конформаційні зміни протеїну.

Далі ми перейшли до досліджу переносу енергії при еквімолярному співвідношенні компонентів в системі. Спектри поглинання та флуоресценції

подвійних комплексів **SqO3-BCA-SqCN3** і **SqO3-BCAж-SqCN3** наведені на рис. 4.10.

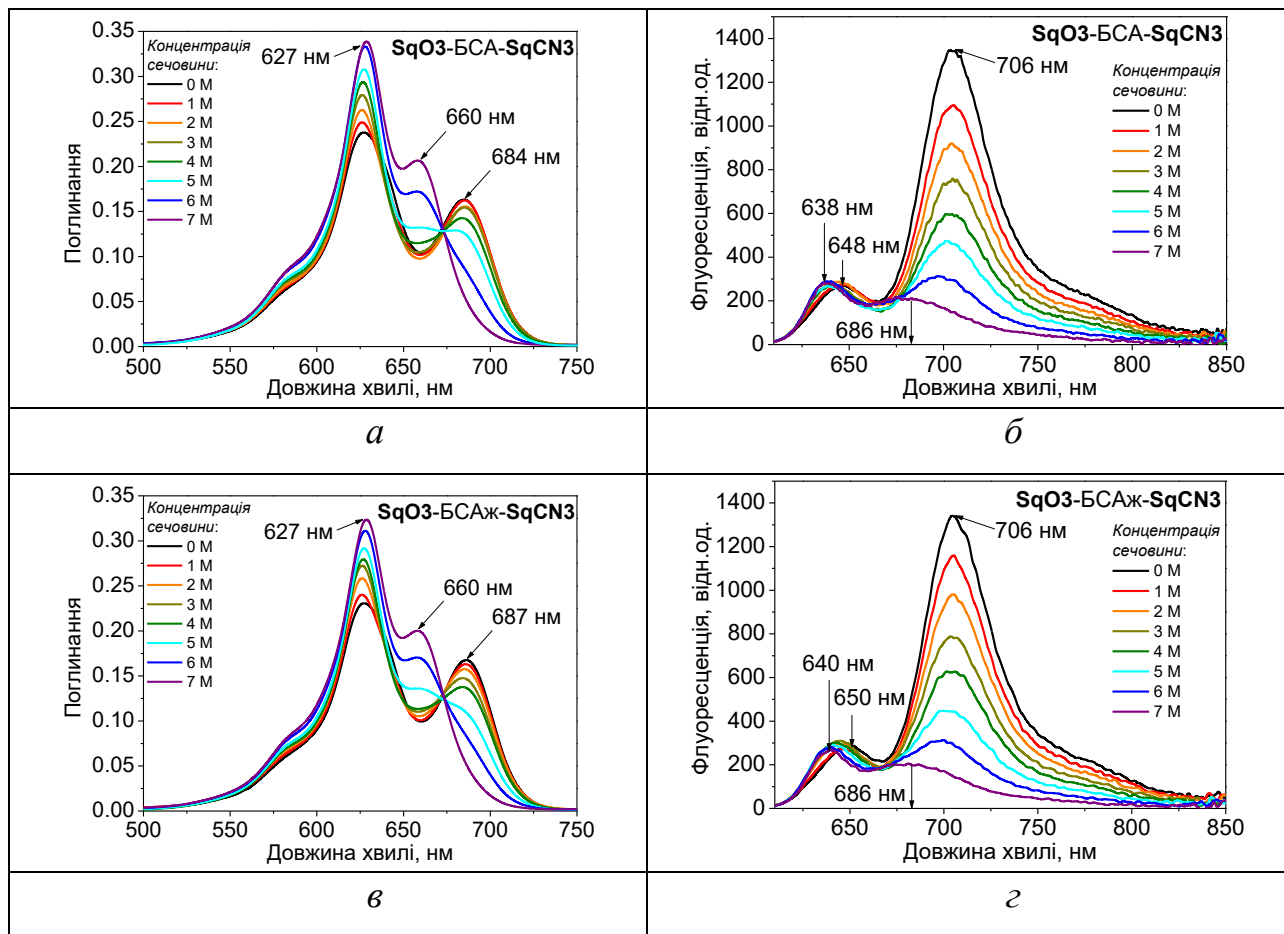


Рисунок 4.10 Спектри поглинання та флуоресценції **SqO3-BCA-SqCN3** (а, б) та **SqO3-BCAж-SqCN3** (в, г) у розчинах сечовини від 0 до 7 М

В означених комплексах індивідуальна смуга поглинання **SqO3** (донор) становить 627 нм та її інтенсивність зростає з ростом концентрації сечовини [183]. Максимуми смуг поглинання **SqCN3** 684 нм і 687 нм відповідають знаходженню барвника в комплексі з, відповідно, БСА та БСАж (табл.3.3.). При розгортанні обох альбумінів **SqCN3** переходить до водної фази при ~5 М сечовини. В спектрах випромінювання, навпаки, з ростом концентрації сечовини інтенсивність індивідуальної смуги **SqO3** не змінюється, а положення максимуму зміщується у короткохвильову область на 10 нм для обох комплексів [184]. Смуга випромінювання **SqCN3**, як для БСА так і для БСАж, зміщується на ~18 нм у короткохвильову частину спектру та її інтенсивність зменшується в ~6.5 разів.



Залежності уявної  $E_{\text{FRET}}$  та FRET ratio від концентрації сечовини для пари **SqO3-SqCN3** з бичачими альбумінами наведено на [рис. 4.11](#).

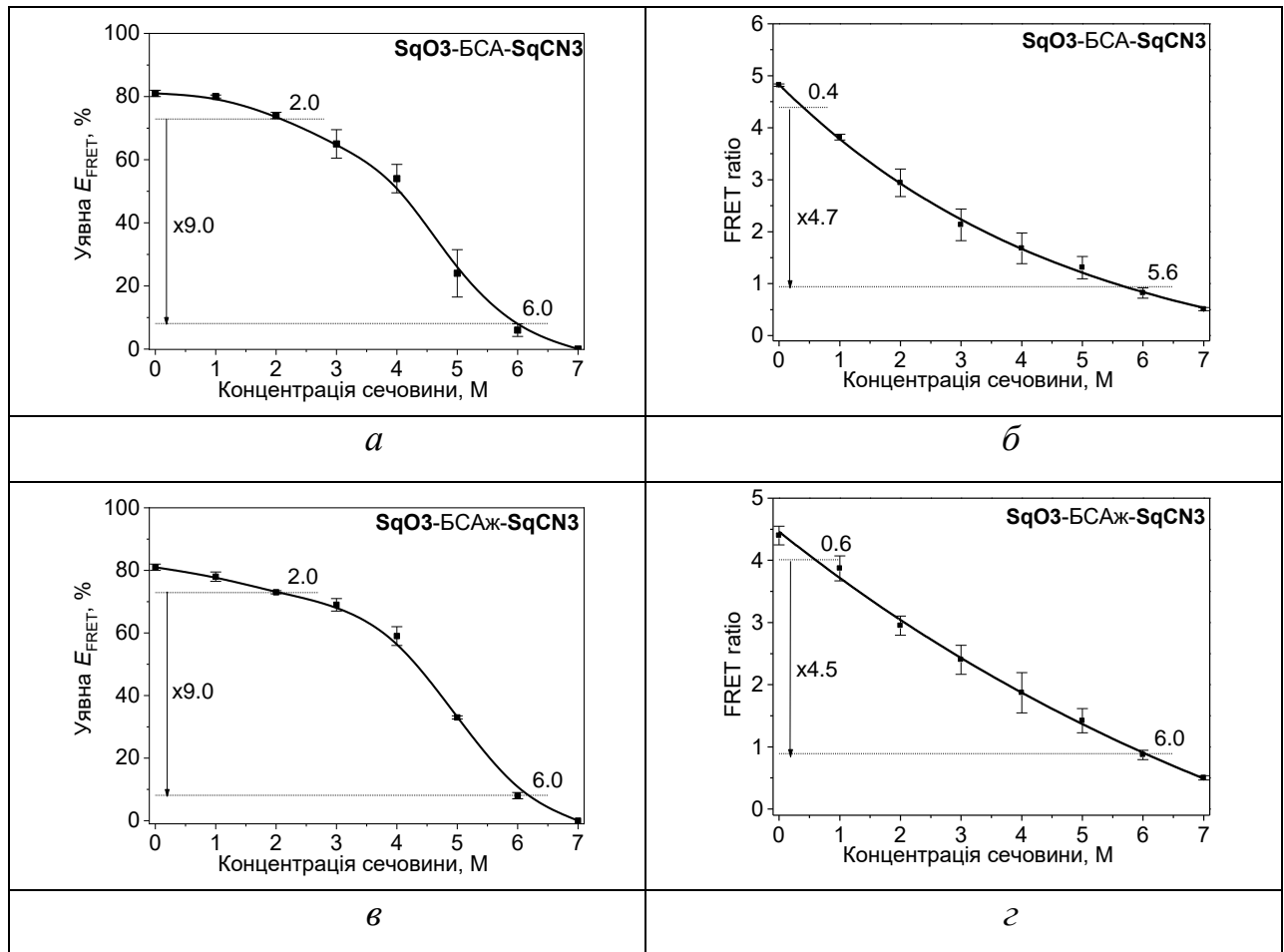


Рисунок 4.11 Залежності уявної  $E_{\text{FRET}}$  та FRET ratio від концентрації сечовини для **SqO3-BCA-SqCN3** (а, б) і **SqO3-BCAJ-SqCN3** (в, з)

Розрахунки за методом  $E_{\text{FRET}}$  для комплексів збігаються, зміна ДД сягає 9.0 разів ([рис. 4.11](#) (а, в)), а чутливість методу відноситься до середніх та значних конформаційних змін протеїнів [185, 186]. Зміни ДД методу FRET ratio виявилися у  $\sim 2$  рази менші, а ніж методу  $E_{\text{FRET}}$  [рис. 4.11](#) (б, з) [184]. Однак, цей метод є чутливим у значно більшому діапазоні конформаційних змін протеїнів, що може бути переважним для медико-біологічних досліджень.

Спектри поглинання та флуоресценції подвійних комплексів **SqO3-SqCN3** з альбумінами людини подібні до таких з бичачими альбумінами ([рис. 4.12](#)).

Максимум смуги поглинання **SqO3** також становить 627 нм, а її інтенсивність зростає зі збільшенням концентрації сечовини.

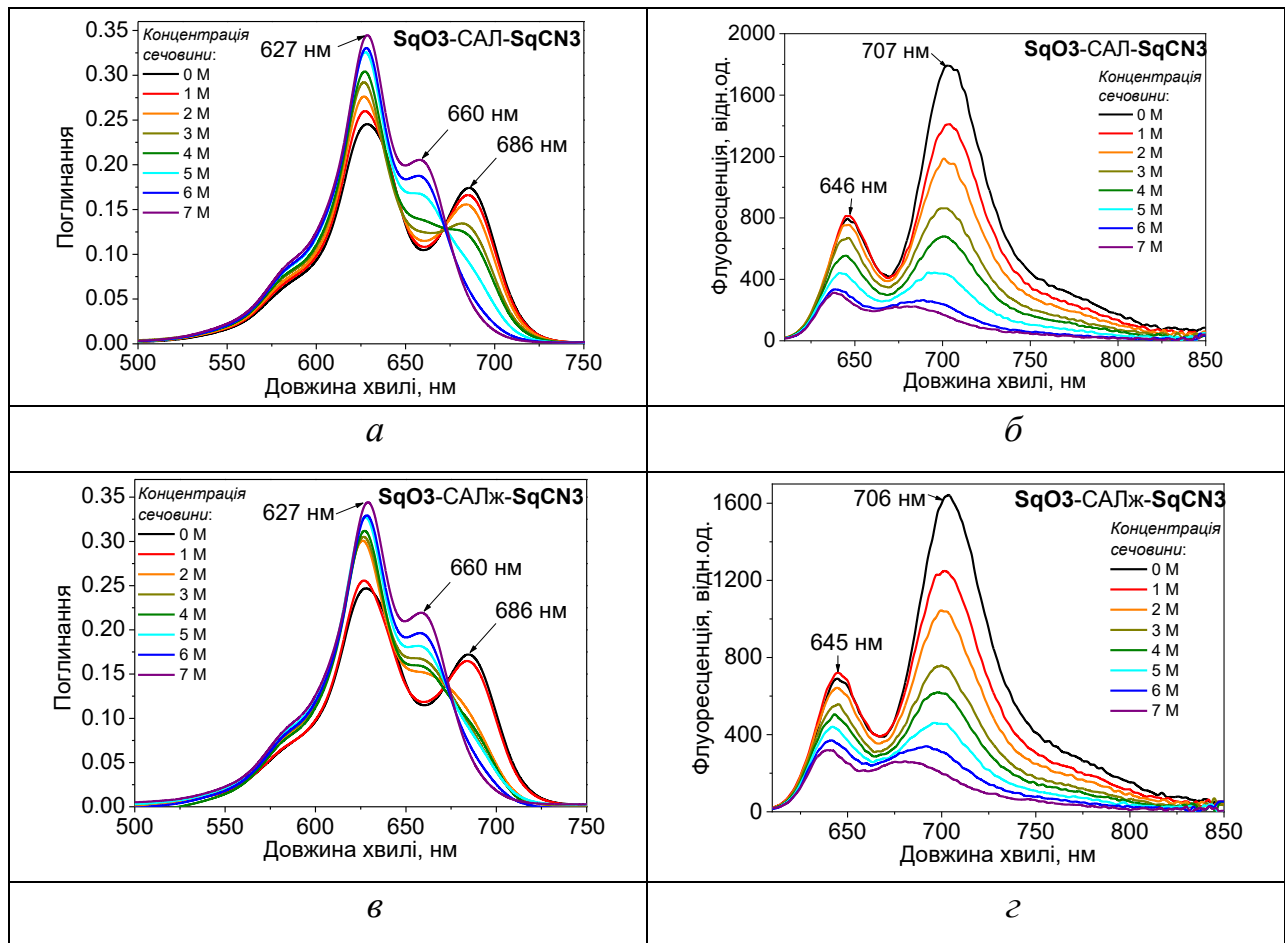


Рисунок 4.12 Спектри поглинання та флуоресценції **SqO3-CAL-SqCN3** (а, б) та **SqO3-CALж-SqCN3** (в, г) у розчинах сечовини від 0 до 7 М

При концентрації сечовини 0–1 М акцептор **SqCN3** знаходиться в комплексі з протеїнами (686 нм) та стає доступним розчиннику при ~5 М сечовини для САЛ та при ~2 М для САЛж.

На відміну від комплексів з бичачими альбумінами, інтенсивність випромінювання смуги **SqO3** у подвійних комплексах з альбумінами людини зменшується в ~2 рази, а максимуми зсуваються у короткохвильову область на 8 нм. В спектрах флуоресценції інтенсивність смуги **SqCN3** з САЛ і САЛж зменшується, відповідно, у 8.0 та 6.5 разів, а максимум зсувається у короткохвильову область на 18 нм для обох комплексів.

Для **SqO3-CAL-SqCN3**, за методом  $E_{\text{FRET}}$ , величина ДД дорівнює 9.0 та співпадає з такими для бичачих альбумінів [рис 4.13](#).

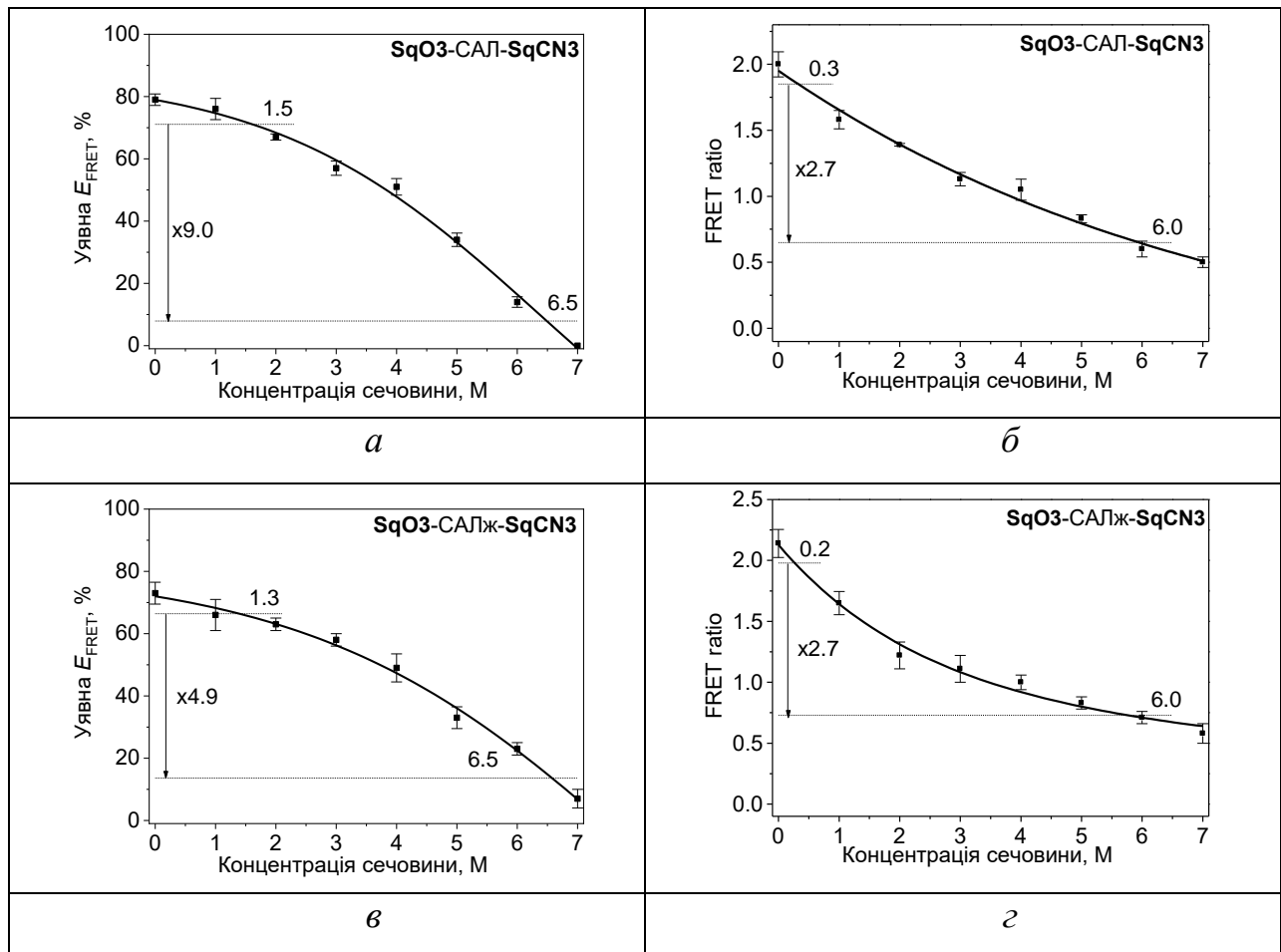


Рисунок 4.13 Залежності уявної  $E_{FRET}$  та FRET ratio від концентрації сечовини для **SqO3-CAL-SqCN3** (а, б) і **SqO3-CALж-SqCN3** (в, з)

Однак, на відміну до бичачих альбумінів, наявність жирних кислот у САЛЖ за методом  $E_{FRET}$  суттєво впливає на ДД, який знижується майже у два рази та незначною мірою підвищує чутливість до малих конформаційних змін при низьких концентраціях сечовини (рис. 4.13 (а, в)). За методом FRET ratio, ДД флуоресцентних змін подвійних комплексів з альбумінами людини збігаються, та встановлюють 2.7, що  $\sim 3.3$  рази менше ніж для методу  $E_{FRET}$ , проте при використанні методу FRET ratio значно підвищується чутливість пари **SqO3-SqCN3** до малих конформаційних змін САЛ та САЛЖ.

На відміну від альбумінів, в подвійному комплексі з ПХ максимум смуги поглинання **SqO3** становить 624 нм. При збільшенні концентрації сечовини смуга оксоскваріну зсувається на 5 нм у довгохвильову область, а її інтенсивність зростає у 1.2 рази (рис. 4.14 (а)). Максимум поглинання індивідуальної смуги **SqCN3** при 679 нм у відсутності сечовини, свідчить про

знаходження барвника у комплексі з ПХ, однак, вже при 2 М сечовини більшість барвника переходить до водної фази. В спектрах випромінювання **SqO3**–ПХ–**SqCN3** максимум смуги **SqO3** не змінюється, а інтенсивність її зростає у 1.2 рази. Інтенсивність флуоресценції індивідуальної смуги **SqCN3** знижується у 3.5 рази, а максимум зсувається у короткохвильову область на 22 нм (рис. 4.14 (б)).

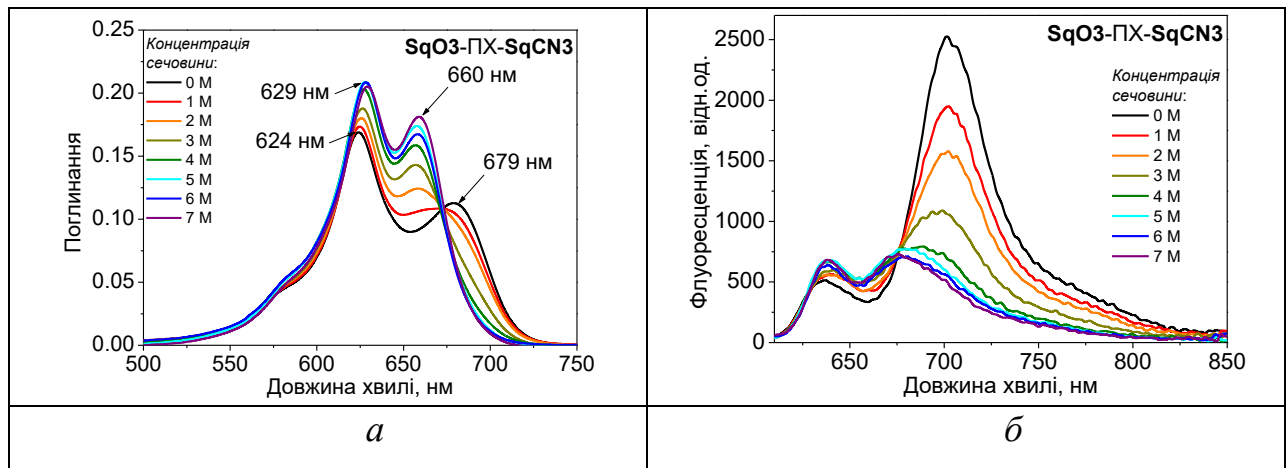


Рисунок 4.14 Спектри поглинання (а) та флуоресценції (б) **SqO3**-ПХ-**SqCN3** у розчинах сечовини від 0 до 7 М

Комплекс **SqO3**-ПХ-**SqCN3** відрізняється низьким ДД як за методом  $E_{\text{FRET}}$  (ДД=3.2) так і за методом FRET ratio (ДД=3.8) (рис. 4.15).

