

ИЗУЧЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ J-АГРЕГАТОВ АНИОННОГО ОКСАКАРБОЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С БЕЛКАМИ И ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТАМИ

П. Г. Пронкин*, А. С. Татиколов

УДК 535.34:547.97:547.96

Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской АН,
119334, Россия, Москва, ул. Косыгина, 4; e-mail: pronkinp@gmail.com

(Поступила 11 октября 2016)

Исследована J-агрегация анионного оксакарбоцианинового красителя 3,3'-ди-(γ-сульфопропил)-5,5'-дифенил-9-этилоксакарбоцианинбетаина в водных растворах в присутствии белков (коллагенов, иммуноглобулина G, сывороточных альбуминов) и полиэлектролитов (полиэтиленimina, поливинилпирролидона). Обнаружено, что денатурация сывороточного альбумина человека мочевиной стимулирует J-агрегацию красителя. В присутствии денатурированного альбумина и полиэтиленimina краситель образует J-агрегаты двух типов. Образующиеся в присутствии полиэтиленimina J-агрегаты претерпевают перестройку во времени.

Ключевые слова: оксакарбоцианиновые красители, сывороточный альбумин человека, коллаген, иммуноглобулин G, поливинилпирролидон, полиэтиленимин, J-агрегаты, спектрально-флуоресцентные свойства, денатурация белка.

J-aggregation of the anionic oxacarbocyanine dye 3,3'-di-(γ-sulfopropyl)-5,5'-diphenyl-9-ethyl-oxacarbocyanine betaine is studied in aqueous solutions in the presence of proteins (collagens, immunoglobulin G, serum albumins) and polyelectrolytes (polyethylenimine, polyvinylpyrrolidone). It has been found that the denaturation of human serum albumin by urea stimulates J-aggregation of the dye. In the presence of denatured albumin and polyethylenimine, the dye forms J-aggregates of two types. The J-aggregates formed in the presence of polyethylenimine undergo rearrangement with time.

Keywords: oxacarbocyanine dyes, human serum albumin, collagen, immunoglobulin G, polyvinylpyrrolidone, polyethylenimine, J-aggregates, spectral-fluorescent properties, protein denaturation.

Введение. Полиметиновые (цианиновые) красители вызывают интерес благодаря перспективам их использования в качестве спектрально-флуоресцентных зондов [1, 2]. Они имеют высокие коэффициенты экстинкции ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ в области 400—1200 нм), низкие квантовые выходы флуоресценции и интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние [3, 4]. В растворах для мезо-замещенных полиметиновых красителей обнаружено подвижное равновесие между *транс*- и *цис*-изомерными формами [3, 5, 6]. Поскольку фотофизические и фотохимические свойства полиметиновых красителей значительно изменяются при взаимодействии с биополимерами, они успешно применяются в качестве молекулярных зондов, чувствительных к нуклеиновым кислотам и альбуминам [1, 2, 7, 8]. Полиметиновые красители также обладают интересной особенностью образовывать в растворах и микрогетерогенных системах агрегаты различного типа (в частности, димеры, H- и J-агрегаты) [9—11]. Тип и строение агрегатов полиметиновых красителей зависят как от особенностей их молекулярной структуры, так и от молекулярного окружения. Большой интерес представляют J-агрегаты, имеющие упорядоченную структуру и уникальные свойства [12, 13]. В спектрах поглощения J-агрегаты имеют характерные интенсивные и узкие полосы, максимумы которых сдвинуты в длинноволновую область

THE STUDY OF THE FORMATION OF J-AGGREGATES OF THE ANIONIC OXACARBOCYANINE DYE UPON INTERACTION WITH PROTEINS AND POLYELECTROLYTES

P. G. Pronkin*, A. S. Tatikolov (N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics., Russian Academy of Sciences, 4 Kosygin Str., Moscow, 119334, Russia; e-mail: pronkinp@gmail.com)

по сравнению со спектрами мономерных молекул полиметиновых красителей (*M*-полоса). Эта отличительная особенность J-агрегатов является следствием экситонного взаимодействия дипольных моментов молекул красителя (делокализация экситонов). Спектрально-флуоресцентные характеристики J-агрегатов красителя зависят от числа молекул мономеров в J-агрегате [13]. Образование J-агрегатов зависит от концентрации красителей и может усиливаться в присутствии неорганических электролитов [14, 15], полимеров [16] и полиэлектролитов [17—19]. Поверхностно-активные вещества (ПАВ) и биомакромолекулы (ДНК, белки) стимулируют процесс агрегации [13, 20—23].