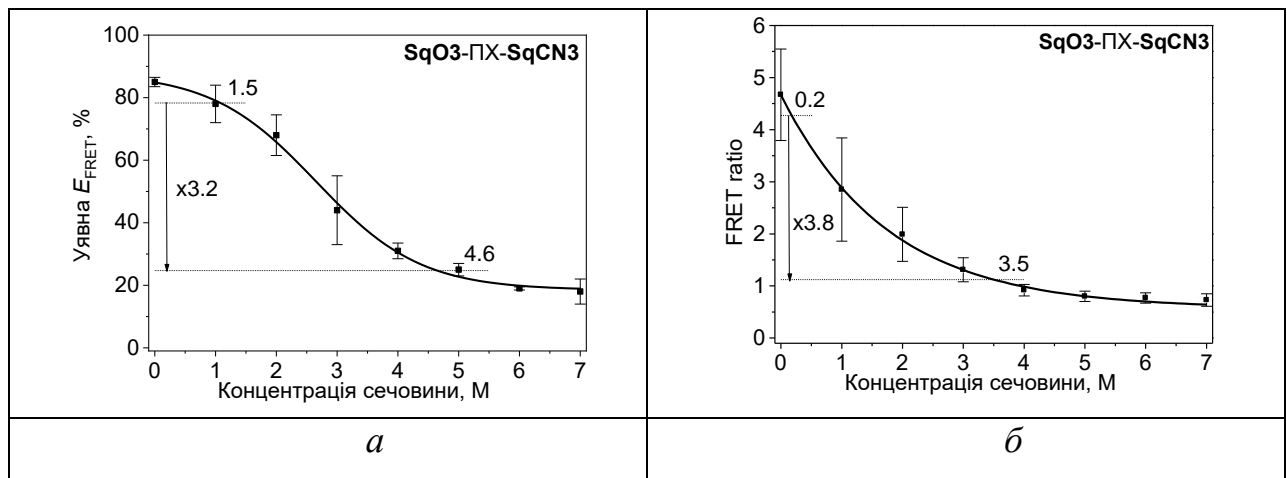


Рисунок 4.15 Залежності уявної  $E_{\text{FRET}}$  та FRET ratio від концентрації сечовини для подвійних комплексів **SqO3** і **SqCN3** з пероксидазою хрому (**SqO3**–ПХ–**SqCN3**)

Зміни ефективності переносу відбуваються при концентрації сечовини в діапазоні 1.0-5.0 М, тобто за цим параметром пара **SqO3-SqCN3** має більшу чутливість до малих та середніх конформаційних змін ПХ. Чутливість методу FRET ratio знаходиться в діапазоні 0.2-3.5 М сечовини, разом з тим, саме в цьому діапазоні вимірювана величина має найбільший розмах, що виключає точні дослідження. Скоріш за все нестабільність системи **SqO3-ПХ-SqCN3** пов'язана з малими розмірами протеїну, з яким обидва скварайни одночасно не можуть утворювати комплексів у гідрофобних кишнях протеїну.

В лізоцимі, що є найменшим з досліджених протеїнів, перенос енергії між скварайнами взагалі не спостерігається (рис. 4.16), оскільки математична сума спектрів **SqO3-лізоцим** та **SqCN3-лізоцим** дорівнює експериментальному спектру подвійного комплексу.

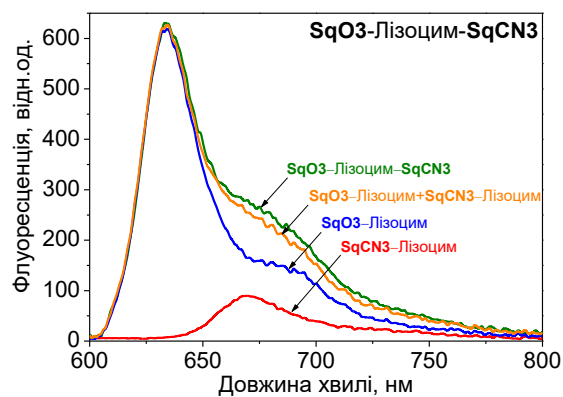


Рисунок 4.16 Спектри флуоресценції **SqO3** і **SqCN3** з лізоцимом та **SqO3-лізоцим-SqCN3**

Таким чином, ми виявили, що оцінювання конформаційних змін протеїнів за допомогою FRET-пари **SqO3-SqCN3** залежить від співвідношення барвників, протеїну з яким вони утворюють комплекс та методу розрахунку. Зменшення концентрації **SqO3**, відносно БСА та **SqCN3** за методом  $E_{\text{FRET}}$  призводить до зменшення в 1.5 рази ДД, однак, на відміну від еквімолярного співвідношення компонентів, дозволяє виявляти малі конформаційні зміни БСА. За методом FRET ratio зменшення концентрації донора не призводить до значних відмін у ДД, проте при співвідношенні 1:1 барвники чутливі до всього діапазону конформаційних змін БСА, а при 0.87:1 лише до малих.

Для сквараїнової пари метод  $E_{\text{FRET}}$  показав більшу чутливість до зміни конформації протеїнів. Але для всіх досліджених протеїнів обчислювання за методом FRET ratio дозволяють виявляти конформаційні зміни при меншому впливу сечовини, ніж за методом  $E_{\text{FRET}}$ . Достовірність досліджень конформації протеїнів в комплексах з сквараїнами значно знижується при зменшенні молекулярної маси протеїну. Та при малих розмірах перенос енергії не відбувається взагалі [184, 187].

#### 4.5 FRET в системі **Styryl-протеїн-SqO3**

Далі ми дослідили перенос енергії під впливом сечовини в системі **Styryl-протеїн-SqO3**. Барвники стирил **Styryl** (донор) та сквараїн **SqO3** (акцептор) належать до різних класів та, на відміну від донорно-акцептоної пари сквараїнів, поглинають у різних частинах спектру.

Зміни спектрів поглинання та випромінювання комплексів **Styryl-БСА-SqO3** та **Styryl-БСАж-SqO3** подібні між собою. Стирил **Styryl** у подвійному комплексі з бичачими альбумінами, не виявляє спектральних змін у поглинанні (рис. 4.17 (а, в)). Для сквараїна **SqO3**, з ростом кількості сечовини у розчині, максимуми поглинання барвника зсуваються з 642 нм (протеїн) до 627 нм (розчин сечовини) [146]. Проте зсув смуги поглинання **SqO3** в комплексі **Styryl-БСА-SqO3** відбувається при 1 М сечовини, а в **Styryl-БСАж-SqO3** при 2 М сечовини, тобто пара **Styryl-SqO3** чутлива до присутності жирних кислот у БСА. У подальших концентраціях сечовини інтенсивність смуги поглинання **SqO3** при 627 нм зростає у ~1.5 рази для обох комплексів.

У спектрах випромінювання подвійних комплексів, інтенсивність індивідуальної смуги **Styryl** змінюється подібно до комплексів стирил-протеїн. При концентраціях сечовини до 4 М, через розпушення щільної упаковки протеїнів інтенсивність флуоресценції стирилу зростає. При більших концентраціях сечовини, коли гідрофобні області протеїнів стають доступними для розчинника, смуга **Styryl** зсувається у довгохвильову область на 13 нм для обох комплексів, а її інтенсивність зменшується [146]. Денатурація протеїнів

також призводить до зниження інтенсивності флуоресценції смуги **SqO3** в 14 разів (БСА) і в 10 разів (БСАж) та її короткохвильових зсувів на 5 нм (БСА) і 10 нм (БСАж) (рис. 4.10 (б, з)). Тобто, конформаційні зміни протеїну призводить до зміни полярності оточення барвників, а через позитивний (**Styryl**) та негативний (**SqO3**) сольватифлуорохромізм, смуги барвників при зсуві наближаються одна до одної.

Для пари стирил-сквараїн у бичачих альбумінах більш чутливим методом визначення змін є FRET ratio. За цим методом ДД становить 5.2 для **135**–БСА–**SqO3** і 6.0 для **Styryl**–БСАж–**SqO3**, що значно вище розрахунків методом  $E_{\text{FRET}}$ , за якими ДД для комплексу з БСА дорівнює лише 1.9 та 3.2 для комплексу з БСАж (рис. 4.18). Однак, метод  $E_{\text{FRET}}$  дозволяє визначити більший діапазон конформаційних змін альбумінів бика (рис. 4.18 (а, в)) [184].

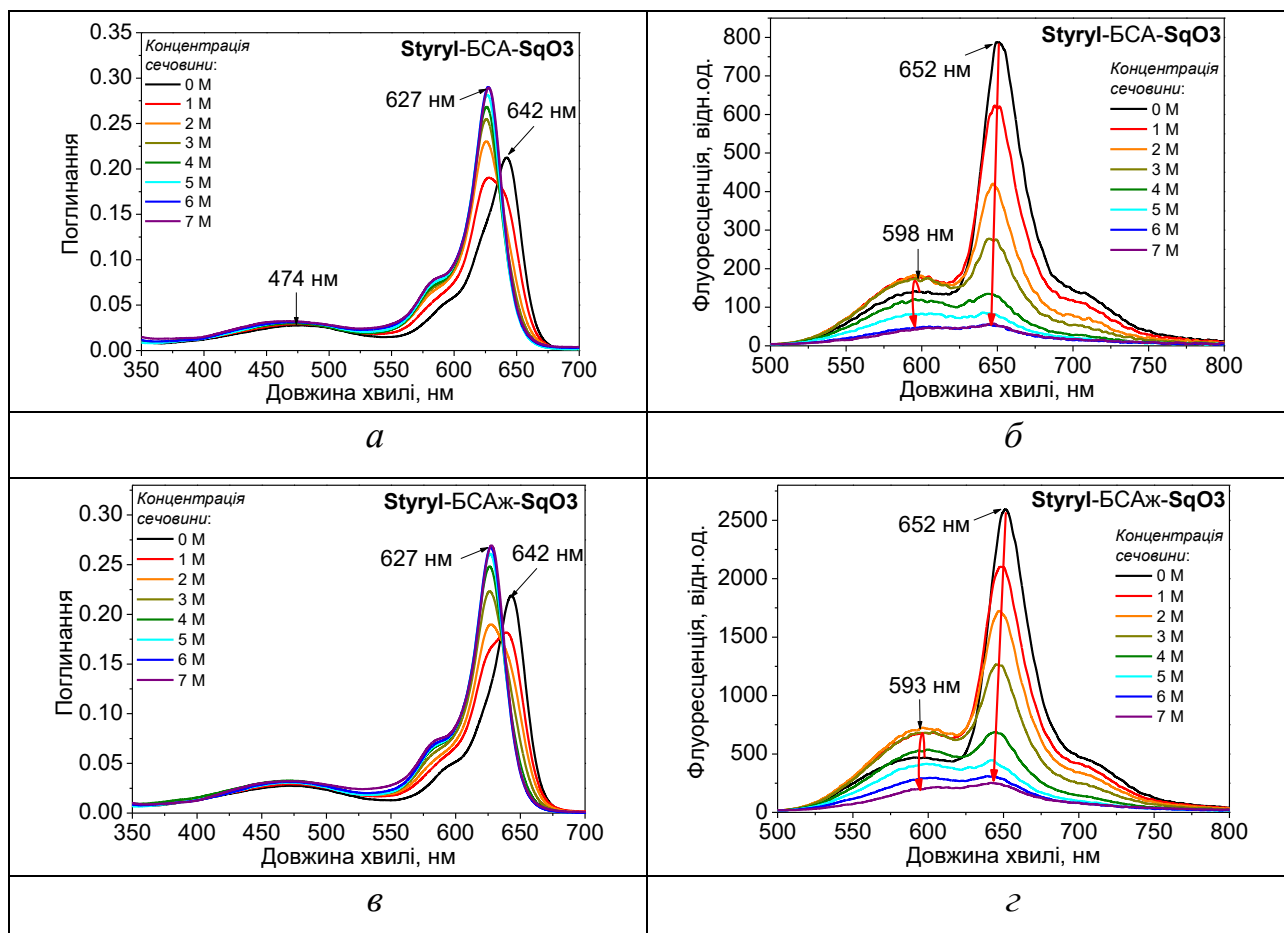


Рисунок 4.17 Спектри поглинання та флуоресценції **Styryl**–БСА–**SqO3** (а, б) та **Styryl**–БСАж–**SqO3** (в, з) у розчинах сечовини від 0 до 7 М

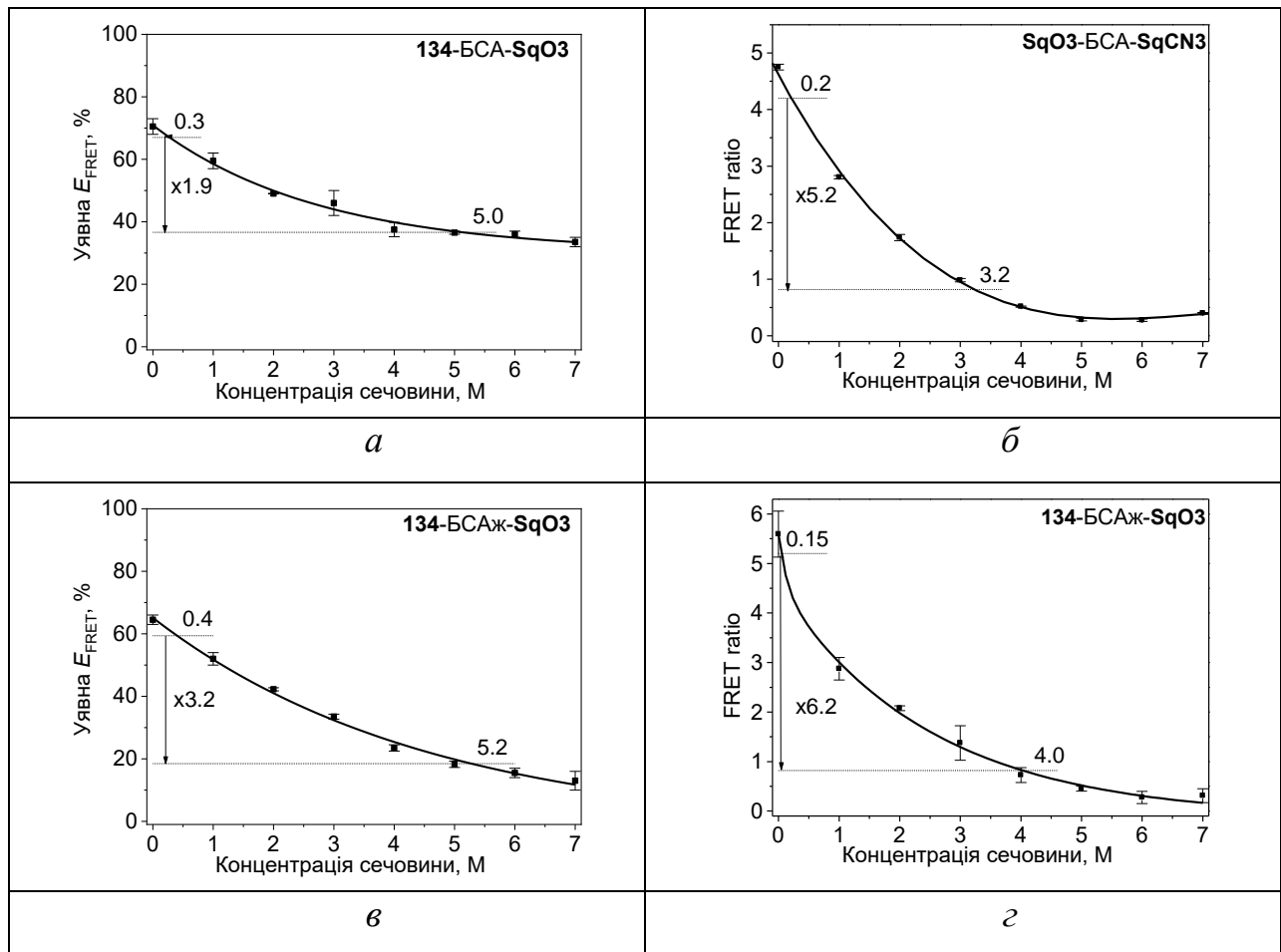


Рисунок 4.18 Залежності уявної  $E_{\text{FRET}}$  та FRET ratio від концентрації сечовини для **Styryl**–**BSA**–**SqO3** (а, б) і **Styryl**–**BSAJ**–**SqO3** (в, з)

У спектрах поглинання подвійних комплексів пари **Styryl**–**SqO3** з альбумінами людини під впливом сечовини значних змін зазнають як смуга **Styryl**, так и смуга **SqO3** (рис. 4.19 (а, в)). При 0 М сечовини максимум поглинання **Styryl** у подвійних комплексах з САЛ та САЛЖ становить 486 нм, що відповідає знаходженню барвника у комплексі з протеїнами. З ростом концентрації сечовини, в обох комплексах смуга **Styryl** зсувається на 21 нм до 465 нм (поглинання барвника у розчині сечовини), без зміни її форми та інтенсивності. Положення смуги **SqO3** у подвійних комплексах з альбумінами людини знаходиться при 637 нм з САЛ та 635 нм з САЛЖ, що відповідає смузі поглинання барвника в комплексі з альбумінами людини. Через розгортання третинної структури протеїнів, смуга **SqO3** гіпсохромно зсувається до 627 нм (поглинання барвника у розчині сечовини).



У відсутності сечовини, в спектрах флуоресценції смуга **Styryl** в обох комплексах становить 601 нм. При додаванні сечовини в кількості 1–2 М інтенсивність смуги зростає, а при подальших концентраціях знижується та зсувається у довгохвильову область на 7 нм. Інтенсивність смуги **SqO3** в комплексах знижується в 31 раз і 16 разів, відповідно, з САЛ та САЛЖ та має короткохвильовий зсув на 3 нм.

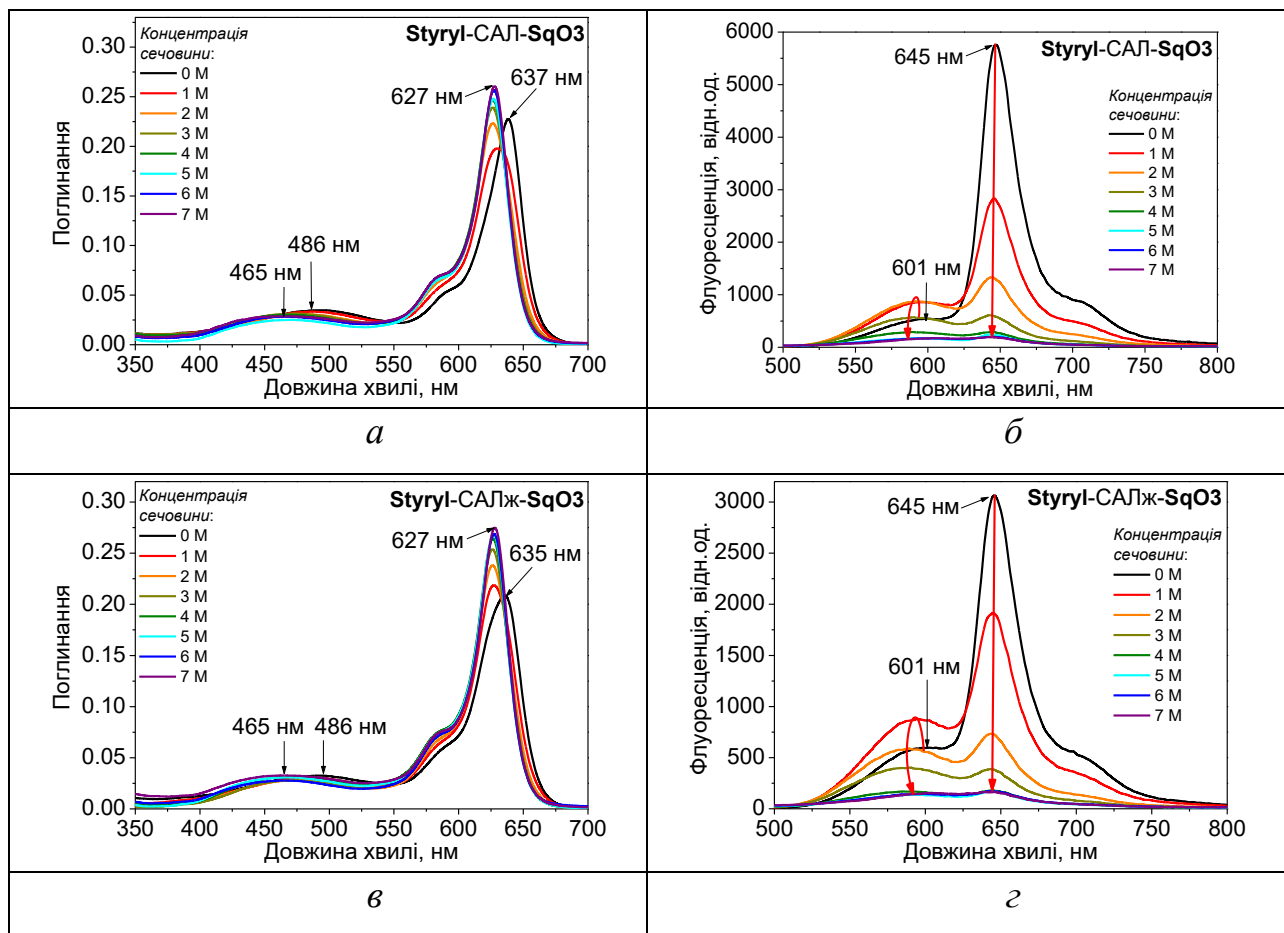


Рисунок 4.19 Спектри поглинання та флуоресценції **Styryl**–САЛ–**SqO3** (а, б) та **Styryl**–САЛЖ–**SqO3** (в, г) у розчинах сечовини від 0 до 7 М

Найбільш чутливим до конформаційних змін **Styryl**–САЛ–**SqO3**, виявився метод FRET ratio, розрахунок ДД за цим методом становить 6.9, що більше ніж ДД=5.1, розрахований за методом  $E_{\text{FRET}}$  (рис. 4.20 (а, б)). Для комплексу **Styryl**–САЛЖ–**SqO3** величини ДД дорівнюють 4.9 та збігаються при розрахунку за обома методами (рис. 4.20 (в, г)). Метод FRET ratio дозволяє реєструвати зміни тільки в дуже вузькому діапазоні малих конформаційних змін протеїнів, в той

час, як метод  $E_{\text{FRET}}$  є чутливим до майже всього діапазону конформацій (рис. 4.20) [184, 187].

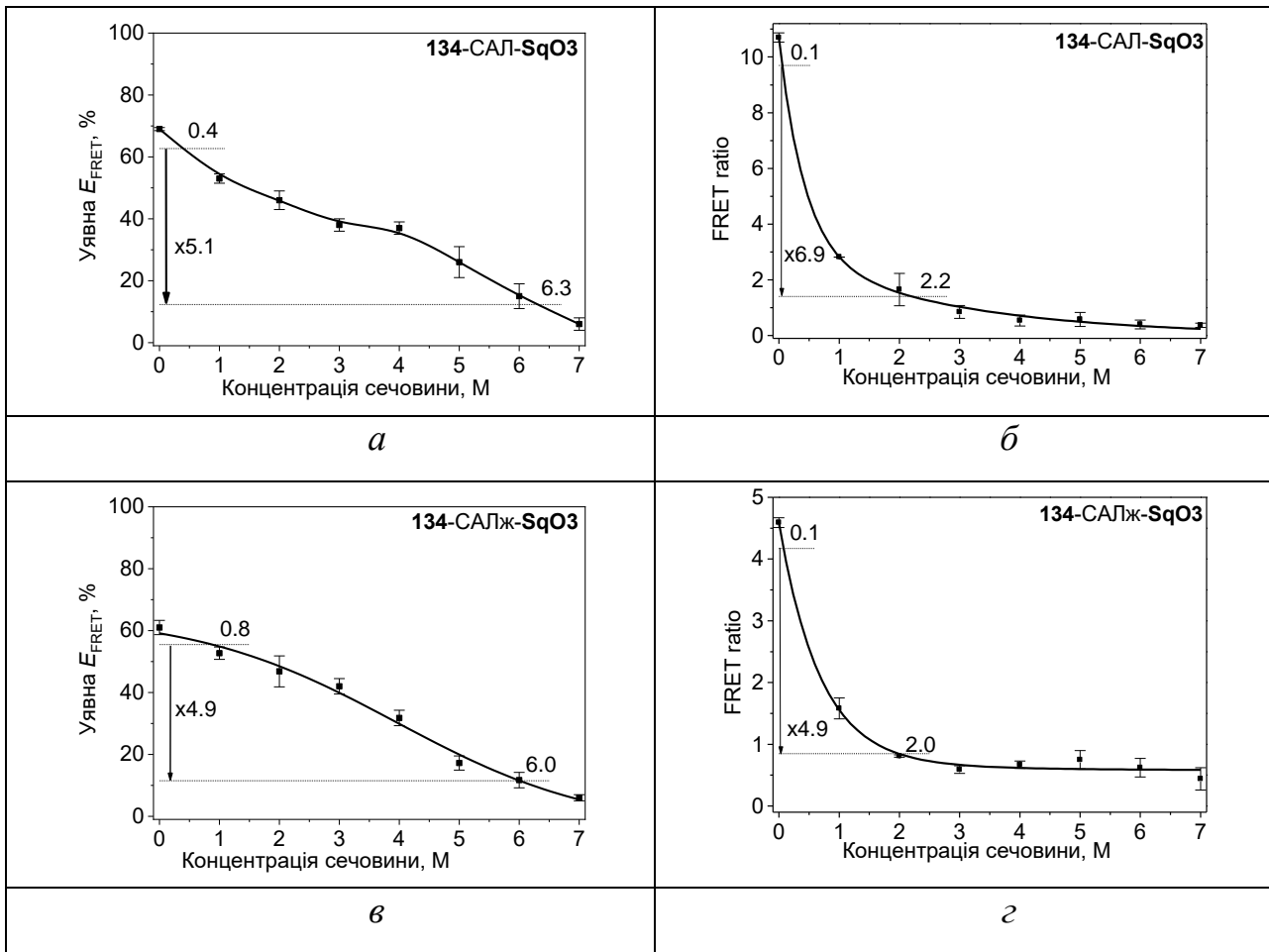


Рисунок 4.20 Залежності уявної  $E_{\text{FRET}}$  та FRET ratio від концентрації сечовини для **Styryl**–**CAL**–**SqO3** (а, б) і **Styryl**–**CALJ**–**SqO3** (в, г)

В спектрах абсорбції комплексів **Styryl**–**ПХ**–**SqO13** збільшення кількості сечовини у розчині призводить до зростання інтенсивності поглинання індивідуальних смуг барвників, проте не впливає на положення їх максимумів (рис. 4.21 (а)). Поглинання **Styryl** при 467 нм, відповідає знаходженню барвника у комплексі з протеїном. Навпаки, барвник **SqO3** має поглинання при 627 нм, тобто знаходиться у водному оточенні.

Зміна полярності оточення барвників, внаслідок розгортання ПХ, призводить до зменшення інтенсивності флуоресценції обох барвників у комплексі. Різноспрямований зсув смуг на 12 нм (**Styryl**) та 6 нм (**SqO3**) призводить до зміни форми експериментального спектру флуоресценції

комплексу **Styryl–ПХ–SqO3** (рис. 4.21 (б)) при 7 М сечовини та зростанню його інтенсивності.

Як і у випадку альбумінів, більший ДД для пари **Styryl–SqO3** в комплексі з ПХ досягається за методом FRET ratio (рис. 4.22).

За цим методом величина ДД становить 5.4, а за методом  $E_{\text{FRET}}$  лише 4.1. Проте за методом  $E_{\text{FRET}}$  можливо виявляти дещо більший діапазон конформаційних змін ПХ.

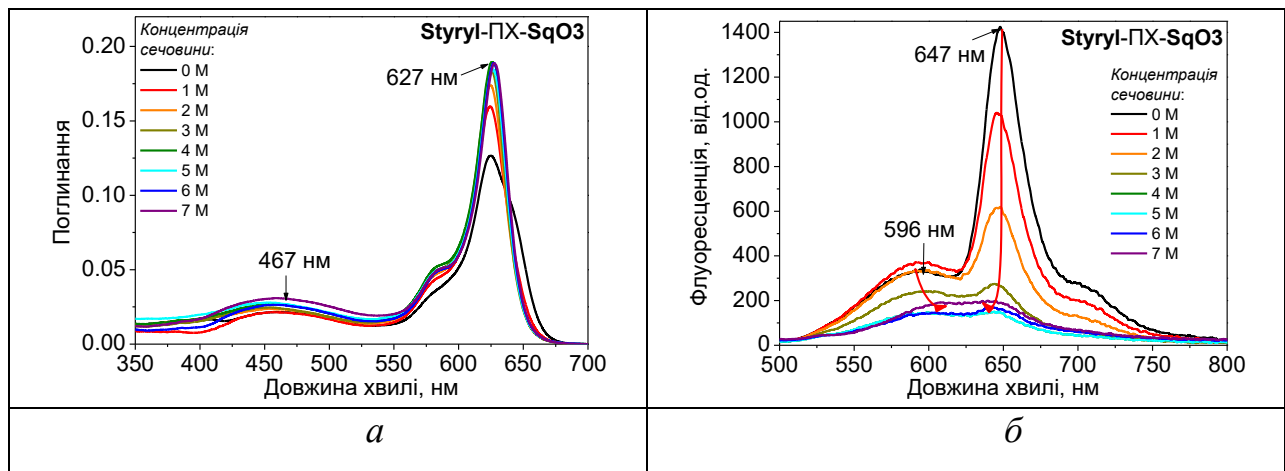


Рисунок 4.21 Спектри поглинання (а) та флуоресценції (б) **Styryl–ПХ–SqO3** у розчинах сечовини від 0 до 7 М

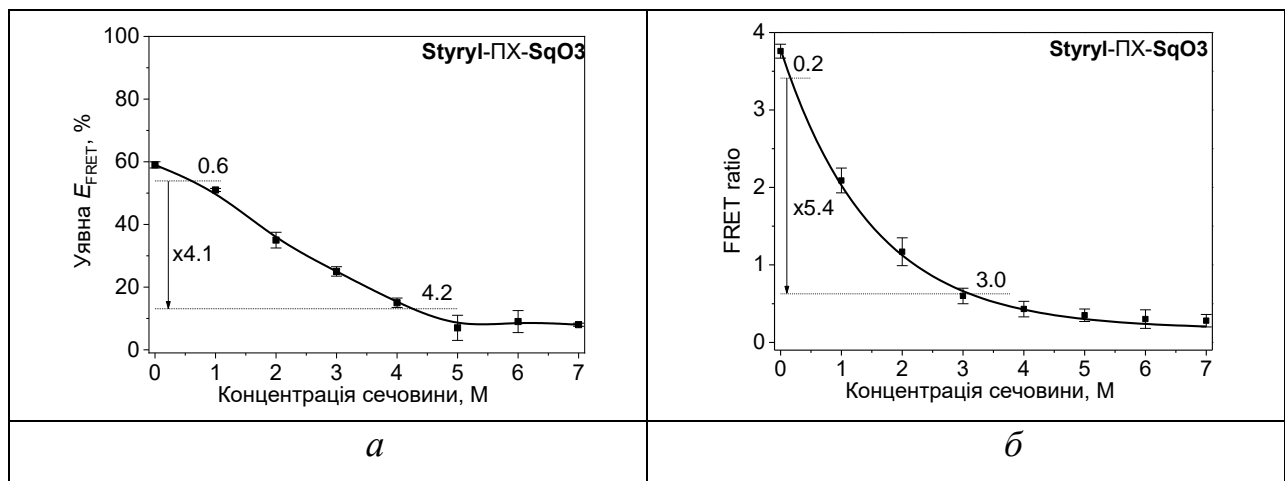


Рисунок 4.22 Залежності уявної  $E_{\text{FRET}}$  (а) та FRET ratio (б) від концентрації сечовини для **Styryl–ПХ–SqO3**

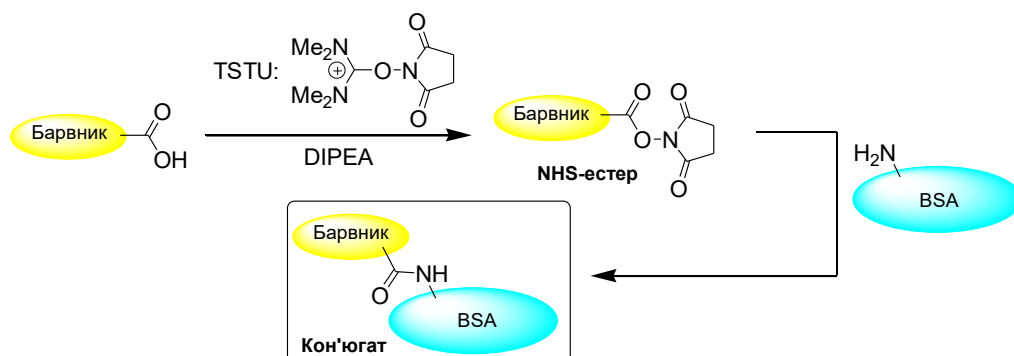
Таким чином, у відсутності сечовини, в подвійних комплексах **Styryl–протеїн–SqO3** обидва барвники мають смуги поглинання, що відповідають

знаходженню барвників в комплексі з протеїном. Тобто, на відміну від сквараїнової пари, барвники мають різні м'яця зв'язування з протеїнами.

Через значну напівширину спектрів поглинання **Styryl**, при близьких смугах поглинання стирилу в комплексах з протеїнами та у розчині сечовини, денатурація не впливає на положення максимуму **Styryl** в експериментальному спектрі подвійного комплексу. Гіпсохромний зсув поглинання барвника спостерігається тільки з альбумінами людини, для яких різниця між смугами сягає 21 нм. Різнострамованість сольвафлуорохромних ефектів барвників стає причиною наближення їх смуг при розгортанні протеїнів, що може призвести до значної зміни форми експериментального спектру флуоресценції. На відміну від сквараїнової пари, більша чутливість **Styryl-SqO3** до конформаційних змін протеїнів відноситься до розрахунків за методом FRET ratio. Однак, за методом  $E_{\text{FRET}}$  пара чутлива до більшого діапазону конформаційних станів протеїнів [184].

#### 4.6 Вплив конформації на перенос енергії з БСА кон'югованого сквараїну **SqO4** на некон'югований сквараїн **SqCN3**

Як вже було зазначено у розділі 4.3, сквараїн-акцептор **SqCN3** витісняє переважну кількість молекул сквараїну-донору **SqO3** з гідрофобних кишень. Це зменшує концентрацію донору в протеїновій фазі та знижує ефективність FRET. Для того, щоб запобігти цьому небажаному процесу ми ковалентно зв'язали донор з БСА. Однак через те, що гідрофобний сквараїн **SqO3** сильно агрегує в кон'югаті з протеїном (розділ 2), замість нього було використано його гідрофільний аналог **SqO4**, чотири сульфогрупи якого дозволяють уникнути агрегації барвника при зв'язуванні. Для дослідження було синтезовано кон'югат з D/P = 1.5 [188] за наступною схемою:



Концентрацію цього кон'югату у розчині обирали таким чином, щоб вміст ковалентно зв'язаного барвника у розчині приблизно дорівнював вмісту, що використовується у нековалентних комплексах. Додавання сечовини в кількості від 0 до 7 М до розчину кон'югату ( $c_{\text{кон'югата}} = 0.48 \text{ мкМ}$ ) показало, що сечовина майже не впливає на положення і форму спектрів поглинання і флуоресценції кон'югату (рис. 4.23 (а, б)) [188].

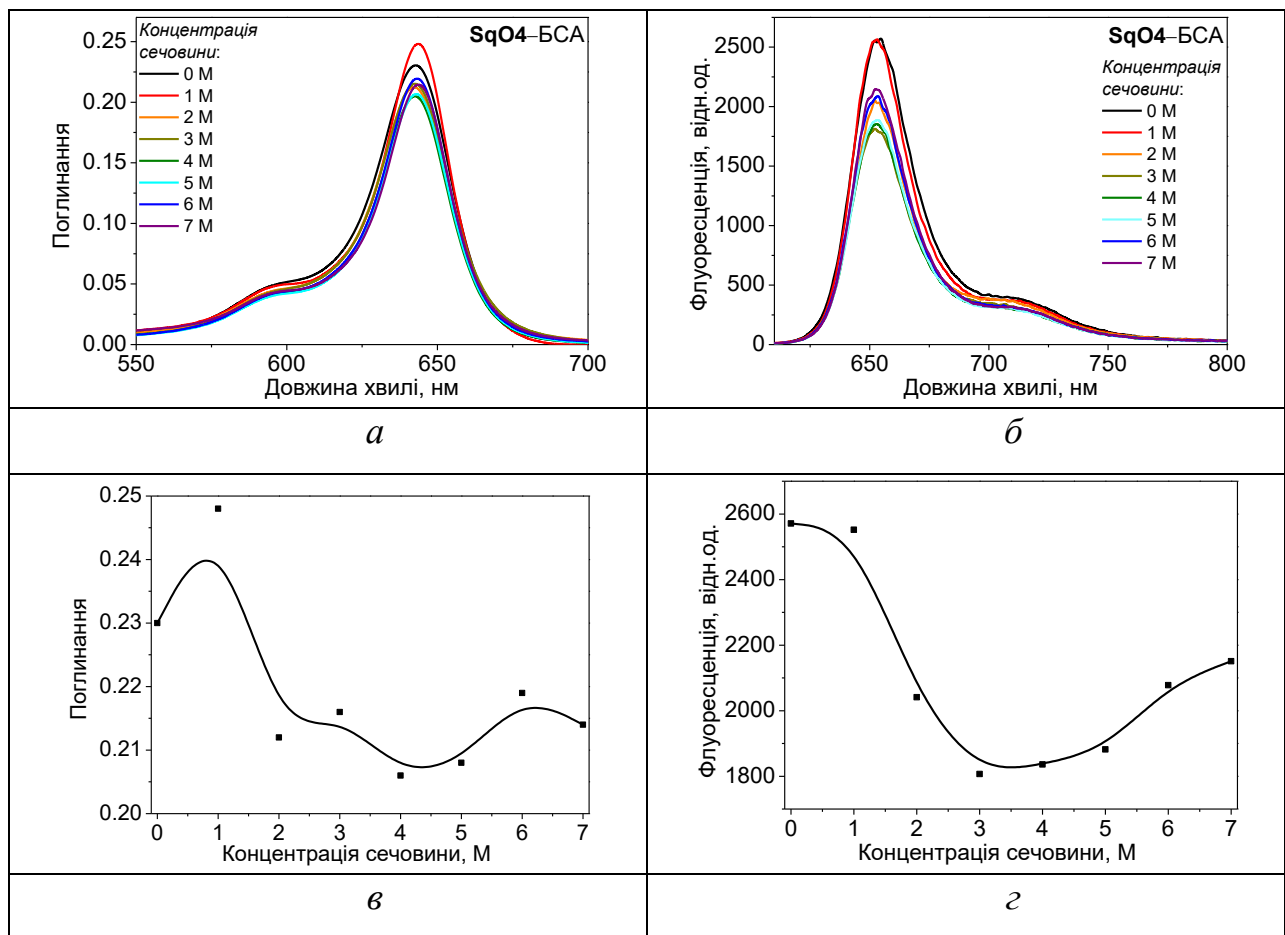


Рисунок 4.23 Залежність спектру поглинання і флуоресценції, абсорбції та інтенсивності флуоресценції кон'югату сквараїна **SqO4** ( $c_{\text{sqO4}} = 0.70 \text{ мкМ}$ ) з БСА ( $D/P = 1.5$ ) від концентрації сечовини при концентрації кон'югату  $c_{\text{кон'югата}} = 0.48 \text{ мкМ}$

Поглинання при збільшенні концентрації сечовини до 1 М слабо зростає, при подальшому збільшенні кількості сечовини до 2 М — зменшується і далі майже не змінюється (рис. 4.23 (в, г)). У той самий час, підвищення концентрації сечовини від нуля до 3 М призводить до суттєвого (в 1.4 рази) зниження

інтенсивності флуоресценції, але при подальшому збільшенні концентрації сечовини від 3 М до 7 М флуоресценція зростає у 1.2 рази.

Наявність яскраво вираженого мінімуму на зазначеному графіку (рис. 4.23 (е)) свідчить про існування, принаймні, двох різних процесів при додаванні сечовини до розчинів кон'югатів. Беручи до уваги результати попередніх досліджень для сквараїнів можна стверджувати, що один з цих процесів полягає в ініційованих сечовиною конформаційних змінах в молекулах БСА, які супроводжуються зміною мікрооточення барвника та, відповідно, значним зменшенням інтенсивності флуоресценції. Іншим процесом є безпосередня взаємодія сечовини з барвником, яка, навпаки, збільшує екстинкцію та інтенсивність флуоресценції при  $c_{\text{сечовини}} > 1$  М, хоча і в меншій мірі, ніж в результаті першого процесу [188].

Далі ми перейшли до вивчення переносу енергії між БСА кон'югованим донором (**SqO4**) та некон'югованим акцептором (**SqCN3**). Для цього до кон'югату сквараїну-донору **SqO4** з БСА ( $D/P = 1.5$ ) додавали подвійну кількість сквараїну-акцептору **SqCN3**. Таким чином, мольне співвідношення компонентів дорівнювало **SqO4** : БСА : **SqCN3** = 1.5 : 1 : 2. На рис. 4.24 представлено спектр поглинання системи при концентрації сечовини 0 М.

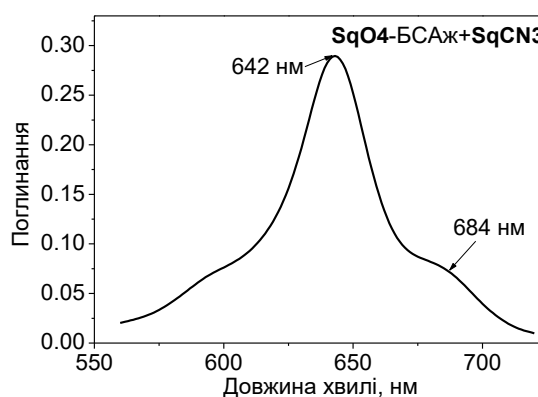


Рисунок 4.24 Спектр поглинання системи "кон'югат сквараїну **SqO4** з БСА ( $D/P = 1.5$ ) — некон'югований сквараїн **SqCN3**" при концентрації сечовини 1 М

В спектрі поглинання системи "кон'югат **SqO4** з БСА — **SqCN3**" спостерігаються дві смуги, які відповідають обом барвникам (рис. 4.25). Положення першої, більш інтенсивної смуги при 642 нм відповідає поглинанню кон'югату **SqO4** з БСА, а положення другої смуги при 684 нм — комплексу

**SqCN3** з БСА. Звертає на себе увагу те, що абсорбція акцептору значно менша, ніж передбачалося. Беручи до уваги різницю у початкових концентраціях та коефіцієнтах екстинкції обох барвників (для **SqO4**  $c = 0.70$  мкМ,  $\epsilon = 300000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  і для **SqCN3**  $c = 1$  мкМ,  $\epsilon = 162000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), слід було очікувати, що співвідношення між інтенсивностями смуг поглинання донору і акцептору складатиме  $A_{\text{SqO4}}/A_{\text{SqCN3}} = (\epsilon_{\text{D2CD}}) / (\epsilon_{\text{ACA}}) = 0.21/0.162 = 1.3$ . Однак в експериментальному спектрі, це співвідношення складає 3.7. Така розбіжність між експериментальним і розрахованим співвідношенням смуг поглинання пов'язано з тим, що лише частина молекул **SqCN3** утворює комплекс з кон'югатом "**SqO4** — БСА". Іншими словами, **SqO4** ковалентно зв'язаний з БСА, перешкоджає **SqCN3** утворювати комплекс з протеїном кон'югату.

Додавання сечовини до системи "кон'югат сквараїну **SqO4** з БСА — некон'югований сквараїн **SqCN3**" приводить до витіснення **SqCN3** з протеїну, що супроводжується зниканням його смуги поглинання 684 нм і флуоресценції (704 нм) у протеїні та збільшенням флуоресценції смуги 652 нм кон'югованого донору **SqO4** (рис. 4.25).

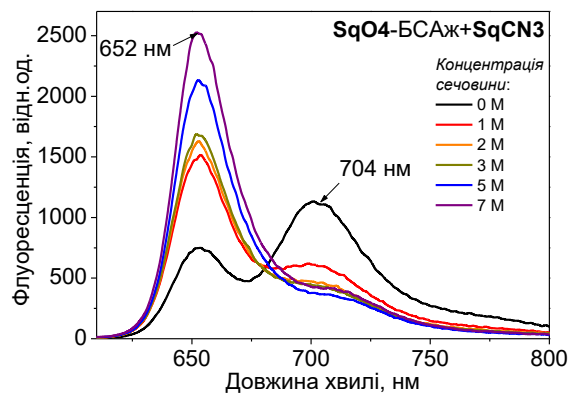


Рисунок 4.25 Спектри флуоресценції системи "кон'югат **SqO4**-БСА + **SqCN3**" у розчинах сечовини до 7 М

Внаслідок зменшення концентрації сквараїна-акцептора **SqCN3** у кон'югаті "**SqO4**-БСА" ефективність FRET суттєво зменшується (рис. 4.26).