Ранее анионный оксакарбоцианиновый краситель 3,3'-ди-(γ -сульфопропил)-5,5'-дифенил-9-этил-оксакарбоцианинбетаин (ОКЦ) был предложен в качестве спектрально-флуоресцентного зонда для определения сывороточных альбуминов человека и быка (САЧ и БСА) *in vitro* [24, 25]. Краситель ОКЦ способен образовывать J-агрегаты в растворах при концентрации $\sim 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л, агрегация усиливается в присутствии солей, содержащих одновалентные катионы металлов [14, 26]. В настоящей работе спектрально-флуоресцентными методами исследовано образование J-агрегатов этого красителя в присутствии макромолекул различных белков и синтетических полиэлектролитов, что может найти дальнейшее применение при использовании его в качестве зонда *in vitro*. Объектами исследования являются белки, которые составляют основу живых тканей и внутренних сред организмов и относятся к различным типам (выбраны фибриллярные и глобулярные белки). Полиэлектролиты — структурообразующие компоненты исследуемых систем — позволяют значительно улучшить их агрегационные характеристики [17—19].

Эксперимент. Использован краситель ОКЦ, предоставленный проф. Б. И. Шапиро (НИИ “Хим-фотопроект”). Измерения спектров поглощения красителей проводились на спектрофотометрах СФ-2000 (Россия) и Shimadzu UV-3101PC (Япония), флуоресцентные измерения — на спектрофлуориметре “Флюорат-02-Панорама” (Россия) в стандартных 1-см кварцевых кюветах. Спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции корректировались на спектральную характеристику канала возбуждения и на поглощение раствора. При изучении влияния полимерных добавок на спектры ОКЦ в водные растворы красителя в измерительной кювете вводились микроколичества концентрированных растворов полимеров. После перемешивания спектры поглощения и флуоресценции растворов регистрировались несколько раз до прекращения их изменения во времени. Эксперименты проводились при комнатной температуре.

В экспериментах использовались слабокислые водные растворы коллагенов, выделенных из сухожилий хвостов крыс (преимущественно коллаген I типа) и из кожи телят (главным образом коллаген III типа) по методикам [27, 28]. Содержание коллагена I типа ~ 2.5 г/л, коллагена III типа ~ 2 г/л. После приготовления растворы коллагенов хранились в холодильнике при 4 °С. САЧ, иммуноглобулин G (ИГ), поливинилпирролидон $M_w = 25000$ г/моль (ПВП), полиэтиленимин $M_w = 25000$ г/моль (ПЭИ) — коммерческие (Sigma-Aldrich, США). Растворителем служила дистиллированная вода, для создания pH 3.5 раствор подкисляли соляной кислотой (5 ммоль/л). Для денатурации белка использовалась кристаллическая мочевины (х.ч., “Химмед”, Россия).

Сравнительная оценка степени взаимодействия мономерных молекул красителя и САЧ при денатурации выполнялась в терминах эффективной концентрации белка ($c_{эфф}$, %), равной отношению интенсивностей флуоресценции комплекса краситель—САЧ в исследуемом образце и в контрольном растворе белка. Квантовые выходы флуоресценции ОКЦ определялись методом сравнения со стандартом, в качестве которого использован флуоресцеин в водном растворе NaOH ($\phi_{фл} = 0.85$) [29].

Число молекул красителя в агрегате, испытывающих взаимное спектральное возмущение (“когерентная длина” n), определялось из данных спектров поглощения. Число n может быть найдено из зависимости $\lg(c_0 - A/\epsilon_M l)$ от $\lg(A/\epsilon_M l)$ согласно выражению [30, 31]:

$$nM \rightleftharpoons M_n,$$

$$\lg(c_0 - A/\epsilon_M l) = \lg n K_n + n \lg(A/\epsilon_M l), \quad (1)$$

где A и ϵ_M — оптическая плотность и молярный коэффициент поглощения мономера красителя (л/(моль · см)); c_0 и $A/\epsilon_M l$ — исходная и наблюдаемая концентрации мономера красителя (моль/л); l — толщина поглощающего слоя (см); K_n — константа равновесия реакции ассоциации:

$$K_n = c_j / c_M^n. \quad (2)$$

Число n можно найти из соотношения ширин полос мономера и J-агрегатов в спектрах поглощения красителя [32, 33]:

$$\Delta\nu_{1/2}^M/\Delta\nu_{1/2}^J = \sqrt{n}, \quad (3)$$

где $\Delta\nu_{1/2}^M$ и $\Delta\nu_{1/2}^J$ — ширины полос поглощения мономерного красителя и J-агрегата, измеренные на полувысоте (см^{-1}).

Наблюдаемые константы комплексообразования мономерной формы ОКЦ с белками и электролитами (K_a , л/моль) и константы равновесия реакции J-агрегации (K_d , см. (2)) определялись по спектрам поглощения и флуоресценции исходя из уравнений молекулярного взаимодействия. При обработке спектральных данных ОКЦ с целью оценки кооперативности взаимодействия при образовании J-агрегатов использовано уравнение Хилла [34]:

$$\lg\theta = m\lg[Q] - m\lg K_d, \quad (4)$$

где $\theta = (I_0 - I)/I$ — доля сайтов связывания белка, занятых лигандом, определенная по интенсивности флуоресценции; $[Q]$ — концентрация несвязанного лиганда (тушителя); K_d — эффективная константа диссоциации комплекса (моль/л); m — коэффициент Хилла, характеризующий кооперативность связывания ($m > 0$ — кооперативное связывание, $m < 0$ — антикооперативное) [34, 35].

Результаты и их обсуждение. В водных растворах ОКЦ способен образовывать флуоресцирующие Н-димеры с $\lambda_{\text{полгл}} = 478$ нм и J-агрегаты ($\lambda_{\text{полгл}} = 554$ нм); отнесение полосы к J-агрегатам сделано на основе [14, 26, 36]. Основная полоса поглощения красителя (М-полоса) имеет $\lambda_{\text{полгл}} = 502$ нм. Процессы димеризации и J-агрегации конкурируют. Установлено, что образование димеров и J-агрегатов ОКЦ происходит параллельно, т. е. J-агрегаты образуются из мономерных молекул [26].

J-Агрегация ОКЦ при взаимодействии с САЧ и БСА не обнаружена, однако она значительно усиливается в присутствии 0.005 мас.% желатины и $8.0 \cdot 10^{-7}$ моль/л рибонуклеазы (рН 6) [26]. Стимулирование образования J-агрегатов обнаружено в присутствии коллагенов [37]. При введении небольших ($(5-6) \cdot 10^{-8}$ моль/л) количеств коллагенов в водный раствор ОКЦ сразу после смешения растворов происходит быстрое падение интенсивности полосы поглощения мономера красителя (М-полосы) и появляется полоса J-агрегатов (спектры не приведены). J-Агрегаты, образующиеся в присутствии коллагенов, имеют более коротковолновую полосу поглощения ($\lambda_{\text{полгл}} = 540$ нм), чем агрегаты, которые краситель образует в растворе в отсутствие добавок ($\lambda_{\text{полгл}} = 554$ нм). Число мономеров (n) красителя в J-агрегате на коллагене приведено в табл. 1. Отрицательное изменение свободной энергии (ΔG) указывает на спонтанный характер процесса J-агрегации.

Присутствие ИГ в растворе также приводит к J-агрегации красителя. Спектры поглощения и флуоресценции ОКЦ в присутствии ИГ изучены при различных концентрациях биополимера ($0-4.2 \cdot 10^{-6}$ моль/л). При $c_{\text{ИГ}} < 1.0 \cdot 10^{-6}$ моль/л спектр поглощения мономерного ОКЦ уширяется, коэффициент экстинкции падает (рис. 1, а, кривая 1). Падение интенсивности М-полосы в спектре поглощения, вероятно, обусловлено образованием неупорядоченных агрегатов красителей, обладающих низким коэффициентом экстинкции [7, 37]. Увеличение концентрации ИГ сопровождается дальнейшим спадом М-полосы и приводит к появлению в спектрах поглощения полосы J-агрегатов ОКЦ ($\lambda_{\text{полгл}} = 540$ нм). При $c_{\text{ИГ}} = 2.17 \cdot 10^{-6}$ моль/л максимум спектра поглощения мономера незначительно bathochrome сдвигается (кривая 4; $\lambda_{\text{полгл}} = 505$ нм).