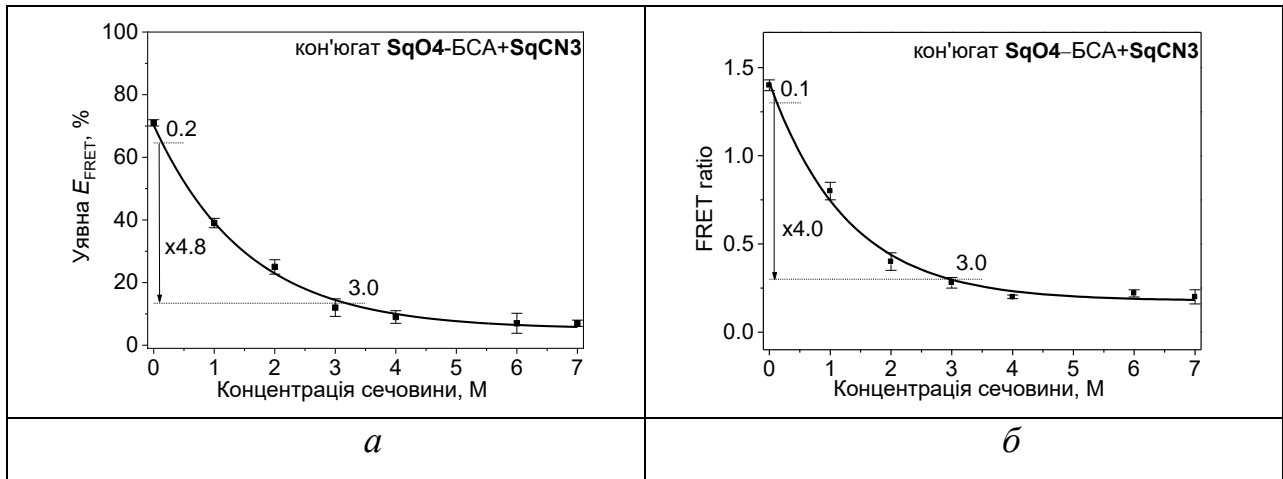


Рисунок 4.26 Залежності уявної  $E_{FRET}$  (а) та FRET ratio (б) від концентрації сечовини для системи "кон'югат **SqO4-BCA + SqCN3**"

При збільшенні концентрації сечовини ефективність FRET у протеїновому кон'югаті зменшується в 4.8 рази. Це є гіршим показником, ніж у випадку некон'югованої системи **SqO3-BCA-SqCN3**, що при еквімолярному співвідношенні компонентів змінюється у 9 раз. За методом FRET ratio ДД складає лише 4 рази, що також є меншим, ніж для некон'югованих систем **SqO4-BCA-SqCN3**. Подібно до **0.8SqO4-1BCA-1SqCN3**, система "кон'югат **SqO4-BCA + SqCN3**" чутлива до малих конформаційних змін протеїну (рис. 4.26 (а)). Тобто, зменшення кількості одного з компонентів призводить до збільшення чутливості системи до малих конформаційних змін [188].

Менша чутливість системи "кон'югат **SqO4-BCA + SqCN3**" до конформаційних змін в БСА у порівнянні з некон'югованими системами **SqO3-BCA-SqCN3** пов'язана, скоріш за все, з меншою чутливістю кон'югованого скварайна **SqO4** до мікрооточення у порівнянні зі скварайном **SqO3**. Іншою причиною може бути недостатня кількість молекул акцептору **SqCN3** у кон'югаті, що погіршує динамічний діапазон можливих змін.

#### 4.7 Вплив сечовини на перенос енергії з БСА кон'югованого скварайну **SqO4** на кон'югований скварайн **SqCN4**

Загальноприйнятим підходом реалізації методу FRET є ковалентне зв'язування донору та акцептору з аналітом. Тому, наступною ми дослідили систему **SqO4-BCA-SqCN4**, у якій гідрофільні аналоги **SqO3** та **SqCN3**



ковалентно прив'язали до БСА. Це дозволило перевірити ймовірність використання обраних нами сквараїнів у класичних дослідженнях за допомогою FRET та запобігти витіснення донору або акцептора у водне середовище. Мольне співвідношення компонентів системи дорівнювало **SqO4** : БСА : **SqCN3** = 1.5 : 1 : 1. Як було зазначено у розділі 2, **SqO4** та **SqCN4** є дуже гідрофільними, тому присутність сечовини у розчині майже не змінює спектральних характеристик цих барвників.

Спектри поглинання та флуоресценції подвійного кон'югату **SqO4**-БСА-**SqCN4** у розчинах сечовини з концентрацією 0 М та 7 М представлені на рис. 4.27.

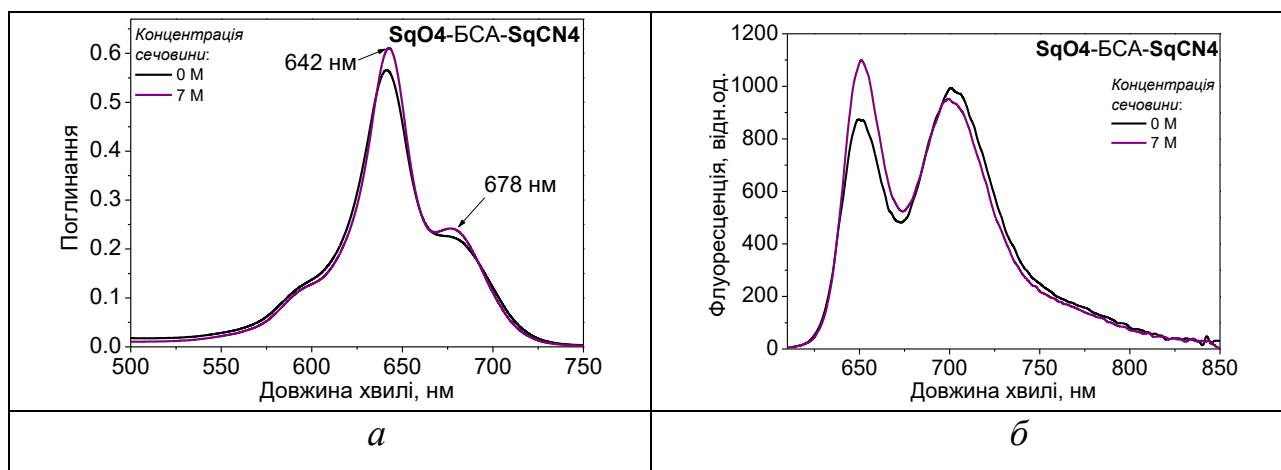


Рисунок 4.27 Спектри поглинання (а) та флуоресценції (б) **SqO4**-БСА-**SqCN4** у розчинах сечовини 0 М та 7 М

В спектрах поглинання подвійного кон'югату максимум **SqO4** становить 642 нм, а смуга **SqCN4** знаходиться при 678 нм (рис. 4.27 (а)). Збільшення кількості сечовини майже не впливає на спектри та при 7 М сечовини абсорбція обох смуг зростає незначною мірою. В спектрах випромінювання максимуми **SqO4** і **SqCN4** становлять, відповідно, 650 нм та 701 нм (рис. 4.27 (б)), та при зміні конформації БСА смуга **SqO4** зростає, а смуга **SqCN4** майже не змінюється [188].

Через нечутливість барвників до мікрооточення зміни у переносі енергії розраховували лише за методом  $E_{\text{FRET}}$ . Слабкі спектральні зміни подвійного кон'югату **SqO4**-БСА-**SqCN4** відповідають незначним змінам переносу енергії при

зміні відстані між барвниками. Так, ДД для  $E_{\text{FRET}}$  складає лише 1.1, або 10 % (рис. 4.28).

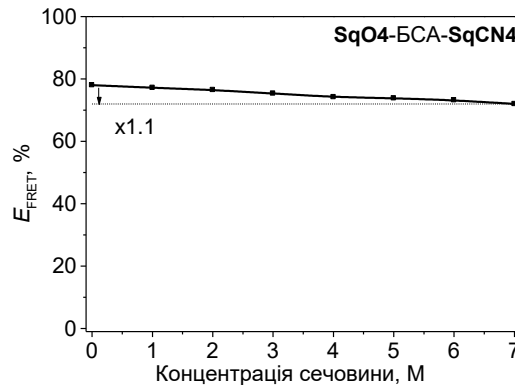


Рисунок 4.28 Залежності  $E_{\text{FRET}}$  від концентрації сечовини для кон'югату **SqO4-BCA-SqCN4** у розчинах сечовини (0-7 М)

Ми припускаємо, що отримані результати є наслідком можливого близького зв'язування донору та акцептору на поверхні протеїну і/або низькою чутливістю барвників до мікрооточення [188]. Такі незначні зміни переносу енергії надто малі, для використання на практиці, однак використовуються при проведенні біологічних досліджень [189].

#### 4.8 Вплив сечовини на перенос енергії з БСА кон'югованого ціаніну **Cy5** на кон'югований ціанін **Cy5.5**

Комерційно доступні ціанінові барвники **Cy5** (донор) та **Cy5.5** (акцептор) використовують як FRET-пару у медико-біологічних дослідженнях [139, 190], де барвники ковалентно зв'язують з аналітом. Оскільки сквараїни відносяться до підкласу ціанінів, ми обрали пару **Cy5-Cy5.5** для порівняння результатів отриманих для сквараїнів. Дослідження проводили на кон'югаті **Cy5-BCA-Cy5.5**, що мав мольне співвідношення 1 **Cy5**: 1 БСА : 1.3 **Cy5.5**.

Вплив сечовини на кон'югати ціанінів з БСА вивчали на прикладі кон'югату **Cy5-BCA**. Для дослідження було синтезовано кон'югат з D/P=1. Додавання сечовини до кон'югату призводить до довгохвильового зсуву максимуму поглинання **Cy5-BCA** на 2 нм та майже не впливає на його інтенсивність (рис. 4.29 (a)). Проте, з ростом концентрації сечовини, незначною мірою зменшується абсорбція ~612 нм (плече) та напівширина спектрів.

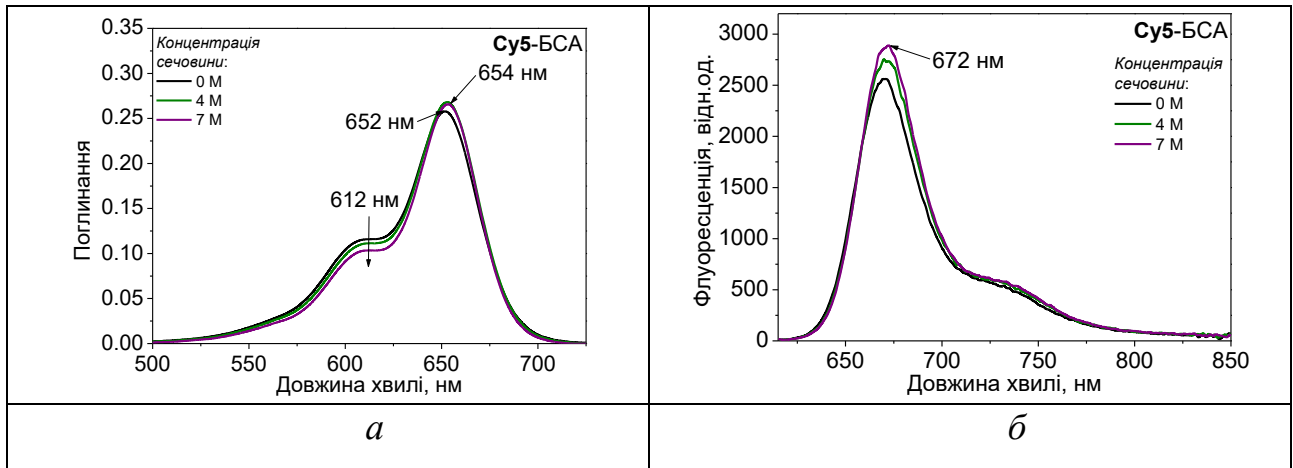


Рисунок 4.29 Спектри поглинання (а) та флуоресценції (б) **Cy5-BSA** у розчинах сечовини 0 М та 7 М

При додаванні сечовини максимум спектрів випромінювання **Cy5-BSA** не змінюється, а їх інтенсивність слабо зростає. Таким чином, сечовина впливає на кон'югат ціаніну з БСА, проте значно в менший мірі, ніж у випадку кон'югату БСА з сквараїном (**SqO4-BSA**).

Далі ми дослідили перенос енергії між **Cy5** та **Cy5.5**, що були кон'юговані з БСА. Мольне співвідношення компонентів системи становило 1 **Cy5** : 1 БСА : 1.3 **Cy5.5**. На відміну від сквараїнів, в спектрах поглинання та флуоресценції подвійного кон'югату ціанінів смуги барвників не мають доброго відокремлення (рис. 4.30).

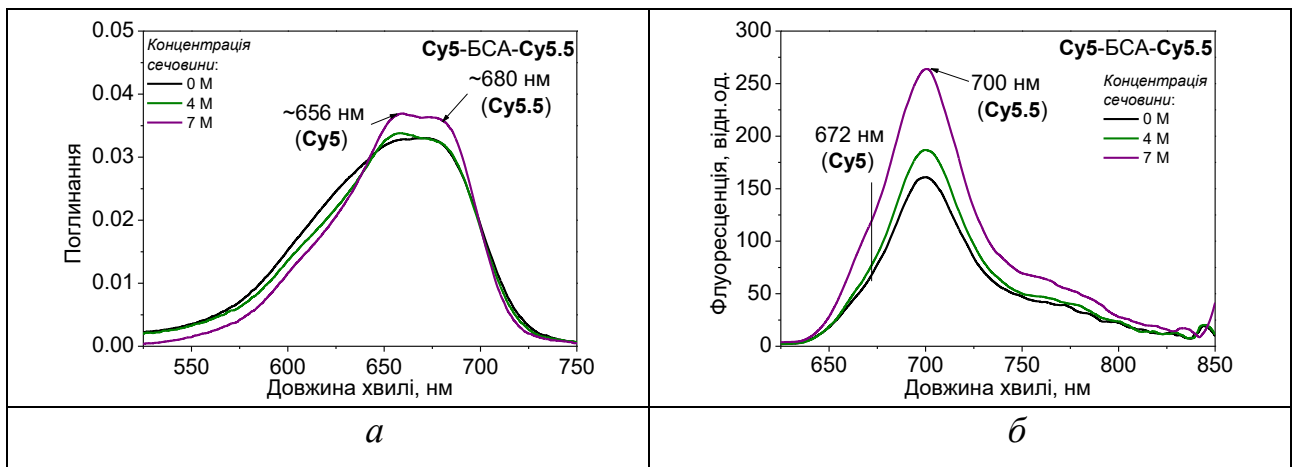


Рисунок 4.30 Спектри поглинання (а) та флуоресценції (б) **Cy5-BSA-Cy5.5** у розчинах сечовини 0 М та 7 М

Під впливом сечовини форма спектрів поглинання подвійного кон'югату зазнає значних змін. Присутність сечовини у розчині зменшує напівширини смуг поглинання кожного з барвників, внаслідок чого при 7 М сечовини максимуми смуг  $\sim 656$  нм (Cy5) та  $\sim 680$  нм (Cy5.5) стають найбільш означеними. Інтенсивність флуоресценції Cy5-БСА-Cy5.5 зі зростанням концентрації сечовини збільшується в 1.6 рази, без зміни положення максимуму.

Зміна ефективності переносу енергії між кон'югованими ціанінами не відрізняється від такої для кон'югованих сквараїнів та складає лише 1.1 рази (рис. 4.31) [182, 191].

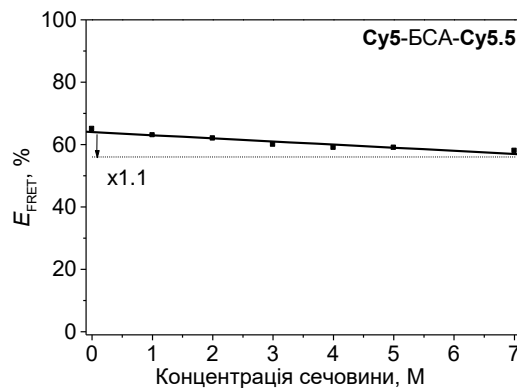


Рисунок 4.31 Залежності  $E_{\text{FRET}}$  від концентрації сечовини для кон'югату Cy5-БСА-Cy5.5 у розчинах сечовини (0-7 М)

Таким чином, при ковалентному зв'язуванні з БСА як сквараїнів так і ціанінів, ефективність переносу енергії змінюється незначною мірою, що не дозволяє достовірного визначення конформаційних змін протеїну під дією сечовини.

#### 4.9 Вплив низькотемпературного збереження на перенос енергії між SqO3 та SqCN3 в альбумінах плазми крові людини

Розроблений метод ми випробували для визначення стану зразків плазми крові. За своїм складом вона є гетерогенною системою та включає не тільки альбуміни але й глюкозу, гормони, ліпіди та інші компоненти [192, 193]. Для медичного використання плазму крові людини піддають заморожуванню використовуючи температурні режими з різною швидкістю охолодження та різними кінцевими температурами зберігання [194]. Замороження протеїнових

препаратів знижує фізичну та хімічну деградацію [195] та мінімізує можливість росту мікроорганізмів [196]. Однак, стрес від заморожування може дестабілізувати протеїни та призводити до їх агрегації [197, 198]. Негативно на препаратах позначається і довгострокове зберігання при низьких температурах, в процесі якого так само утворюються агрегати протеїнів [199]. Для альбуміну в плазмі крові наслідком таких конформаційних змін є втрата біологічних функцій, що в організмі людини може призвести до паталогічного стану [200]. Тому, моніторинг конформаційної стабільності альбуміну плазми крові необхідна умова при довготривалому зберіганні донорської плазми або при розробки нових методів кріоконсервування.

Ми дослідили плазму крові 20 донорів, кожна з яких не піддавалася заморожуванню (нативна плазма) та заморожувалася до  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . В якості негативного контролю використовували 5 зразків, які зберігалися при  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом 9 місяців. Усі зразки були люб'язно надані Фалько О.В (Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України).

В першу чергу ми дослідили зміни флуоресценції **SqO3**, **SqCN3** і **Styryl** у зразках плазми. При використанні барвників в якості зондів, їх інтенсивність флуоресценції в кожному з типів зразків змінюється незначним чином (рис. 4.32).

Для FRET-пар **SqO3-SqCN3** і **Styryl-SqO3** у зразках, що не були заморожені та заморожувалися до  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , зі зниженням температури заморожування для обох пар раціометричний параметр FRET ratio майже не змінюється, а ефективність переносу енергії зростає у 1.3 рази для скварайнової пари та зменшується у 1.2 рази для пари стирил-скварайн (рис. 4.33).

Для скварайнової пари, ефективність переносу енергії поступово зростає зі зниженням температури замороження препаратів та при  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  вона зростає у  $\sim 1.3$  рази, відносно нативної плазми. Найбільше значення уявної  $E_{\text{FRET}}$  для **SqO3-SqCN3** спостерігається для негативного контролю та дорівнює 56 %, що у 1.6 разів більше за переніс енергії у нативної плазмі (рис. 4.33 (a)).

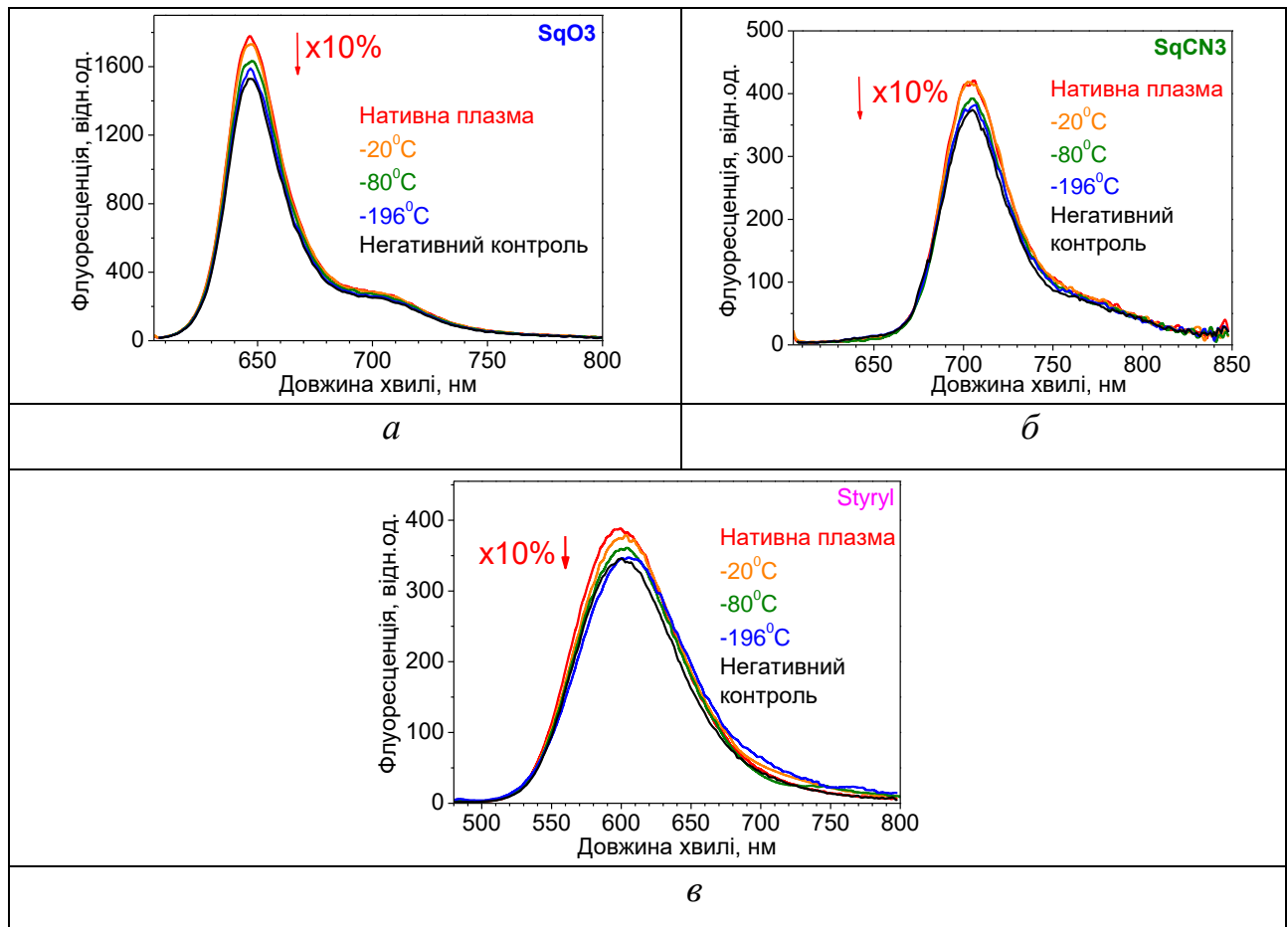


Рисунок 4.32 Спектри флуоресценції **SqO3** (а), **SqCN3** (б) і **Styryl** (в) у зразках плазми крові людини

Параметр FRET ratio для заморожених зразків плазми майже не змінюється, але зростає у  $\sim 1.5$  рази для негативного контролю (рис. 4.33 (б)).

У протилежність сквараїнової пари, для **Styryl-SqO3** ефективність переносу енергії зменшуються при зниженні температури заморожування плазми у  $\sim 1.2$  рази та у 1.3 рази для негативного контролю (рис. 4.33 (в)). Значення FRET ratio для нативної та замороженої плазми майже однакові, а для негативного контролю зменшується у 1.3 рази.

Отримані результати вказують на утворення агрегатів протеїнів. Для сквараїнової пари це призводить до зменшення відстані між барвниками, і як наслідок збільшенню ефективності переносу. В стирил-сквараїнової парі, наявність довгого аліфатичного ланцюжка в стирилі, ускладнює утворення комплексів **Styryl** з протеїнами, що призводить до збільшення відстані між барвниками і обумовлює зниження ефективності переносу енергії.

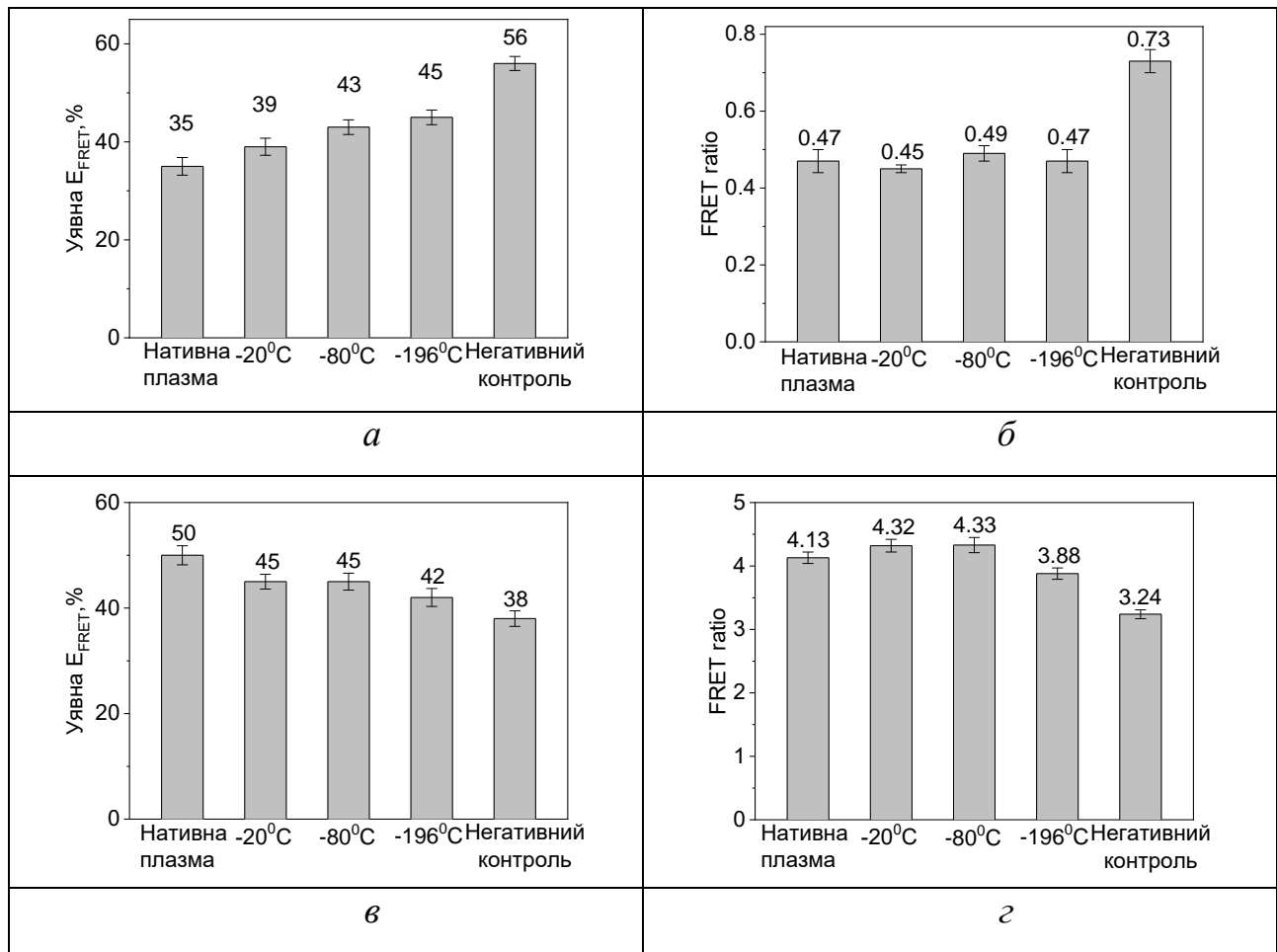


Рисунок 4.33 Уявна  $E_{FRET}$  та FRET ratio від температурного впливу на плазму крові для пари **SqO3-SqCN3** (а, б) та **Styryl-SqO3** (в, г)

Таким чином, для обох пар чутливим до конформаційних змін протеїнів плазми крові людини, яка піддавалася заморожуванню є метод  $E_{FRET}$ , а метод FRET ratio виявився не інформативним. Порівняно з нативною плазмою, найбільші зміни уявної  $E_{FRET}$  та FRET ratio відносяться до негативного контролю, тобто обидва методи дозволяють точно визначати придатність плазми крові для медичного використання.

#### Висновки до розділу 4

1. При еквімолярному співвідношенні компонентів найкращі результати за обома методами  $E_{FRET}$  та FRET ratio відносяться до пари несиметричних сквараїнів з карбоксильними групами **SqO3-BCA-SqCN3** ( $E_{FRET}$  =81%, FRET ratio=4.82) та пари **Styryl-BCA-SqO3** ( $E_{FRET}$  =71%, FRET ratio=4.75), в якій донор з попередньої пари використовували як акцептор.

2. Варіювання компонентів в системі приводить до зміни як уявної  $E_{\text{FRET}}$  так і FRET ratio. Для сквараїнової пари, у порівнянні з еквімолярним співвідношенням, зменшення кількості БСА, або збільшення концентрації донора в системі приводить до зниження FRET ratio в 1.5–1.7 разів та змін уявної  $E_{\text{FRET}}$ . При цьому зменшення концентрації донора підвищує обидва параметри. При визначенні конформаційних змін БСА зменшення концентрації донора для сквараїнової пари зменшує чутливість уявної  $E_{\text{FRET}}$  у 1.5 рази. За методом FRET ratio концентрація донора майже не впливає на чутливість системи, але за обома методами при зменшенні кількості донора пара стає більш чутливою до малих конформаційних змін БСА, які відбуваються у 0–2.0 М розчинах сечовини.

3. В спектрах поглинання та флуоресценції подвійного комплексу **SqO3-БСА-SqCN3 (1 : 1 : 1)** присутні дві смуги, що належать **SqO3** (донор) та **SqCN3** (акцептору). У відсутності сечовини (0 М) індивідуальна смуга поглинання донора знаходиться при 627 нм, що не відповідає абсорбції барвника у комплексі з БСА (642 нм). Акцептор, навпаки, знаходиться у комплексі з протеїном (684 нм). Таким чином, можна припустити, що обидва сквараїни мають однакові центри зв'язування з протеїнами, через що акцептор **SqCN3** витісняє донор **SqO3** з гідрофобних кишень протеїну, а донор приєднується до поверхні протеїну за рахунок електростатичної взаємодії, де стає доступним водному оточенню. Коли збільшується концентрація сечовини у розчині, **SqO3** відокремлюється від протеїну та частково переходить у розчин сечовини, в результаті чого його абсорбція збільшується, акцептор також стає доступнішим для водної фази, через що інтенсивність його смуги при 684 нм (комплекс з протеїном) зменшується та з'являється нова смуга при 660 нм (**SqCN3** у розчині сечовини). В спектрах флуоресценції денатурація приводить до зміщення обох смуг у короткохвильову область та зменшення інтенсивності флуоресценції донора і/або акцептора.

4. Встановлено, що перенос енергії між барвниками залежить від типу протеїну, з яким FRET пара барвників утворює комплекс. Крім того, за різними методами розрахунку досягається різна чутливість пар до конформаційних змін



протеїнів. Так, для сквараїнової пари більша чутливість спостерігається при обчислюванні за методом  $E_{\text{FRET}}$ , а для пари стирил-сквараїн більша чутливість за методом FRET ratio. Водночас, для обох пар за допомогою параметра FRET ratio стає можливою реєстрація менших конформаційних змін протеїнів.

5. Спосіб зв'язку барвників з протеїном впливає на перенос енергії між барвниками при денатурації БСА. Для сквараїнової пари в системі з ковалентним зв'язком донора та нековалентним зв'язком акцептора зміна  $E_{\text{FRET}}$  приблизно у два рази менша, у порівнянні з системою в якій обидва барвники знаходяться в комплексі з БСА. При ковалентному зв'язуванні з БСА як донора так і акцептора зміна ефективності FRET складає лише 10%.

6. У зразках плазми крові, при використанні барвників як зондів, їх інтенсивність флуоресценції у кожному з типів зразків змінюється незначним чином. Для FRET-пар: у зразках, що не були заморожені та заморожувалися до  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , зі зниженням температури заморожування для обох пар раціометричний параметр FRET ratio майже не змінюється, а ефективність переносу енергії зростає у 1.3 рази для сквараїнової пари та зменшується у 1.2 рази для пари стирил-сквараїн. Відносно зразків нативної плазми уявна ефективність переносу енергії та FRET ratio зразків з вичерпаним терміном придатності змінюється однаково: у 1.6 разів для сквараїнової пари та 1.3 рази для пари стирил-сквараїн, що дозволяє визначати придатність плазми крові для використання.

Результати розділу 4 опубліковано в наступних роботах автора [128, 146, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 191].

## РОЗДІЛ 5 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### 5. 1 Реагенти та розчинники

Фосфатний буфер (РВ) рН 7.4 (10 мМ) готували змішуванням 808 мл 0.01 М (1.772 г / л)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  і 192 мл 0.01 М (1.355 г / л)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Бікарбонатний буфер 9.0 (0.05 М) отримано розчиненням 2.1 г  $\text{NaHCO}_3$  в 500 мл дистильованої води. Значення рН контролювали за допомогою рН-метра *Hanna Instruments* рН 213.

Розчини сечовини з концентраціями від 1 до 7 М готували розчиненням сухої сечовини (чда, Україна) у РВ. Концентрацію визначали на рефрактометрі РФ-22, за значенням показника заломлення для  $c_{\text{сечовини}} = 1\text{--}7$  М (таблиця 5.1). Отримані значення співпадають з даними для показників заломлення розчинів сечовини наведених у [201].

Таблиця 5.1

**Показники заломлення ( $n$ ) розчинів сечовини ( $c_{\text{urea}} = 1\text{--}7$  М) при 20 °С**

$c_{\text{сечовини}}, \text{М}$	0	1	2	3	4	5	6	7
$n$	1.3333	1.3421	1.3503	1.3588	1.3673	1.3755	1.3839	1.3918

Бичачий сироватковий альбумін – БСА (BSA, essentially fatty acid free, from fraction V, A6003), бичачий сироватковий альбумін – БСАж (BSA, lyophilized powder, A2153), людський сироватковий альбумін – САЛ (HSA, essentially fatty acid free A1887), людський сироватковий альбумін САЛж – (HSA, remainder mostly globulins A1653), пероксидаза хрону – ПХ (HRP, lyophilized, powder, beige, ~150 U/mg, 77332), лізоцим (Lysozyme from chicken egg white, lyophilized powder, protein  $\geq 90\%$ ,  $\geq 40000$  units/mg protein, L6876) фірми *Sigma-Aldrich*, використовували без додаткової очистки.

Досліджені барвники синтезовані в ДНУ "НТК" Інститут монокристалів" НАН України.

## 5.2. Спектральні вимірювання

Спектри поглинання записували на спектрофотометрі *PerkinElmer Lambda 35 UV / Vis* при кімнатній температурі в стандартних 1-см кварцових кюветах. Максимуми спектрів поглинання реєструвалися з точністю 0.5 нм.

Спектри флуоресценції і квантові виходи барвників їх кон'югатів та комплексів з протеїнами вимірювали при кімнатній температурі в стандартних 1-см кварцових кюветах на спектрофлуориметрі *Varian Cary Eclipse*. Спектри флуоресценції виправляли з урахуванням спектральної чутливості приладу.

Для вимірювання коефіцієнтів екстинкції, кожен барвник (7-10 мг) розчиняли в 50 мл фосфатного буфера (рН 7.4). Отриманий розчин розбавляли до концентрації барвника  $\sim 0.5$  мкМ та вимірювали спектри поглинання у 5 см кварцових кюветах. Коефіцієнти екстинкції розраховували згідно закону Бугера-Ламберта-Бера (формула 5.1).

$$\varepsilon = c \times D \times l \quad (5.1)$$

де,  $D$  – оптична щільність барвника в максимумі у хлороформі,  $\varepsilon$  – коефіцієнт екстинкції барвника в хлороформі

Вимірювання проводили 3-4 рази та усереднювали отримані данні. Помилка вимірювання не перевищувала  $\pm 2000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Абсолютні квантові виходи флуоресценції ( $\Phi_F$ ) визначали відносним методом [202, 203]. Як еталон використовували розчини **Cy5** з квантовим виходом 27% у воді [110]. Концентрації барвників становили  $1 \times 10^{-6}$  М. Похибка вимірювання не перевищувала 7%.

Квантові виходи барвників ( $\Phi_F$ ) розраховували за формулою 5.2 [202]:

$$\Phi_F = \Phi_{F \text{ Cy5}} \times (F / F_{\text{Cy5}}) \times (A_{\text{Cy5}} / A), \quad (5.2)$$

де  $\Phi_{F\text{ Cy5}}$  — квантовий вихід **Cy5** (еталон),  $F_{\text{Cy5}}$  та  $F$  інтегральні площі спектрів флуоресценції ( $F = \int I(\lambda)\lambda$ ) **Cy5** та барвників  $A_{\text{Cy5}}$  и  $A$  — оптичні щільності **Cy5** і досліджуваного барвника на довжині хвилі збудження.

Всі квантові виходи вимірювали 3-4 рази для кожного зразка і усереднювати.

### 5.3 Комплекси барвників з протеїнами

Концентровані розчини протеїнів з концентрацією  $1.5 \times 10^{-4}$  М готували у РВ. Концентровані розчини барвників з концентрацією  $1.5 \times 10^{-4}$  М готували в ДМФА.

Вимірювання комплексів проводили при концентраціях барвників і протеїнів 1 мкМ, окрім комплексів **SqO3**-БСА та **SqO3**-БСА-**SqCN3**, які також досліджувались при концентрації **SqO3** 0.87 мкМ.

Для отримання комплексів барвник-протеїн, до 3 мл РВ або розчину сечовини з концентрацією від 1 до 7 М, додавали 20 мкл розчину протеїну та 20 мкл розчину барвника у ДМФА. Отриманий розчин інкубували протягом 10 хвилин та досягнення рівноваги комплексу контролювали спектрофотометрично. Після утворення стійкого комплексу знімали спектри поглинання та флуоресценції.

Для кожного FRET експерименту, спочатку отримували комплекси протеїнів з барвником-донором та знімали його спектри поглинання та флуоресценції. Далі до комплексу додавали 20 мкл розчину барвника-акцептора у ДМФА. Розчин з подвійним комплексом інкубували протягом 10 хвилин. Вимірювання подвійного комплексу проводили після встановлення рівноваги, що контролювали спектрофотометрично. Комплекси барвник-донор та комплексу донор-протеїн-акцептор збуджували на одній довжині хвилі, яка для сквараїнових пар складала 600 нм, а для пари стирил-сквараїн 460нм.

## 5.4 Флуоресцентне титрування барвників розчином БСА

Для проведення титрування готували 100 мкМ вихідного розчину барвника з концентрацією  $1.5 \times 10^{-4}$  М і 6 мл розчину БСА з концентрацією 6 мг / мл (90.9 мкМ) у РВ з рН 7.4. Розведенням вихідного розчину БСА РВ готували серію розчинів з концентраціями від 0.013 мг / мл (0.20 мкМ) до 0.15 мг / мл (2.35 мкМ). До отриманих розчинів БСА додавали рівні об'єми (20 мкл) вихідного розчину барвника. Отримані розчини інкубували при кімнатній температурі та після встановлення рівноваги вимірювали спектри поглинання та флуоресценції.

## 5.5 Кон'югати барвників з протеїном

Для одержання кон'югату барвників з протеїном (БСА) карбоксильну групу ми перетворили на N-гідроксисукцинімідний (NHS) естер. Синтез NHS-естеру проводили за методикою [204], взаємодією карбонової кислоти з тетрафторборатом *O*-(*N*-сукцинімідил)-*N,N,N',N'*-тетраметилсечовини (TSTU) та *N,N*-діізопропілетиламіном (DIPEA) у сухому DMF. Потім NHS-естер без виділення з DMF зв'язували з протеїном (БСА) в бікарбонатному буфері (рН 9.0), як описано в методиках [205, 206]. Синтез NHS-естеру та зв'язування з БСА проводили при кімнатній температурі. Варіюванням часу зв'язування і співвідношення NHS-естеру і БСА отримували кон'югати з різним статистичним числом молекул барвника, пов'язаних з однією молекулою протеїну (D/P).

Одержані кон'югати відокремлювали від незв'язаного барвника за допомогою гель-проникаючої хроматографії (Sephadex G50).

Кожен кон'югат барвника з протеїном розводили фосфатним буфером з рН 7.4 до досягнення значення оптичної щільності в максимумі поглинання ( $A_{\text{кон'юг.}(\lambda_{\text{макс.}})}$ ) 0.15-0.20 в 1-см кюветі. Оптичну щільність вимірювали в максимумі поглинання кон'югату ( $A_{\text{кон'юг.}(\lambda_{\text{макс.}})}$ ) та на довжині хвилі 278 нм ( $A_{\text{кон'юг.}(278)}$ ). Далі вимірювали оптичну щільність вільного барвника в максимумі ( $A_{\text{бар.}(\lambda_{\text{макс.}})}$ ) та при 278 нм ( $A_{\text{бар.}(278)}$ ). Відношення барвник/протеїн розраховували

за формулою 5.3 з допущенням, що коефіцієнти екстинкції барвника при зв'язуванні не змінюються [111].

$$D/P = \frac{A_{\text{кон'юг.}(\lambda_{\text{макс}})} \varepsilon_{\text{БСА}}}{(A_{\text{кон'юг.}(278)} - x A_{\text{кон'юг.}(\lambda_{\text{макс.}})}) \varepsilon_{\text{бар.}}}, \quad (5.3)$$

де  $\varepsilon_{\text{бар.}}$  — коефіцієнт екстинкції барвника в  $\lambda_{\text{макс.}}$ ,  $\varepsilon_{\text{БСА}}$  — коефіцієнт екстинкції протеїну на 278 нм ( $\varepsilon_{\text{БСА}} = 43824 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$  [207]),  $x = A_{\text{бар.}(278)} / A_{\text{бар.}(\lambda_{\text{макс.}})}$ .

Для отримання подвійних кон'югатів донор-БСА-акцептор, спочатку синтезували кон'югат донора з БСА. Потім до нього прив'язували NHS-естер акцептора. Одержані подвійні кон'югати відокремлювали від незв'язаного барвника за допомогою гель-проникаючої хроматографії (Sephadex G50).

Базуючись на методі Фірордта [208], із спектрів подвійних кон'югатів визначали відношення донор/акцептор:

$$\frac{\text{Донор}}{\text{Акцептор}} = \frac{D^{\lambda_2} \varepsilon_{\text{Акцептора}}^{\lambda_1} - D^{\lambda_1} \varepsilon_{\text{Акцептора}}^{\lambda_2}}{D^{\lambda_1} \varepsilon_{\text{Донора}}^{\lambda_2} - D^{\lambda_2} \varepsilon_{\text{Донора}}^{\lambda_1}}, \quad (5.4)$$

де,  $D^{\lambda_1}$  — поглинання донора в максимумі,  $D^{\lambda_2}$  — поглинання акцептора в максимумі,  $\varepsilon_{\text{Донора}}^{\lambda_1}$  — коефіцієнт екстинкції донора в максимумі поглинання,  $\varepsilon_{\text{Донора}}^{\lambda_2}$  — коефіцієнт екстинкції донора на хвилі максимуму поглинання акцептора,  $\varepsilon_{\text{Акцептора}}^{\lambda_1}$  — коефіцієнт екстинкції акцептора на хвилі максимуму поглинання донора,  $\varepsilon_{\text{Акцептора}}^{\lambda_2}$  — коефіцієнт екстинкції акцептора в максимумі поглинання.

## 5.6 Дослідження зразків плазми крові людини

Концентровані розчини барвників з концентрацією  $1.5 \times 10^{-4} \text{ М}$  готували в ДМФА. Зразки плазми були люб'язно надані к.б.н., н.с. О. В. Фалько (Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України).

Для отримання комплексів барвник-протеїн, до 3 мл фізіологічного розчину (Юрія-Фарм, Україна) додавали 10 мкл плазми крові та 20 мкл розчина барвника у ДМФА. Отриманий розчин інкубували протягом 10 хвилин та досягнення рівноваги комплексу контролювали спектрофотометрично. Після утворення стійкого комплексу знімали спектри поглинання та флуоресценції.

Для кожного FRET експерименту, спочатку отримували комплекси протеїнів з барвником-донором та знімали його спектри поглинання та флуоресценції. Далі до комплексу додавали 20 мкл розчина барвника-акцептора у ДМФА. Розчин з подвійним комплексом інкубували протягом 10 хвилин. Вимірювання подвійного комплексу проводили після встановлення рівноваги, що контролювали спектрофотометрично. Комплекси барвник-донор та комплексу донор-протеїн-акцептор збуджували на одній довжині хвилі, яка для сквараїнових пар складала 600 нм, а для пари стирил-сквараїн 460 нм.