В присутствии ИГ в спектрах флуоресценции ОКЦ наблюдается полоса испускания J-агрегатов (рис. 1, б, кривые 3, 4; $\lambda_{\text{фл}} = 544$ нм). В спектрах возбуждения флуоресценции, зарегистрированных в присутствии ИГ ($c_{\text{ИГ}} = (1.1-2.17) \cdot 10^{-6}$ моль/л), положения максимумов М-полосы и J-агрегатов составляют 504 и 540 нм, что соответствует спектрам поглощения красителя (кривые 5, 6). Значения n и $\ln K_d$ приведены в табл. 1. Обработка данных по уравнению Хилла (4) показывает положительную кооперативность J-агрегации ($m > 0$).

Мономерные молекулы красителя ОКЦ слабо взаимодействуют с коллагенами и ИГ, поскольку флуоресценция мономера красителя падает при увеличении концентрации биополимера. Присутствие этих макромолекул в водных растворах ОКЦ стимулирует его J-агрегацию. J-Агрегаты ОКЦ, образующиеся на матрице биополимера, имеют более коротковолновую полосу поглощения ($\lambda_{\text{полгл}} = 540$ нм), чем агрегаты, которые краситель образует в растворе в отсутствие добавок.

Взаимодействие ОКЦ с САЧ и БСА не стимулирует J-агрегацию, но приводит к распаду имеющихся J-агрегатов. Возможно, это связано со специфическим строением центра связывания красителя ОКЦ в молекулах альбуминов (субдомен IIIA [24, 25]), создающим стерические и, вероятно, энергетические препятствия формированию протяженных частиц J-агрегатов.

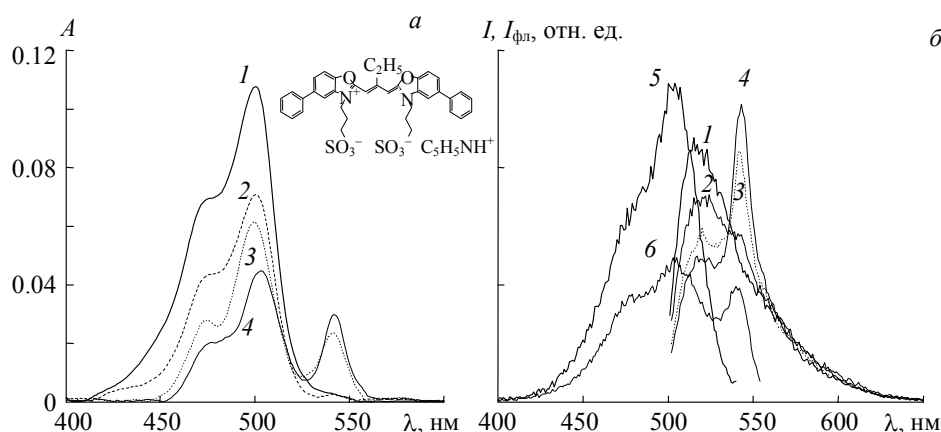


Рис. 1. Спектры красителя ОКЦ ($c_{\text{ОКЦ}} = 1.1 \cdot 10^{-6}$ моль/л) в присутствии ИГ ($c_{\text{ИГ}} = 0$ (1, 5), $7.41 \cdot 10^{-7}$ (2), $1.01 \cdot 10^{-6}$ (3) и $2.17 \cdot 10^{-6}$ моль/л (4, 6)): а — поглощения, б — флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 490$ нм) (1—4) и возбуждения флуоресценции ($\lambda_{\text{рег}} = 530$ нм) (5, 6); на вставке — структурная формула ОКЦ

При денатурации САЧ под действием мочевины обнаружено сильное влияние структурной перестройки макромолекулы САЧ на образование J-агрегатов и на спектрально-флуоресцентные свойства ОКЦ в составе комплексов ОКЦ-САЧ. Денатурация комплекса ОКЦ-САЧ сопровождается появлением в спектрах поглощения полос J-агрегатов двух различных типов. При низких концентрациях мочевины (0.37—2.53 моль/л) краситель образует J^1 -агрегаты, для них характерен длинноволновый максимум поглощения $\lambda_{\text{полгл}} = 576$ нм (рис. 2, а, кривые 2—4), при этом M-полоса в спектрах поглощения ОКЦ сдвигается в коротковолновую область ($\lambda_{\text{полгл}} = 511$ и 504 нм при 0 и 2.53 моль/л мочевины). Интенсивность M-полосы поглощения немонотонно меняется: при 0.37 моль/л мочевины наблюдается небольшой рост ~10 %, при 2.53 моль/л падение на 10 % от исходной (кривые 2, 4). Число мономеров ОКЦ в J^1 -агрегате приведено в табл. 1. Увеличение концентрации мочевины с 3.8 до 7.2 моль/л приводит к нарастанию в спектрах второй (коротковолновой) полосы J-агрегатов с $\lambda_{\text{полгл}} = 545$ нм (агрегаты типа J^2 ; кривые 5, 6). В случае образования J-агрегатов при денатурации САЧ мочевиной равновесие устанавливается довольно быстро (~10 мин). Наблюдаемая спектральная картина устойчива во времени, повторная регистрация не выявляет изменений в спектрах поглощения J-агрегатов. Среднее число мономеров ОКЦ в агрегате типа J^2 , определенное по выражению (3), составляет ~5. Отметим, что в отсутствие альбумина добавление мочевины не приводит к усилению образования J-агрегатов ОКЦ в растворе.

Т а б л и ц а 1. Максимумы спектров поглощения J-агрегатов ОКЦ (λ_{abs} , нм), когерентные длины J-агрегатов $n(J^1)$ и $n(J^2)$, полученные с помощью (1) и (3), эффективные константы равновесия реакции J-агрегации $\ln(K_n)$, полученные по (1) и (2) и уравнению Хилла (4), изменения свободной энергии Гиббса (ΔG , кДж/моль)

Белок/полиэлектrolит	$\lambda_{\text{полгл}}$, нм	$n(J^1), n(J^2)$		$\ln K_n$	ΔG , кДж/моль
		по (1)	по (3)		
Коллаген *	540	—	13	13.4	-32.8
Иммуноглобулин G *	540	7	9	14.0	-34.4
САЧ мочевины	576/545	6/—	3/5	—	—
Полиэтиленимин	554/535	—	8/6	8.95/8.32	-22/-20.4
Полиэтиленимин (рН 3.5)	554	—	11	9.98	-24.5
Поливинилпирролидон *	550	~3	—	5.3	-13.0

* Независимо от рН наблюдались агрегаты одного типа.

В присутствии мочевины интенсивность флуоресценции мономерного красителя ОКЦ падает существенно (рис. 2, б, кривые 1—5), что связано с распадом комплекса мономера красителя: при концентрации мочевины 2.5 моль/л $c_{\text{эфф}} = 38\%$, ~60 % комплекса мономерного красителя претерпевает распад и перестройку, а при содержании мочевины 5.4 моль/л $c_{\text{эфф}} = 14.6\%$ (~85 % комплекса распадается). Максимумы спектров флуоресценции красителя сдвигаются в коротковолновую область на 6 нм, при высоких (<3.8 моль/л) концентрациях мочевины спектры флуоресценции неоднородно уширяются, в области 550 нм появляется дополнительный низкоинтенсивный вклад второго компонента (J^2 -агрегаты, кривая 5). В спектрах возбуждения флуоресценции ОКЦ ($\lambda_{\text{рег}} = 570$ нм), зарегистрированных в этой области концентраций мочевины, наблюдаются полосы с $\lambda_{\text{max}} = 512$ и 542 нм, соответствующие M -красителю и его коротковолновым J^2 -агрегатам (кривая 8). Таким образом, флуоресценция J^1 -агрегатов не обнаружена.