### 5.7 Математична обробка результатів

Інтеграл перекривання між смугою флуоресценції донора та поглинання акцептора визначали як [11]:

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda, \quad (5.5)$$

де  $\lambda$  — довжина хвилі,  $F_D(\lambda)$  — спектр флуоресценції донору,  $\varepsilon_A(\lambda)$  — спектр поглинання акцептору.

Відстань при якій відбувається 50% переносу енергії між випадково орієнтованими донором та акцептором ( $R_0$ ) обчислювали за формулою [11]:

$$R_0 = 0.211(k^2 n^{-4} \Phi_{FD} J(\lambda))^{1/6}, \quad (5.6)$$

де  $k^2$  – коефіцієнт орієнтації між молекулами донора і акцептора, що у загальному випадку дорівнює  $2/3$ ,  $n^4$  – коефіцієнт переломлення середовища,  $\Phi_{FD}$  – квантовий вихід флуоресценції донору,  $J(\lambda)$  – інтеграл перекривання

При визначенні FRET усі експериментальні спектри флуоресценції виправляли математично з урахуванням спектральної чутливості спектрофлуориметру та ефекту внутрішнього фільтра за формулою 5.7 [11]:

$$F_{corr} = F_{obs} \times 10^{(A_{ex} + A_{em})/2}, \quad (5.7)$$

де  $F_{corr}$  — виправлений спектр флуоресценції,  $F_{obs}$  — експериментальний спектр флуоресценції,  $A_{ex}$  — поглинання на довжині хвилі збудження,  $A_{em}$  — поглинання на відповідній довжині хвилі спектра флуоресценції.

Уявну ефективність переносу енергії ( $E_{FRET}$ ) розраховували за формулою 5.8 [11]:

$$E_{FRET} = [1 - (I_{DA} / I_D)] \times 100\%, \quad (5.8)$$

де  $I_D$  — інтенсивність флуоресценції донора в максимумі у відсутності акцептора,  $I_{DA}$  — інтенсивність флуоресценції донора у присутності акцептора в максимумі смуги флуоресценції донора.

Раціометричний параметр FRET ratio визначали як співвідношення піків флуоресценції за формулою 5.9 [16]:

$$FRET\ ratio = (F_A - \alpha \times F_D) / F_D \quad (5.9)$$

де  $F_D$  – інтенсивність флуоресценції донора в присутності акцептора,  $F_A$  – інтенсивність флуоресценції акцептора в присутності донора,  $\alpha$  – коефіцієнт,  $\alpha = F_{D\lambda_{maxA}} / F_{D\lambda_{max}}$  ( $F_{D\lambda_{maxA}}$  – інтенсивність флуоресценції донора без акцептора на



довжині хвилі максимуму випромінювання акцептора,  $F_{D\lambda_{\max}}$  – інтенсивність флуоресценції донора без акцептора в максимумі).

Обчислення і побудову градувальних залежностей проводили із використанням користування програмного забезпечення Microcal Origin 8.0 Pro.

### 5.8 Статистична обробка результатів

Статистичну обробку отриманих даних оцінювали відповідно до рекомендацій [209], при довірчій ймовірності 0.95.

Обчислення і побудову градувальних залежностей проводили з використанням програмного забезпечення Microcal Origin 8.0 Pro и Microsoft Excel.

Випадкові похибки характеризували стандартним відхиленням  $s$ , розрахованим за формулами (5.10) та (5.11):

$$s = \sqrt{\frac{\sum(\bar{X} - X_i)^2}{n-1}}, \quad (5.10)$$

$$\bar{X} = \frac{\sum(X_i)}{n}, \quad (5.11)$$

де  $\bar{X}$  — середнє значення вимірюваної величини,  $n$  – число дослідів.

Відносне стандартне відхилення  $s_r$  вираховували за формулою (5.12):

$$s_r = \frac{s}{\bar{X}}, \quad (5.12)$$

Довірчий інтервал для середньої величини рассчитивали за рівнянням (5.13):

$$X = \bar{X} \pm \frac{t(P, f)S_x}{\sqrt{m}}, \quad (5.13)$$

$\bar{X}$  — середнє значення вимірюваної величини,  $t(P, f)$  —  $t$ - критерій (критерій Ст'юдента),  $P$  — довірна ймовірність,  $m$  — число паралельних дослідів,  $f$  — число ступенів свободи ( $f = m - 1$ ).

## Висновки до розділу 5

1. Відпрацьовані методики отримання стабільних комплексів сквараїнових, норсквараїнових та стирилового барвників з альбумінами бика і людини з жирними та без жирних кіслот, пероксидазою хрому.
2. Отримано та відпрацьовано методики для визначення параметрів уявної  $E_{\text{FRET}}$  та FRET ratio при зміні конформації протеїнів.
3. Отримано та відпрацьовано методики та для визначення параметрів уявної  $E_{\text{FRET}}$  та FRET ratio у зразках плазми крові людини.

Результати розділу 5 опубліковано в наступних роботах автора [122, 123, 125, 128, 130, 146, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 191].

## ВИСНОВКИ

Визначено закономірності зв'язку між структурою та спектрально-люмінесцентними і фотофізичними властивостями барвників у розчинах та при комплексоутворенні з протеїнами, створено системи з резонансним переносом енергії на основі пар чутливих до мікрооточення флуоресцентних барвників і вирішено наукову проблему розробки нового, чутливого методу визначення конформаційних змін у протеїнах. Доведено можливість практичного застосування нового методу для визначення придатності плазми крові людини для медичного використання.

1. Сквараїнові та норсквараїнові барвники виявляють негативний сольватохромізм та сольватофлуорохромізм, при цьому спектральні смуги норсквараїнів є більш довгохвильовими у порівнянні зі смугами сквараїнів аналогічної будови. Квантовий вихід флуоресценції норсквараїнів, на відміну від сквараїнів, майже не чутливий до полярності середовища.

2. Норсквараїнові барвники є менш чутливими до присутності протеїну (БСА), ніж сквараїнові барвники. При утворенні комплексів з БСА спектральні смуги сквараїнів зсуваються у довгохвильову частину спектру на 10–36 нм відносно максимумів у водних розчинах, при цьому квантові виходи зростають у 2–47 разів. Найбільші спектральні зміни при утворенні комплексів спостерігаються для оксо-, диціанометиленових сквараїнів та стирилового барвників, що не містять сульфогруп, тому ці барвники є найбільш перспективними зондами. Збільшення водорозчинності барвників шляхом введення сульфогруп знижує їх здатність до утворення комплексів з протеїнами у водних розчинах при еквімолярному співвідношенні між ними.

3. Спектральні властивості та квантові виходи флуоресценції барвників залежать від типу протеїну з яким утворюють комплекс. Відносно водного розчину, у присутності альбумінів (молекулярна маса ~66 кДа) барвники мають більші спектральні зміни, ніж з лізоцимом (молекулярна маса 15 кДа). На відміну від стирилового барвника, квантовий вихід сквараїнових барвників

істотно залежить не тільки від типу альбуміну, але і від присутності зв'язаних з ним жирних кислот.

4. Чутливість методу визначення конформаційних змін протеїнів, оцінена за динамічним діапазоном (відношення вимірюваного параметру на рівні 90 та 10% кривої), залежить як від вибору барвників для донорно-акцепторної пари, так і від методу математичної обробки отриманих результатів. Для пари сквараїнових барвників більша чутливість методу досягається при обчисленні ефективності переносу енергії. Для пари стирил-сквараїн більші зміни спостерігаються при визначенні параметру співвідношення інтенсивностей флуоресценції барвників (FRET ratio) у протеїні. Водночас, для обох пар, за допомогою параметра FRET ratio стає можливою реєстрація менших конформаційних змін протеїнів.

5. Серед можливих комбінацій зв'язування сквараїнових барвників з бичачим альбуміном, а саме: нековалентне зв'язування (комплексоутворення) обох барвників з протеїном, ковалентне зв'язування (кон'югація) барвника-донора і комплексоутворення з барвником-акцептором, та кон'югація обох барвників — найвища чутливість (зміна параметра у 9 разів) досягається при використанні барвників, що не зв'язані з протеїном ковалентним зв'язком, а найменша (у 1.1 разів) — при кон'югації обох барвників з протеїном.

6. Варіювання мольного співвідношення компонентів у системі БСА з некон'югованими сквараїновими донором та акцептором дозволяє адаптувати метод до визначення необхідного ступеня змін конформації протеїну. Так, зменшення відносної кількості донора у порівнянні з системою з еквімолярним складом компонентів звужує діапазон реєстрованих конформаційних змін та зменшує динамічний діапазон ефективності переносу енергії у 1.5 рази, але, водночас, забезпечує чутливість до малих змін конформації протеїну.

7. В системах з гетерогенним складом протеїнів, а саме у плазмі крові людини, у зразках, що не були заморожені та заморожувалася до  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , зі зменшенням температури заморожування для обох пар барвників параметр FRET ratio майже не змінюється, а ефективність переносу енергії зростає у 1.3 рази для пари сквараїнових барвників та зменшується у 1.2 рази

для пари стирил–сквараїн. Щодо порівняння зразків свіжої (нативної) плазми із зразками з вичерпаним терміном придатності: обидва параметри (ефективність переносу енергії та FRET ratio) змінюються у 1.6 разів для сквараїнової пари та у 1.3 рази для пари стирил-сквараїн, що дозволяє визначати придатність плазми крові для медичного використання.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Förster Th. Experimentelle und theoretische Untersuchung des zwischenmolekularen Uebergangs von Elektronenanregungsenergie / Th. Förster // Z. Naturforsch. – 1949. – Vol. 4A. – P.321–327.

2 Single-molecule spectroscopy of protein folding in a chaperonin cage / H. Hagen, H. Frank, H. P. Shawn [et al.] // PNAS. – 2010. – Vol. 107, Is. 26 – P. 11793–11798.

3. Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates / N. Panchuk-Voloshina, R. P. Haugland, J. Bishop-Stewart [et al.] // J. Histochem. Cytochem. – 1999. – Vol. 47. – P. 1179–1188.

4. FRET Based Quantification and Screening Technology Platform for the Interactions of Leukocyte FunctionAssociated Antigen-1 (LFA-1) with InterCellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) / S. Chakraborty, D. Núñez, Sh.-Y. Hu [et al.] // PLOS ONE. – 2014. – Vol. 9, Is. 7. – P. 102572.

5. Quantifying the efficiency of various FRET constructs using OptiMiSTM / M. R. Stoneman, S. Patowary, D. R. Singh [et al.] // BioTechniques. – 2012. – Vol. 52, Is. 3. – P. 192–195.

6. High-throughput time-resolved FRET reveals Akt/PKB activation as a poor prognostic marker in breast cancer / S. Veeriah, P. Leboucher, J. de Naurois [et al.] // Cancer Res. – Vol. 74, Is. 18. – P. 4983–4995.

7. Real-time analysis of cAMP-mediated regulation of ciliary motility in single primary human airway epithelial cells / A. Schmid, G. Bai, N. Schmid [et al.] // J. Cell Sci. – 2006. – Vol. 119. – P. 4176–4186.

8. A practical method for monitoring FRET-based biosensors in living animals using two-photon microscopy / W. Tao, M. Rubart, J. Ryan [et al.] // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2015. – Vol. 309, Is. 11. – P. 724–735.

9. Ensemble and single-molecule detected time-resolved FRET methods in studies of protein conformations and dynamics / T. Orevi, E. Lerner, G. Rahamim [et al.] // Methods Mol. Biol. – 2014. – Vol. 1076. – P. 113–169.

10. Roy R. A practical guide to single-molecule FRET / R. Roy, S. Hohng, T. Ha // *Nat. Methods.* – 2008. – Vol. 5. – P. 507–516.
11. Lakowicz J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* – 3rd ed., Springer, 2006. – 960 p.
12. FRET-Based Small-Molecule Fluorescent Probes: Rational Design and Bioimaging Applications / L. Yuan, W. Lin, K. Zheng, S. Zhu // *Acc. Chem. Res.* – 2013. – Vol. 46, Is. 7. –P. 1462–1473.
- 13 Claude B. FRET or No FRET: A Quantitative Comparison / B. Claude, D. Gaudenz // *Biophys. J.* – 2003. – Vol. 84. – P. 3992–4010.
14. Wallace B. Förster resonance energy transfer: Role of diffusion of fluorophore orientation and separation in observed shifts of FRET efficiency / B. Wallace, P. J. Atzberger // *PLoS ONE.* – 2017. – Vol. 12, Is. 5. – P. 0177122.
15. Effects of fluorophore attachment on protein conformation and dynamics studied by spFRET and NMR / C. Sánchez-Rico, L. V. von Voithenberg, L. Warner [et al.] // *Chem. Eur. J.* – 2017. – Vol. 23, Is. 57. – P. 14267–14277.
16. Graham D.L. A Method to Measure the Interaction of Rac/Cdc42 with Their Binding Partners Using Fluorescence Resonance Energy Transfer between Mutants of Green Fluorescent Protein / D.L. Graham, P.N. Lowe, P.A. Chalk // *Anal. Biochem.* – 2001. – Vol. 296. – P. 208–217.
17. Robust approaches to quantitative ratiometric FRET imaging of CFP/YFP fluorophores under confocal microscopy / M. R. Tadross, S. A. Park, B. Veeramani, D. T. Yue // *J. Microsc.* – 2009. – Vol. 233, Is. 1. – P. 192–204.
18. A FRET-based biosensor for measuring Gα13 activation in single cells / M. Mastop, N. R. Reinhard, C. R. Zuconelli [et al.] // *PLoS ONE.* – 2018. – Vol. 13, Is. 3. – P. 0195649.
19. A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs / B. T. Bajar, E. S. Wang, S. Zhang [et al.] // *Sensors.* – 2016. – Vol. 16, Is. 9. – P. 1488.
20. Szöllösi J. Application of Fluorescence Resonance Energy Transfer in the Clinical Laboratory: Routine and Research / J. Szöllösi, S. Damjanovich, L. Mátyus // *Cytometry.* – 1998. – Vol. 34. – P. 159–179.

21. Stryer L. Fluorescence Energy Transfer as a Spectroscopic Ruler / L. Stryer // *Ann. Rev. Biochem.* – 1978. – Vol.47. – P. 819–846.
22. Llères D. Detecting Protein-Protein Interactions In Vivo with FRET using Multiphoton Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) / D. Llères, S. Swift, A. I. Lamond // *Curr. Protoc. Cytom.* – 2007. – Vol. 42. – P. 12.10.1 – 12.10.19.
23. *Caenorhabditis elegans* paraoxonase-like proteins control the functional expression of DEG/ENaC mechanosensory proteins / Y. Chena, S. Bharill, Z. Altun [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 2016. – Vol. 27, Is. 8. – P. 1181-1407.
24. Fluorescence Energy Transfer Immunoassay Based on a Long Lifetime Luminescent Metal-Ligand Complex / H. J. Youn, E. Terpetschnig, H. Szmackinski, J. R. Lakowicz // *Anal. Biochem.* – 1995. – Vol. 232. – P. 24–30.
25. Gryczynski Z. Fluorescence of Myoglobin and Hemoglobin / Z. Gryczynski, J. Lubkowski, E. Bucci // *Methods in Enzymology.* – 1997. – Vol. 78. – P. 538–569.
26. Silvius J. R. Fluorescence-quenching and resonance energy transfer studies of lipid microdomains in model and biological membranes / J. R. Silvius, I. R. Nabi // *Mol. Membr. Biol.* – 2006. – Vol. 23, Is. 1. – P. 5–16.
27. Sekar R. B. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations / R. B. Sekar, A. Periasamy // *J. Cell Biol.* – 2003. – Vol. 160, Is. 5. – P. 629–633.
28. Periasami A. Molecular Imaging — FRET Microscopy and Spectroscopy / A. Periasami, R.N. Day, editors. – New York: Oxford University Press. – 2005. – P. 126-145.
29. Truong K. The use of FRET imaging microscopy to detect protein–protein interactions and protein conformational changes in vivo / K. Truong, M. Ikura // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2001. – Vol. 11, Is. 5. – P. 573–578.
30. Pollok B. Using GFP in FRET-based applications / B. Pollok, R. Heim // *Trends Cell Biol.* – 1999. – Vol. 9, Is. 2. – P. 57–60.
31. Piljic A. Analysis of Protein Complex Hierarchy in Living Cells / A. Piljic, C. Schultz // *ACS Chem. Biol.* – 2008. – Vol. 3. – P. 749–755.



32. Uversky V N. Protein Misfolding, Aggregation, and Conformational Diseases//Part B: Molecular Mechanisms of Conformational Diseases / V. N. Uversky, A. L. Fink // Boston, MA: Springer. – 2006. – 474 p.

33. Validation of protein structures derived by NMR spectroscopy / C.A.E.M. Spronk, S. B. Nabuurs, E. Krieger [et al.] // Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. – 2004. – Vol. 45, Is. 3. – P. 315-337.

34. Dynamic Equilibria between Monomeric and Oligomeric Misfolded States of the Mammalian Prion Protein Measured by  $^{19}\text{F}$  NMR / S. T. Larda, K. Simonetti, M. S. Al-Abdul-Wahid [et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 2013. – Vol. 135, Is. 28. – P. 10533–10541.

35. Tang C. Accurate determination of leucine and valine side-chain conformations using U-[ $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}/2\ \text{H}$ ]/[ $^1\ \text{H}$ -(methine/methyl)-Leu/Val] isotope labeling, NOE pattern recognition, and methine C $\alpha$ –H $\alpha$ /C $\beta$ –H $\beta$  residual dipolar couplings: application to the 34-kDa enzyme IIACHitobiose / C. Tang, J. Iwahara, M. Clore // J. Biomol. NMR. – 2005. – Vol. 33, Is. 2. – P. 105–121.

36. Simultaneous High-Throughput Conformational and Colloidal Stability Screening Using a Fluorescent Molecular Rotor Dye, 4-(4-(Dimethylamino)styryl)-N-Methylpyridinium Iodide (DASPMI) / J. J. H. Wong, S. K. Wright, I. Ghosalli [et al.] // J. Biomol. Screen. – 2016. – Vol. 21, Is. 8. – P. 842–850.

37. Differential Scanning Calorimetry — A Method for Assessing the Thermal Stability and Conformation of Protein Antigen / I. B. Durowoju, K. S. Bhandal, J. Hu [et al.] // J. Vis. Exp. – 2017. – Vol. 121. – P. 55262.

38. The Importance of Protein-Protein Interactions on the pH-Induced Conformational Changes of Bovine Serum Albumin: A Small-Angle X-Ray Scattering Study / L. R. S. Barbosa, M. G. Ortore, F. Spinozzi [et al.] // Biophys. J. – 2010. – Vol. 98, Is. 1 – P. 147–157.

39. Role of Computational Methods in Going beyond X-ray Crystallography to Explore Protein Structure and Dynamics / A. Srivastava, T. Nagai, A. Srivastava [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2018. – Vol. 19, Is. 11. – P. 3401.

40. Brahma A. Characterization of a dimeric unfolding intermediate of bovine serum albumin under mildly acidic condition / A. Brahma, C. Mandal, D. Bhattacharyya // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – Vol. 1751, Is. 2. – P. 159–169.
41. Gelamo E.L. Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants / E.L. Gelamo, M. Tabak // *Spectrochim. Acta A.* – 2000. – Vol. 56. – P. 2255–2271.
42. Biophysical Characterization of Structural Properties and Folding of Interleukin-1 Receptor Antagonist / R. F. Latypov, T. S. Harvey, D. Liu [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 368, Is. 4. – P. 1187–1201.
43. Environment Sensitive Fluorescent Analogue of Biologically Active Oxazoles Differentially Recognizes Human Serum Albumin and Bovine Serum Albumin: Photophysical and Molecular Modeling Studies / J. Maiti, S. Biswasa, A. Chaudhurib [et al.] // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2017. – Vol. 175. – P. 191–199.
44. Near-Infrared Fluorescence Probes for Enzymes Based on Binding Affinity Modulation of Squarylium Dye Scaffold / D. Oushiki, H. Kojima, Y. Takahashi [et al.] // *Analyt. Chem.* – 2012. – Vol. 84. – P. 4404–4410.
45. BODIPY-based fluorescent probes for sensing protein surface-hydrophobicity / N. Dorh, Sh. Zhu, K.B. Dhungana [et al.] // *Scientific Reports.* – 2015. – Vol. 5. – P. 18337.
46. Luminescence of aniline blue in hydrophobic cavity of BSA / Y. Chang-Ying, L. Yi, Zh. Dan [et al.] // *J. Photochem. Photobiol.* – 2007. – Vol. 188 – P. 51–55.
47. More stable structure of wheat germ lipase at low pH than its native state / E. Ahmad, S. Fatima, M. M. Khan, R. H. Khan // *Biochimie.* – 2010. – Vol. 92, Is. 7. – P. 885–893.
48. Lindgren M. Detection and Characterization of Aggregates, Prefibrillar Amyloidogenic Oligomers, and Protofibrils Using Fluorescence Spectroscopy / M. Lindgren, K. Sörgjerd, P. Hammarström // *Biophys. J.* – Vol. 88, Is. 6. – P. 4200–4212.

49. Folding pathway of the pyridoxal 5' -phosphate C-S lyase MalY from *Escherichia coli* / M. Bertoldi, B. Cellini, D. V. Laurents, C. B. Voltattorni // *Biochem. J.* – 2005. – Vol. 389. – P. 885–898.

50. Isothermal Analysis of ThermoFluor Data can readily provide Quantitative Binding Affinities / N. Bai, H. Roder, A. Dickson, J. Karanicolas // *Sci. Rep.* – 2019. – Vol. 9. – P. 2650.

51. Huynh K. Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay / K. Huynh, C. L. Partch // *Curr. Protoc. Protein Sci.* – 2015. – Vol. 79. – P. 28.9.1–28.9.14.

52. Haque N. Analysing the microenvironment of 2-*p*-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate (TNS) in solvents and in different conformational states of proteins in relation to its fluorescence properties: a computational study / N. Haque, K. Baratam, N. P. Prabhu // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2017. – Vol. 36. – P. 24656-24666.

53. Nail S. L. Development and Manufacture of Protein Pharmaceuticals / S. L. Nail, M. J. Akers. – Springer Science & Business Media. – 2012. – 464 p.

54. Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation / Ch. Xue, T. Y. Lin, D. Chang, Z. Guo // *R. Soc. open sci.* – Vol. 4. – P. 160696.

55. Wördehoff M. M.  $\alpha$ -Synuclein Aggregation Monitored by Thioflavin T Fluorescence Assay / M. M. Wördehoff, W. Hoyer // *Bio-Protoc.* – 2018. – Vol. 8, Is. 14. – P. e2941.

56. Navarro S. Fluorescent dye ProteoStat to detect and discriminate intracellular amyloid-like aggregates in *Escherichia coli* / S. Navarro, S. Ventura // *Biotechnol J.* – 2014. – Vol. 9, Is. 10. – P. 1259-1266.

57. Evaluation of fluorescent dyes to measure protein aggregation within mammalian cell culture supernatants / Sh. Oshinbolu, R. Shah, G. Finka [et al.] // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 93. – P. 909–917.

58. Fluorescence energy transfer indicates similar transient and equilibrium intermediates in staphylococcal nuclease folding / C. Nishimura, R. Riley, P. Eastman, A. L. Fink // *J. Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 299. – P. 1133-1146.

59. Structure is lost incrementally during unfolding of barstar / G.S. Lakshmikanth, K. Sridevi, G. Krishnamoorthy, J. B. Udgaonkar // *Nat. Struct. Biol.* – 2001. – Vol. 8. – P. 799–804.

60. Ca<sup>2+</sup> induces an extended conformation of the inhibitory region of troponin I in cardiac muscle troponin / W. J. Dong, J. Xing, J. M. Robinson, H. C. Cheung // *J. Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 314. – P. 51–61.

61. Santini S. Revisitation of FRET methods to measure intraprotein distances in Human Serum Albumin / S. Santini, A. R. Bizzarri, S. Cannistraro // *J. Lumin.* – 2016. – Vol. 179. – P. 322–327.

62. Togashi D. M. A Fluorescence Analysis of ANS Bound to Bovine Serum Albumin: Binding Properties Revisited by Using Energy Transfer / D. M. Togashi, A. G. Ryder // *J. Fluoresc.* – 2008. – Vol. 18. – P. 519–526.

63. Evidence of an Intermediate and Parallel Pathways in Protein Unfolding from Single-Molecule Fluorescence / A. Orte, T. D. Craggs, S. S. White [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – Vol. 130. – P. 7898–7907.

64. Detection of Dihydrofolate Reductase Conformational Change by FRET Using Two Fluorescent Amino Acids / Sh. Chen, N. E. Fahmi, L. Wang [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2013. – Vol. 135, Is. 35. – P. 12924–12927.

65. FRET analysis of protein conformational change through position-specific incorporation of fluorescent amino acids / D. Kajihara, R. Abe, I. Iijima [et al.] // *Nat. Methods.* – 2006. – Vol. 3. – P. 923–929.

66. Synthesis of double-fluorescent labeled prion protein for FRET analysis / J. Hosokawa-Muto, K. Yamaguchi, Y. O. Kamatari, K. Kuwata // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2015. – Vol. 79, Is. 11. – P. 1802–1809.

67. Design Consideration and Probes for Fluorescence Resonance Energy Transfer Studies / M. Sinev, P. Landsmann, E. Sineva [et al.] // *Bioconjugate Chem.* – 2000. – Vol. 11, Is. 3. – P. 352–362.

68. A General Strategy for Site-Specific Double Labeling of Globular Proteins for Kinetic FRET Studies / V. Ratner, E. Kahana, M. Eichler, E. Haas // *Bioconjugate Chem.* – 2002. – Vol. 13, Is. 5. – P. 1163–1170.

69. Probing Single-Molecule T4 Lysozyme Conformational Dynamics by Intramolecular Fluorescence Energy Transfer// Y. Chen, D. Hu, E. R. Vorpapel, H. P. Lu // *J. Phys. Chem. B.* – 2003. – Vol. 107, Is. 31. – P. 7947–7956.

70. Single-molecule protein folding: diffusion fluorescence resonance energy transfer studies of the denaturation of chymotrypsin inhibitor 2 / A. A. Deniz, T. A. Laurence, G. S. Belligere [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97. – P. 5179–5184.

71. Probing structural heterogeneities and fluctuations of nucleic acids and denatured proteins / T. A. Laurence, X. X. Kong, M. Jager, S. Weiss // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – Vol. 102. – P. 17348–17353.

72. Schuler B. Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy / B. Schuler, E. A. Lipman, W. A. Eaton // *Nature.* – 2002. – Vol. 419. – P. 743–747.

73. Sherman E. Coil – globule transition in the denatured state of a small protein / E. Sherman, G. Haran // *PNAS.* – 2006. – Vol. 103, Is. 31. – P. 11539–11543.

74. Urea-induced unfolding of the immunity protein Im9 monitored by spFRET / T. Tezuka-Kawakami, C. Gell, D. J. Brockwell [et al.] // *Biophys. J.* – 2006. – Vol. 91. – P. 42–44.

75. Mapping protein collapse with single-molecule fluorescence and kinetic synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy / A. Hoffmann, A. Kane, D. Nettels [et al.] // *PNAS.* – 2007. – Vol. 104, Is. 1. – P. 105–110.

76. Quantifying internal friction in unfolded and intrinsically disordered proteins with single-molecule spectroscopy / A. Soranno, B. Buchli, D. Nettels [et al.], // *PNAS.* – 2012. – Vol. 109, Is. 44. – P. 17800–17806.

77. Integrated view of internal friction in unfolded proteins from single-molecule FRET, contact quenching, theory, and simulations / A. Soranno, A. Holla, F. Dingfelder [et al.] // *PNAS.* – 2017. – Vol. 114, Is. 10. – P. 1833–1839.

78. Characterizing the unfolded states of proteins using single-molecule FRET spectroscopy and molecular simulations / K. A. Merchant, R. B. Best, J. M. Louis [et al.] // PNAS. – 2007. – Vol. 104, Is. 5. – P. 1528–1533.

79. Single-molecule spectroscopy of protein folding in a chaperonin cage / H. Hofmann, F. Hillger, Sh. H. Pfeilb [et al.] // PNAS. – 2010. – Vol. 107, Is. 26. – P. 11793–11798.

80. The ATP-waiting conformation of rotating F1-ATPase revealed by single-pair fluorescence resonance energy transfer / R. Yasuda, T. Masaike, K. Adachi [et al.] // PNAS. – 2003. – Vol. 100, Is. 16. – P. 9314–9318.

81. Development of an spFRET method to measure structure changes in ion exchange proteins / J. F. Lesoine, B. Holmberg, P. Maloney [et al.] // Acta Physiol. – 2006. – Vol. 187. – P. 141–147.

82. Lu M. Probing Protein Multidimensional Conformational Fluctuations by Single-Molecule Multiparameter Photon Stamping Spectroscopy / M. Lu, H. P. Lu // J. Phys. Chem. B. – 2014. – Vol. 118. – P. 11943–11955.

83. Manipulating Protein Conformations by Single-Molecule AFM-FRET Nanoscopy / Y. He, M. Lu, J. Cao, H. P. Lu // ACS Nano. – 2012. – Vol. 6, Is. 2. – P. 1221–1229.

84. Distinguishing between cooperative and unimodal downhill protein folding / F. Huang, S. Sato, T. D. Sharpe [et al.] // PNAS. – 2007. – Vol. 104, Is. 1. – P. 123–127.

85. Meng F. Highly Disordered Amyloid- $\beta$  Monomer Probed by Single-Molecule FRET and MD Simulation / F. Meng, M. M. J. Bellaiche, Jae-Yeol Kim [et al.] // Biophys. J. – 2018. – Vol. 114, Is. 4. – P. 870–884.

86. Hamadani K. M. Nonequilibrium Single Molecule Protein Folding in a Coaxial Mixer / K. M. Hamadani, Sh. Weiss // Biophys. J. – 2008. – Vol. 95, Is. 1. – P. 352–365.

87. Kuzmenkina E. V. Single-molecule Förster resonance energy transfer study of protein dynamics under denaturing conditions / E. V. Kuzmenkina, C. D. Heyes, G. U. Nienhaus // PNAS. – 2005. – Vol. 102, Is. 43. – P. 15471–15476.

88. Kuzmenkina E.V. Single-molecule FRET study of denaturant induced unfolding of RNase H / C. D. Heyes, G. U. Nienhaus // *J. Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 357, Is. 1. – P. 313–324.

89. A zwitterionic squaraine dye with a large Stokes shift for in vivo and site-selective protein sensing / Y. Xu, Q. Liu, X. Li [et al.] // *Chem. Commun.* – 2012. – Vol. 48, Is. 92. – P. 11313–11315.

90. Yu H. Switching off FRET by analyte-induced decomposition of squaraine energy acceptor: A concept to transform “turn off” chemodosimeter into ratiometric sensors / H. Yu, M. Fu, Y. Xiao // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2010. – Vol. 12, Is. 27. – P. 7386–7391.

91. A FRET-based biosensor for the quantification of glucose in culture supernatants of mL scale microbial cultivations / J. Otten, N. Tenhaef, R. P. Jansen [et al.] // *Microb. Cell Fact.* – 2019. – Vol. 18. – P. 143.

92. Wei L. FRET ratiometric probes reveal the chiral-sensitive cysteine-dependent H<sub>2</sub>S production and regulation in living cells / L. Wei, L. Yi, F. Song [et al.] // *Sci. Rep.* – 2014.– Vol. 4. – P. 4521.

93. A. FRET versus PET: ratiometric chemosensors assembled from naphthalimide dyes and crown ethers / P. A. Panchenko, Y. V. Fedorov, O. A. Fedorova, G. Jonusauskas // *PCCP, Royal Society of Chemistry.* – 2015. – Vol. 17, Is. 35. – 22457-23282.

94. A facile "click" reaction to fabricate a FRET-based ratiometric fluorescent Cu<sup>2+</sup> probe / Z. Hu, J. Hu, Y. Cui [et al.] // *J. Mater. Chem. B.* – 2014. – Vol. 2. – P. 4467–4472.

95. Activity-based ratiometric FRET probe reveals oncogene-driven changes in labile copper pools induced by altered glutathione metabolism / C. Y.-S. Chunga, J. M. Posimob, S. Leea [et al.] // *PNAS.* – 2019. – Vol. 116, Is. 37. – P. 18285–18294.

96. Ratiometric fluorescence chemosensors for copper(II) and mercury(II) based on FRET systems / G. He, X. Zhang, C. He [et al.] // *Tetrahedron.* – 2010. – Vol. 66, Is. 51. – P. 9762–9768.

97. Lignosulfonate: A Convenient Fluorescence Resonance Energy Transfer Platform for the Construction of a Ratiometric Fluorescence pH-Sensing Probe / Y. Xue, Z. Wan, X. Ouyang, X. Qiu // *J. Agric. Food Chem.* – 2019. – Vol. 67, Is. 4. – P. 1044–1051.

98. Confocal ratiometric voltage imaging of cultured human keratinocytes reveals layer-specific responses to ATP / R. Burgstahler, H. Koegel, F. Rucker [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2003. – Vol. 284, Is. 4. – P. 944–952.

99. A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity / C. D. Harvey, A. G. Ehrhardt, C. Cellurale [et al.] // *PNAS.* – 2008. – Vol. 105, Is. 49. – P. 19263–19268.

100. Simple and Efficient Strategy for Site-Specific Dual Labeling of Proteins for Single-Molecule Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis / J. Kim, M-H Seo, S. Lee [et al.] // *Anal. Chem.* – 2013. – Vol. 85, Is. 3. – P. 1468–1474.

101. Rational design, synthesis, and characterization of highly fluorescent optical switches for high-contrast optical lock-in detection (OLID) imaging microscopy in living cells / C. Petchprayoon, Y. Yan, S. Mao, G. Marriott // *Bioorg. Med. Chem.* – 2011. – Vol. 19, Is. 3. – P. 1030-1040.

102. Qu Q. FRET analysis indicates that the two ATPase active sites of the P-glycoprotein multidrug transporter are closely associated / Q. Qu, F. J. Sharom // *Biochemistry.* – 2001. – Vol. 40. – P. 1413–1422.

103. Strength in Numbers: Effects of Acceptor Abundance on FRET Efficiency / Á.I. Fábíán, T. Rente, J. Szöllösi [et al.] // *Chem. Phys. Chem.* – 2010. – Vol.11. – P. 3713–3721.

104. Long-Distance FRET Analysis: A Monte Carlo Simulation Study / P. Bojarski, L. Kulak, K. Walczewska-Szewc [et al.] // *J. Phys. Chem. B.* – 2011. – Vol. 115. – P. 10120–10125.

105. Pope A. J. Homogeneous Fluorescence Readouts for Miniaturized High-throughput Screening: Theory and Practice / A. J. Pope, U. M. Haupts, K. J. Moore // *Drug Discov. Today.* – 1999. – Vol. 4, Is. 8. – P. 350–362.



106. Kanony C. Photobleaching of asymmetric cyanines used for fluorescence imaging of single DNA molecules / C. Kanony, B. Åkerman, E. Tuite // *J. Am. Chem. Soc.* – 2001. – Vol. 123, Is. 33. – P. 7985–7995.

107. Photobleaching of a cyanine dye in solution and in membranes / O. Valdes-Aguilera, L. Cincotta, J. Foley, I. E. Kochevar // *Photochem. Photobiol.* – 1987. – Vol. 45, Is. 3. – P. 337–344.

108. Fluorescent probes and labels for biomedical applications / L. Patsenker, A. Tatarets, O. Kolosova [et al.] // *Fluorescence Methods and Applications: Spectroscopy, Imaging, and Probes.* – 2008. – Vol. 1130, Is. 1. – P. 179-187.

109. Анализ влияния озона на сывороточный альбумин с применением флуоресцентных зондов на основе тозилатов 2- и 4-(4-диметиламинофенил)-1-этенил)-1-алкилпиридиния (ДСП) / О. А. Соколик, Т. С. Дюбко, Ю. И. Козин [и др.] // *Доповіді Національної академії наук України* – 2011. – № 8. – с. 136–145.

110. Cyanine dye labeling reagents: Sulfoindocyanine succinimidyl esters / R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, S. R. Mujumdar [et al.] // *Bioconjugate Chem.* – 1993. – Vol. 4, Is. 2. – P. 105–111.

111. Cyanine-Labeling Reagents: Sulfobenzindocyanine Succinimidyl Esters / S. R. Mujumdar, R. B. Mujumdar, C. M. Grant, A. S. Waggoner // *Bioconjugate Chem.* – 1996. – Vol. 7, Is. 3, P. 356-362.

112. Ищенко А. А. Строение и спектрально-люминесцентные свойства полиметиновых красителей / А. А. Ищенко. – Киев: Наукова думка, 1994. – 232 с.

113. Markova L. I. Comparison of a series of hydrophilic squaraine and cyanine dyes for use as biological labels / L. I. Markova, E. A. Terpetschnig, L. D. Patsenker // *Dyes Pigments.* – 2013. – Vol. 99, Is. 3. – P. 561–570.

114. Efficient near infrared fluorescence detection of elastase enzyme using peptide-bound unsymmetrical squaraine dye / M. Saikiran, D. Sato, S. S. Pandey [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2017. – Vol. 27, Is. 17. – P. 4024–4029.

115. An Aggregating Amphiphilic Squaraine: A Light-up Probe That Discriminates Parallel G-Quadruplexes / V. Grande, F. Doria, M. Freccero, F. Würthner // *Angew. Chem.* – 2017. – Vol. 56, Is. 26. – P. 7520–7524.

116. Amphiphilic squaraine dye aggregates: evidence for a cyclic chiral structure as a general supramolecular structure for aggregates of dyes and aromatic molecules / H. Chen, K.-Y. Law, J. Perlstein [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 1995. – Vol. 117. – P. 7257–7258.

117. Tatikolov A. S. Photophysical and aggregation properties of a longchain squarylium indocyanine dye / A. S. Tatikolov, S. M. B. Costa // *J. Photochem. Photobiol. A.* – 2001. – Vol. 140, Is. 2. – P. 147–156.

118. Cyanines during the 1990s: A Review / A. Mishra, R. K. Behera, P. K. Behera [et al.] // *Chem. Rev.* – 2000. – Vol. 100, Is. 6. – P. 1973–2012.

119. Haugland R. P. Handbook of fluorescent probes and research products. – Eugene: Molecular Probes Inc., 2002. – 966 p.

120. Ugwu S. O. The Effect of Buffers on Protein Conformational Stability / S. O. Ugwu, S. P. Apte // *Pharm. Technol.* – 2004. – Vol. 28. – P. 86-108.

121. Reichardt C. Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry / C. Reichardt. – Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2003. – 653 p.

122. Synthesis, molecular structure and spectral properties of indolenine based nonsquaraines versus squaraines / O.S. Kolosova, A.L. Tatarets., I.V. Hovor, S.V. Shishkina, L.D. Patsenker // 8th International Conference "Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles" in memoriam of Prof. Valeriy Orlov (CNCH-2018), 12–18 November 2018: abstracts – Kharkiv, 2018. – P. 102.

123. Molecular structure and spectral properties of indolenine based nonsquaraines versus squaraines / O. S. Kolosova, S. V. Shishkina, V. Marks [et al.] // *Dyes Pigm.* – 2019. – Vol. 163. – P. 318–329.

124. Terpetsching E. Synthesis, spectral properties and photostabilities of symmetrical and unsymmetrical squaraines; a new class of fluorophores with long-wavelength excitation and emission / E. Terpetschnig, H. Szmecinski, J. R. Lakowicz // *Anal. Chim. Acta.* – 1993. – Vol. 282, Is. 3. – P. 633–641.

125. Water-soluble norsquaraine dyes for protein labeling and pH-sensing applications / I. V. Hovor, O. S. Kolosova, E. V. Sanin, [et al.] // *Dyes Pigm.* – 2019. – Vol. 170. – P. 107567.

126. Левшин В. Л. Люминесценция и ее применение / В. Л. Левшин, Л. В. Левшин. – Москва : Наука, 1972. – 182 с.

127. Барлтроп Дж. Возбужденные состояния в органической химии / Дж. Барлтроп, Дж. Койль; [пер. с англ. М. В. Козьменко, Н. А. Садовского]. – Москва : Мир, 1978. – 446 с.

128. Tracing the conformational changes in BSA using FRET with environmentally-sensitive squaraine probes / I. V. Govor, A. L. Tatarets, O. M. Obukhova [et al.] // *Methods Appl. Fluoresc.* – 2016. – Vol. 4. – P. 024007.

129. Ring-substituted squaraine dyes as probes and labels for fluorescence assays / A. L. Tatarets, I. A. Fedyunyayeva, T. S. Dyubko [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* – 2006. – Vol. 570, Is. 2. – P. 214–223.

130. Comparison of squaraine and norsquaraine dyes for biomedical applications. / I. V. Hovor, O. S. Kolosova, O. M. Obukhova [et al.] // *Funct. Mater.* – 2020. – Vol. 27, Is. 4. – P. 836–845.

131. Excited States Study Reveal the Twisted Geometry Induced Large Stokes Shift in DCM Fluorescent Dye / S. H. Nabavi, M. H. Khodabandeh, M. Golbabaee [et al.] // *J. Photochem. Photobiol.* – 2018. – Vol. 354. – P. 127–138.

132. Cyanine dye dUTP analogs for enzymatic labeling of DNA probes / H. Yu, J. Chao, D. Patek [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – Vol. 22, Is. 15. – P. 3226–32.

133. Visualizing cancer and response to therapy in vivo using Cy5.5-labeled factor VIIa and anti-tissue factor antibody / S. Zhu, W. Kisiel, Y. J. Lu [et al.] // *J. Drug Target.* – 2015. – Vol. 23, Is. 3. – P. 257–265.

134. MemBright: a Family of Fluorescent Membrane Probes for Advanced Cellular Imaging and Neuroscience / M. Collot, P. Ashokkumar, H. Anton [et al.] // *Cell Chem. Biol.* – 2019. – Vol. 26, Is. 4. – P. 600–614.

135. Liposome encapsulated berberine treatment attenuates cardiac dysfunction after myocardial infarction / I. E. Allijn, B. M. S. Czarny, X. Wang [et al.] // *J. Control. Release.* – 2017. – Vol. 247. – P. 127–133.

136. Assembling programmable FRET-based photonic networks using designer DNA scaffolds / S. Buckhout-White, C. M. Spillmann, W. R. Algar [et al.] // *Nat. Commun.* – 2014. – Vol. 5. – P. 5615.

137. Hohng S. Single-Molecule Three-Color FRET *Journal of Controlled Release* / S. Hohng, C. Joo, T. Ha // *Single-molecule three-color FRET.* – *Biophys. J.* – 2004. – Vol. 87, Is. 2. – P. 1328–1337.

138. A Fluorescence Resonance Energy Transfer Sensor Based on Maltose Binding Protein / I. L. Medintz, E. R. Goldman, M. E. Lassman, J. M. Mauro // *Bioconjugate Chem.* – 2003. – Vol. 14, Is. 5. – P. 909–918.

139. Spontaneous formation of the unlocked state of the ribosome is a multistep process / J. B. Munro, Roger B. Altman, C.-S. Tung, J. H. D. Cate [et al.] // *PNAS.* – 2010. – Vol. 107, Is. 2. – P. 709–714.

140. New Fluorescence Probes for Biomolecules / K. Jurek, J. Kabatc, K. Kostrzewska [et al.] // *Molecules.* – 2015. – Vol. 20, Is. 7. – P. 13071–13079.

141. Site-selective binding and dual mode recognition of serum albumin by a squaraine dye / V. S. Jisha, K. T. Arun, M. Hariharan, D. Ramaiah // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – Vol. 128, Is. 18. – P. 6024–6025.

142. Squaraine dyes: interaction with bovine serum albumin to investigate supramolecular adducts with aggregation-induced emission (AIE) properties / N. Barbero, C. Butnarusu, S. Visentin, C. Barolo // *Chem. Asian J.* – 2019. – Vol. 14. – P. 896.

143. Site-selective Interactions: Squaraine Dye-Serum Albumin Complexes with Enhanced Fluorescence and Triplet Yields / V. S. Jisha, K. T. Arun, M. Hariharan, D. Ramaiah // *J. Phys. Chem. B.* – 2010. – Vol. 114. – P. 5912–5919.

144. Long-wavelength dyes for fluorescent detection of proteins / K. D. Volkova, V. B. Kovalska, A. L. Tatarets, L. D. Patsenker [et al.] // *Dyes Pigm.* – 2007. – Vol. 72. – P. 285–292.

145. Long-wavelength probes and labels based on cyanines and squaraines. In Springer Series on Fluorescence, V. 8: "Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology I". Vol. Ed. A. Demchenko, Ser. Ed. O.S. Wolfbeis. Springer Verlag, 2010 – 390 p.

146. Застосування стирилового та сквараїнового барвників для визначення конформаційних змін у молекулах протеїнів / І.В. Говор, І.А. Федюняєва, О. М. Обухова [та інші] // Вісник одеського національного університету, Серія: Хімія. – 2020. – Том 25. – вип. 3(75) – С. 94–103.

147. Feng R. Accuracy Molecular Weight Determination and Variation Characterization of Proteins Up To 80 ku by Ionspray Mass Spectrometry / R. Feng, Y. Konishi, A.W. Bell. // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 1991. – Vol. 2, Is. 5. – P. 387-401.

148. Steinhardt J. Differences between bovine and human serum albumins. Binding isotherms, optical rotatory dispersion, viscosity, hydrogen ion titration, and fluorescence effects / J. Steinhardt, J. Krijn, J.G. Leidy // Biochemistry. – 1971. – Vol. 10, Is. 22. – P. 4005–4015.

149. Park K. Albumin: a versatile carrier for drug delivery / K. Park // J. Control. Release. – 2012. – Vol. 157, Is. 1. – P. 3.

150. Reevaluation of ANS Binding to Human and Bovine Serum Albumins: Key Role of Equilibrium Microdialysis in Ligand – Receptor Binding Characterization / I. M. Kuznetsova, A. I. Sulatskaya, O. I. Povarova , K. K. Turoverov // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, Is. 7. – P. e40845.

151. Detergents as Probes of Hydrophobic Binding Cavities in Serum Albumin and Other Water-Soluble Proteins / U. Kragh-Hansen, F. Hellec, B. de Foresta [et al.] // Biophys. J. – 2001. – Vol. 80. – P. 2898–2911.

152. Rennke H. G. Chemical Modification of Horseradish Peroxidase / H. G. Rennke, M. A. Venkatachalam // J. Histochem. Cytochem. – 1979. – Vol. 27, Is. 10. – P. 1352–1353.

153. Veitch N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme / N.C. Veitch // *Phytochemistry*. – 2004. – Vol. 65. – P. 249–259.

154. Zhang S. Investigation of voltammetric enzyme-linked immunoassay based on a new system of HAP-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HRP / S. Zhang, J. Zou, F. Yu // *Talanta*. – 2008. – Vol. 76, Is. 1 – P. 122–127.

155. Horseradish peroxidase-functionalized Pt hollow nanospheres and multiple redox probes as trace labels for a sensitive simultaneous multianalyte electrochemical immunoassay / Z. Song, R. Yuan, Y. Chai [et al.] // *Chem. Commun.* – 2010. – Vol. 46. – P. 6750–6752.

156. Yao H. pH-Switchable Bioelectrocatalysis of Hydrogen Peroxide on Layer-by-Layer Films Assembled by Concanavalin A and Horseradish Peroxidase with Electroactive Mediator in Solution / H. Yao, N. Hu // *J. Phys. Chem. B*. – 2010. – Vol. 114. – P. 3380–3386.

157. Reagentless biosensor for hydrogen peroxide based on self-assembled films of horseradish peroxidase/laponite/chitosan and the primary investigation on the inhibitory effect by sulfide / D. Shan, Q.-B. Li, S.-N. Ding [et al.] // *Biosens. Bioelectron.* – 2010. – Vol. 26, Is. 2 – P. 536–541.

158. Korkut S. An amperometric biosensor based on multiwalled carbon nanotube-poly(pyrrole)-horseradish peroxidase nanobiocomposite film for determination of phenol derivatives / S. Korkut, B. Keskinler, E. Erhan // *Talanta*. – 2008. – Vol. 76, Is. 5 – P. 1147–1152.

159. Horseradish Peroxidase-mediated Gene Therapy: Choice of Prodrugs in Oxidic and Anoxic Tumor Conditions / O. Greco, S. Rossiter, C. Kanthou [et al.] // *Mol. Cancer Ther.* – 2001. – Vol. 1. – P. 151–160.

160. In vivo characterization of horseradish peroxidase with indole-3-acetic acid and 5-bromoindole-3-acetic acid for gene therapy of cancer / J. Tupper, M.R. Stratford, S. Hill [et al.] // *Cancer Gene Ther.* – 2010. – Vol. 17. – P. 420–428.

161. Shogren R. L. HRP-mediated synthesis of starch–polyacrylamide graft copolymers / R. L. Shogren, J. L. Willett, A. Biswas // *Carbohydr. Pol.* – 2009. – Vol. 75. – P. 189–191.

162. Biocatalytic synthesis of polypyrrole powder, colloids, and films using horseradish peroxidase / R. Cruz-Silva, E. Amaro, A. Escamilla [et al.] // *J. Colloid Interface Sci.* – 2008. – Vol. 328. – P. 263–269.

163. Characterization of Bioactive Recombinant Human Lysozyme Expressed in Milk of Cloned Transgenic Cattle / B. Yang, J. Wang, B. Tang [et al.] // *PLoS ONE.* – 2011. – Vol. 6, Is. 3. – P. 17593.

164. Inhibition of amyloid fibril formation of lysozyme by ascorbic acid and a probable mechanism of action// P. Patel, K. Parmar, Patel D [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – Vol. 144. – P. 666–678.

165. Myers J. K. Spectroscopic Characterization of Amyloid Fibril Formation by Lysozyme / J. K. Myers // *J. Chem. Educ.* – 2014. – Vol. 91, Is. 5. – P. 730–733.

166. Kovalenko S. A. Femtosecond Stokes shift in styryl dyes: Solvation or intramolecular relaxation / S. A. Kovalenko, N. P. Ernsting, J. Ruthmann // *J. Chem. Phys.* – 1997. – Vol. 106, Is. 9. – P. 3504–3511.

167. Yamaguchi H. Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies / H. Yamaguchi, M. Miyazaki // *Biomolecules.* – 2014. – Vol. 4. – P. 235–251.

168. Das A. Urea-Mediated Protein Denaturation: A Consensus View / A. Das, C. Mukhopadhyay // *J. Phys. Chem. B.* – 2009. – Vol. 113, Is. 38. – P. 12816–12824.

169. Kumaran R. Denaturation Mechanism of BSA by Urea Derivatives: Evidence for Hydrogen-Bonding Mode from Fluorescence Tools / R. Kumaran, P. Ramamurthy // *J. Fluoresc.* – 2011. – Vol. 217. – P. 1499–1508.

170. Bennion B. J. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea / B. J. Bennion, V. Daggett. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – Vol. 100, Is. 9. – P. 5142–5147.

171. Structural changes during the unfolding of Bovine serum albumin in the presence of urea: A small-angle neutron scattering study / A. Das, R. Chitra, R. R. Choudhury, M. Ramanadham // *Pramana – J. Phys.* – 2004. – Vol. 63, Is. 2. – P. 363–368.

172. How flexible polymers interact with proteins and its relationship with the protein separation method by protein–polymer complex formation / V. Boeris, B. Farruggia, D. Romanini, G. Picó // *Protein J.* – 2009. – Vol. 28, Is. 5. – P. 233–239.

173. Effect of Urea on Bovine Serum Albumin in Aqueous and Reverse Micelle Environments Investigated by Small Angle X-Ray Scattering, Fluorescence and Circular Dichroism / R. Itri, W. Caetano, L. R. S. Barbosa, M. S. Baptista // *Braz. J. Phys.* – 2004. – Vol. 34, Is.. 1. – P. 58–63.

174. Zhang T. Influences of urea and pH on the interaction of cinchonidine with bovine serum albumin by steady state fluorescence spectroscopy / T. Zhang, D. Li // *Spectrochim. Acta A.* – 2013. – Vol. 112. – P. 15–20.

175. Stumpe M. C. Aqueous urea solutions: structure, energetics, and urea aggregation / M. C. Stumpe, H. Grubmüller // *J. Phys. Chem B.* – 2007. – Vol.111, Is.22. – P.6220–6228.

176. Rise-Time of FRET-Acceptor Fluorescence Tracks Protein Folding / S. Lindhoud, A. H. Westphal, C.P.M. Van Mierlo [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – Vol. 15, Is. 12. –P. 23836-23850.

177. Negative auto-regulation increases the input dynamic-range of the arabinose system of *Escherichia coli* // D. Madar, E. Dekel, A. Bren, U. Alon // *BMC Syst. Biol.* – 2011. – Vol. 5. – P. 111.

178. Wright A. K. Hydrodynamic structure of bovine serum albumin determined by transient electric birefringence / A. K. Wright, M. R. Thompson // *Biophys. J.* – 1975. – Vol. 15. – P. 137–141.

179. Bloomfield V. The structure of bovine serum albumin at low pH / V. Bloomfield // *Biochemistry.* – 1966. – Vol. 5. – P. 684–689.

180. Feng L. Scanning tunneling microscopic images of adsorbed serum albumin on highly oriented pyrolytic graphite / L. Feng, C.Z. Hu, J. D. Andrade // *J. Colloid Interface Sci.* – 1988. – Vol.126. – P. 650–653.

181. Pietraszewska-Bogiel A. FRET microscopy: from principle to routine technology in cell biology / A. Pietraszewska-Bogiel, T. W. Gadella // *J. Microsc.* – 2011. – Vol. 241, Is. 2. – P. 111–118.



182. New method for assessing the conformational changes of proteins: Förster resonance energy transfer between the microenvironment sensitive squaraine dyes / I.V. Govor. // XIV Kharkiv young scientists conference on Radiophysics, Electronics, Photonics and Biophysics, 14–17 October 2014: abstracts – Kharkiv (Ukraine), 2014. – P. BIO-9.

183. Application of FRET between Environment-Sensitive Squaraine Dyes for Assessment of the Conformational Changes of Proteins / A.L. Tatars, I.V. Govor, O.M. Obukhova, E.A. Terpetschnig, L.D. Patsenker // The 14<sup>th</sup> International Conference on Methods and Applications in Fluorescence, 13–16 September 2015 : abstracts – Würzburg (Germany), 2015. – P. 233.

184. Влияние микроокружения на спектральные свойства красителей S485, Sq634 и Sq685 / И.В. Говор // X Всеукраїнська наукова конференція студентів та аспірантів "Хімічні Каразінські читання – 2018", 23–25 квітня 2018 р.: тези доп. – Харків, 2018. – С.158–159.

185. Применение ферстеровского резонансного переноса энергии между скварайновыми красителями для оценки конформационных изменений белков / И.В. Говор, А.Л. Татарец, Л.Д. Паценкер // V Международная конференция "Актуальные проблемы молекулярной спектроскопии конденсированных сред", 22-24 сентября 2016 г.: тезисы докл. – Самарканд (Узбекистан), 2016. – С. 51–52.

186. Environment-sensitive fluorescent probes for the intensity and FRET based tracing of the conformational changes in proteins / A. Tatars, I. Govor, I. Fedyunyayeva, E. Terpetschnig, L. Patsenker // The 15th Conference on Methods and Applications in Fluorescence, 10–13 September 2017: abstracts – Bruges (Belgium), 2017. – P. 277.

187. Фотофизические свойства красителей S485, Sq634 и Sq685 и их применение для мониторинга конформационных изменений в протеинах / И. Говор // XIII Всеукраїнська конференція молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії, 2–4 травня 2018 р: тези доп. – Харків, 2018. – С. 49.

188. Вплив конформаційних змін у молекулі альбуміну (BSA) на спектральні властивості скварайнового і диціанометилена-скварайнового

барвників / І. В. Говор, О. М. Обухова, А. Л. Татарец [та інші] // Вісник Одеського національного університету, Серія: Хімія. – 2018. – Т. 23, Вип. 3(67). – С. 67–79.

189. Extracting rate coefficients from single-molecule photon trajectories and FRET efficiency histograms for a fast-folding protein / H. S. Chung, I. V. Gopich, K. McNale [et al.] // *J. Phys. Chem. A.* – 2011. – Vol. 115, Is. 16. – P. 3642–3656.

190. Qiu Y. Single Molecule Detection of One, Two and Multiplex Proteins Involved in DNA/RNA Transaction / Y. Qiu, S. Myong // *Cel. Mol. Bioeng.* – 2011. – Vol. 4. – P. 125–137.

191. Исследование конформационных изменений белков с применением донорно-акцепторной пары флуоресцентных зондов / И.В. Говор // Тезисы 39-й ежегодной конференции молодых ученых «Холод в биологии и медицине. Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии», 20–21 мая 2015 г.: тези доп. – Харьков, 2015. – С. 191.

192. Performance of various laboratory assays in the measurement of dabigatran in patients receiving therapeutic doses: a prospective study based on peak and trough plasma levels / R. Gosselin, E. Hawes, S. Moll, D. Adcock // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2014. – Vol. 141, Is. 2. P. 262–7.

193. Albumin infusion improves renal blood flow autoregulation in patients with acute decompensation of cirrhosis and acute kidney injury / R. Garcia-Martinez, L. Noiret, S. Sen [et al.] // *Liver Int.* – 2015. – Vol. 35, Is. 2. – P. 335–43.

194. Gryadunov A. I. Methods and freezers for obtaining fresh frozen plasma / A. I. Gryadunov, A. B. Pashchenko, D. I. Nevskii // *Biomed. Eng.* – 2008. – Vol. 42. – P. 17–20.

195. Formulation and Process Development Strategies for Manufacturing Biopharmaceuticals / S. Neema, S. Singh, F. Jameel, S. Hershenson (Eds.). – New Jersey: Wiley, Hoboken, 2010. – 960 p.

196. Understanding the freezing of biopharmaceuticals: first-principle modeling of the process and evaluation of its effect on product quality / N. Radmanovic,

T. Serno, S. Joerg, O. Germershaus // *J. Pharm. Sci.* – 2013. – Vol. 102, Is. 8. – P. 2495–2507.

197. Roessler U. Protein freeze concentration and micro-segregation analysed in a temperature-controlled freeze container / U. Roessler, S. Leitgeb, B. Nidetzky // *Biotechnol. Rep.* – 2015. – Vol. 6. – P. 108–111.

198. Bhatnagar B. S. Protein Stability During Freezing: Separation of Stresses and Mechanisms of Protein Stabilization / B. S. Bhatnagar, R. H. Bogner, M. J. Pikal // *Pharm. Dev. Technol.* – 2007. – Vol. 12. – P. 505–523.

199. Effect of Freezing Rate and Dendritic Ice Formation on Concentration Profiles of Proteins Frozen in Cylindrical Vessels / M. A. Rodrigues, M. A. Miller, M. A. GLASS [et al.] // *J. PHARM. SCI.* – 2011. – Vol. 100, Is. 4. – P. 1316–29.

200. Schellekens H. Immunogenicity of therapeutic proteins: clinical implications and future prospects / H. Schellekens // *Clin. Therapeut.* – 2002. – Vol. 24, Is. 11. – P. 1720–1740.

201. Warren J. R. On the Refractive Indices of Aqueous Solutions of Urea / J. R. Warren, J. A. Gordon // *Phys. Chem.* – 1966. – Vol. 70. – P. 297–300.

202. Паркер С. Фотолюминесценция растворов / Паркер С. ; [пер. с . англ. Н. Л. Комиссаровой, Б. М. Ужинова]. — Москва : Мир, 1972. – 510 с.

203. Черкасов А. С. Исследование абсорбции и люминесценции некоторых мезоалкил- и мезоарилпроизводных антрацена / А. С. Черкасов // *Журн. физич. химии.* – 1955. – Т. 24, № 12. – С. 2209–2217.

204. Bannwarth W. Formation of carboxamides with N,N,N',N'-tetramethyl (succinimido) uronium tetrafluoroborate in aqueous / organic solvent systems // W. Bannwarth, R. Knorr // *Tetrahedron Lett.* – 1991. – Vol. 32, Is. 9. – P. 1157–1160.

205. New coupling reagents in peptide chemistry / R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth [et al.] // *Tetrahedron Lett.* – 1989. – Vol. 30, Is. 15. – P. 1927–1930.

206. Lin Y. Novel Near-infrared cyanine fluorochromes: synthesis, properties, and bioconjugation / Y. Lin, R. Weissleder, Ch.-H. Tung // *Bioconjugate Chem.* – 2002. – Vol.13, Is. 3. – P. 605–610.

207. Peters J. T. All about albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications / J. T. Peters. – New York: Academic Press, 1995. – 432 p.

208. Свердлова О. В. Электронные спектры в органической химии, 2-е изд., перераб. / О. В. Свердлова. – Ленинград: Химия, 1985. – 248 с.

209. Дерффель К. Статистика в аналитической химии / Дерффель К. : пер. с нем. Л. Н. Петровой. – Москва : Мир, 1994. – 268 с.

## ДОДАТОК А

### СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

*Публікації у періодичних наукових виданнях інших держав, які входять до міжнародних наукометричних баз:*

1. Tracing the conformational changes in BSA using FRET with environmentally-sensitive squaraine probes / **Iryna V. Govor**, Anatoliy L. Tatarets, Olena M. Obukhova, Ewald A. Terpetschnig, Gary Gellerman, Leonid D. Patsenker // Methods Appl. Fluoresc. – 2016. – Vol. 4, Is. 2. – Art. num. 024007. (Scopus, Web of Science). *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, прийнято участь у написанні тексту статті та обговоренні результатів.*

2. Molecular structure and spectral properties of indolenine based norsquaraines versus squaraines / Olga S. Kolosova, Svitlana V. Shishkina, Vered Marks, Gary Gellerman, **Iryna V. Govor**, Anatoliy L. Tatarets, Ewald A. Terpetschnig, Leonid D. Patsenker // Dyes and Pigments. – 2019. – Vol. 163. – P. 318-329. (Scopus, Web of Science). *Здобувачкою виконано спектральні та фотофізичні дослідження барвників, прийнято участь у підготовці статті до друку.*

3. Water-soluble norsquaraine dyes for protein labeling and pH-sensing applications / **Iryna V. Govor**, Olga S. Kolosova, Edward V. Sanin, Olena M. Obukhova, Anatoliy L. Tatarets, Ewald A. Terpetschnig, Leonid D. Patsenker // Dyes and Pigments. – 2019. – Vol. 170. – Art. num. 107567. (Scopus, Web of Science). *Здобувачкою виконано спектральні та фотофізичні дослідження барвників, прийнято участь у підготовці статті до друку.*

*Публікації у періодичних наукових фахових виданнях України:*

4. Вплив конформаційних змін у молекулі альбуміну (BSA) на спектральні властивості сквараїнового и диціанометилена-сквараїнового барвників / **І. В. Говор**, О. М. Обухова, А. Л. Татарец, О. С. Колосова, Л. Д. Паценкер // Вісник Одеського національного університету, Серія: Хімія. –

2018. – Т. 23, Вип. 3(67). – С. 67-79. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, підготовлено статтю до друку.*

5. Застосування стирилового та скварайнового барвників для визначення конформаційних змін у молекулах протеїнів / **І. В. Говор**, І. А. Федюняєва, О. М. Обухова, А. Л. Татарець, О. С. Колосова // Вісник Одеського національного університету, Серія: Хімія. – 2020. – Т. 25, Вип. 3(75). – С. 94-103. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, підготовлено статтю до друку.*

6. Comparison of squaraine and nonsquaraine dyes for biomedical applications / **I. V. Govor**, O. S. Kolosova, O. M. Obukhova, A. L. Tatarets, L. D. Patsenker // Functional materials. – 2020. – Vol. 27, Is. 4. – P. 836-845. (Scopus, Web of Science) *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, підготовлено статтю до друку.*

### ***Наукові праці апробаційного характеру***

#### ***(тези доповідей на наукових конференціях) за темою дисертації:***

7. Govor I. V. New method for assessing the conformational changes of proteins: Förster resonance energy transfer between the microenvironment sensitive squaraine dyes / **I. V. Govor** // XIV Kharkiv young scientists conference on Radiophysics, Electronics, Photonics and Biophysics, 14-17 October 2014 : abstracts – Kharkiv (Ukraine), 2014. – P. ВІО-9. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, написано текст тез, підготовлено усну доповідь.*

8. Говор И. В. Исследование конформационных изменений белков с применением донорно-акцепторной пары флуоресцентных зондов / **И. В. Говор** // «Холод в биологии и медицине. Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии» : 39-я Ежегодная конференция молодых ученых, 20-21 мая 2015 г. : тезисы доп. – Харьков, 2015. – С. 191. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, написано текст тез, підготовлено усну доповідь.*

9. Application of FRET between Environment-Sensitive Squaraine Dyes for Assessment of the Conformational Changes of Proteins / A. L. Tatarets, **I. V. Govor**, O. M. Obukhova, E. A. Terpetschnig, L. D. Patsenker // The 14<sup>th</sup> International Conference on Methods and Applications in Fluorescence, 13-16 September 2015 : abstracts – Würzburg (Germany), 2015. – P. 233. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, підготовлено стендову доповідь.*

10. Говор И. В. Применение ферстеровского резонансного переноса энергии между сквараиновыми красителями для оценки конформационных изменений белков / **И. В. Говор**, А. Л. Татарец, Л. Д. Паценкер // "Актуальные проблемы молекулярной спектроскопии конденсированных сред" : V Международная конференция, 22-24 сентября 2016 г. : тезисы докл. – Самарканд (Узбекистан), 2016. – С. 51-52. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, написано текст тез.*

11. Environment-sensitive fluorescent probes for the intensity and FRET based tracing of the conformational changes in proteins / A. Tatarets, **I. Hovor**, I. Fedyunyayeva, E. Terpetschnig, L. Patsenker // The 15<sup>th</sup> Conference on Methods and Applications in Fluorescence, 10-13 September 2017 : abstracts – Bruges (Belgium), 2017. – P. 277. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, підготовлено стендову доповідь.*

12. Говор И. В. Влияние микроокружения на спектральные свойства красителей S485, Sq634 и Sq685 / **И. В. Говор** // "Хімічні Каразінські читання – 2018" : X Всеукраїнська наукова конференція студентів та аспірантів, 23-25 квітня 2018 р. : тези доп. – Харків, 2018. – С. 158-159. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, написано текст тез, підготовлено усну доповідь.*

13. Говор И. Фотофизические свойства красителей S485, Sq634 и Sq685 и их применение для мониторинга конформационных изменений в протеинах / **И. Говор** // XIII Всеукраїнська конференція молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії, 2–4 травня 2018 р. : тези доп. – Харків, 2018. – С. 49.

*Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, написано текст тез, підготовлено усну доповідь.*

14. Synthesis, molecular structure and spectral properties of indolenine based norsquaraines versus squaraines / O. S. Kolosova, A. L. Tatars, **I. V. Hovor**, S. V. Shishkina, L. D. Patsenker // "Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles" : 8<sup>th</sup> International Conference in memoriam of Prof. Valeriy Orlov (CNCH-2018), 12-16 November 2018 : abstracts – Kharkiv, 2018. – P. 102. *Здобувачкою виконано спектральні та фотофізичні дослідження барвників.*