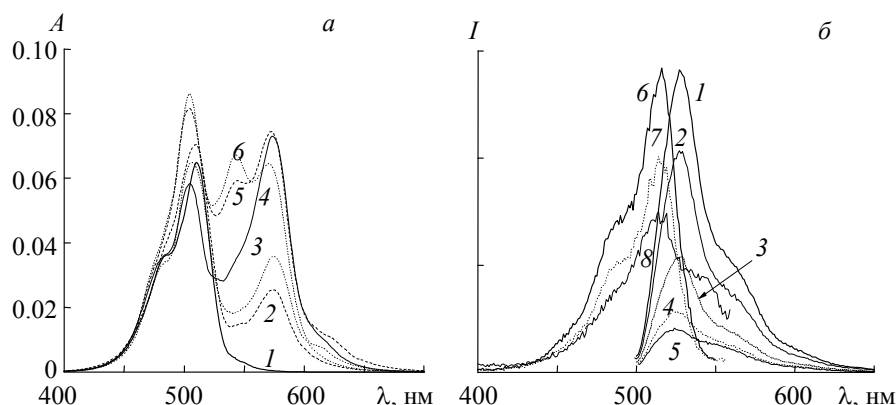


Рис. 2. Спектры красителя ОКЦ ($c_{\text{ОКЦ}} = 9.0 \cdot 10^{-7}$ моль/л), $c_{\text{САЧ}} = 1.2 \cdot 10^{-5}$ моль/л, в присутствии мочевины: а — поглощения, $c_{\text{мочевины}} = 0$ (1), 0.37 (2), 1.11 (3), 2.53 (4), 3.87 (5) и 5.39 моль/л (6); б — флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 490$ нм) (1—5) и возбуждения флуоресценции, $\lambda_{\text{рег}} = 590$ (6), 580 (7), 570 нм (8), $c_{\text{мочевины}} = 0$ (1, 6), 1.11 (2, 7), 2.53 (3), 3.87 (4, 8) и 5.39 моль/л (5)

В случае денатурации комплекса ОКЦ-БСА мочевиной, напротив, не наблюдается стимулирования образования J -агрегатов красителя [25].

Известно, что процесс денатурации альбуминов многостадийный. В случае САЧ в первую очередь денатурации подвергается домен I белка [38, 39]. При содержании мочевины 3 моль/л 65—75 % САЧ в образце денатурировано по домену I [39]. В этой области концентраций мочевины краситель образует длинноволновые J -агрегаты (тип J^1). Домен II молекулы САЧ более устойчив: при концентрации мочевины 3 моль/л ~8 % молекул САЧ денатурированы по домену II, при 6 моль/л уже ~65 % [39]. При высоких концентрациях мочевины в спектрах нарастает вторая (коротковолновая) полоса J^1 -агрегатов.

Обнаружено, что краситель ОКЦ образует J -агрегаты в присутствии синтетических полиэлектролитов ПВП и ПЭИ. В спектрах поглощения при увеличении концентрации ПЭИ (максимальная концентрация 23 мг/мл, или $9.2 \cdot 10^{-4}$ моль/л) интенсивность M -полосы ОКЦ падает на 67 %, ее форма искажается, в спектрах (рис. 3, а, кривые 1—4) наблюдаются полосы J -агрегатов ОКЦ двух различных типов: длинноволновые J^1 с $\lambda_{\text{max}} = 554$ нм и коротковолновые J^2 с $\lambda_{\text{max}} = 535$ —540 нм (n приведены в табл. 1). При $c_{\text{ПЭИ}} = (4.25$ — $16) \cdot 10^{-4}$ моль/л (1.1—4.15 мг/мл) краситель образует в основном коротковолновые J^2 -агрегаты, к которым примешивается поглощение длинноволновых J^1 -агрегатов (рис. 3, а, кривые 2, 3; спектры записаны через 2 мин после введения ПЭИ в кювету). Агрегаты J^1 и J^2 находятся в равновесии, с течением времени наблюдается увеличение интенсивности полосы поглощения J^1 (рис. 3, б, кривые 1—8), сопровождающееся падением интенсивности полосы J^2 и сдвигом ее максимума в длинноволновую область ($\Delta\lambda = 5$ нм). Отметим, что увеличение концентрации ПЭИ приводит к заметному ускорению перестройки агрегатов красителя. Так, при $c_{\text{ПЭИ}} = 6.28 \cdot 10^{-4}$ моль/л в спектрах, зарегистрированных через 2 мин после введения ПЭИ, практически отсутствует полоса J^2 -агрегатов (рис. 3, а, кривая 5).

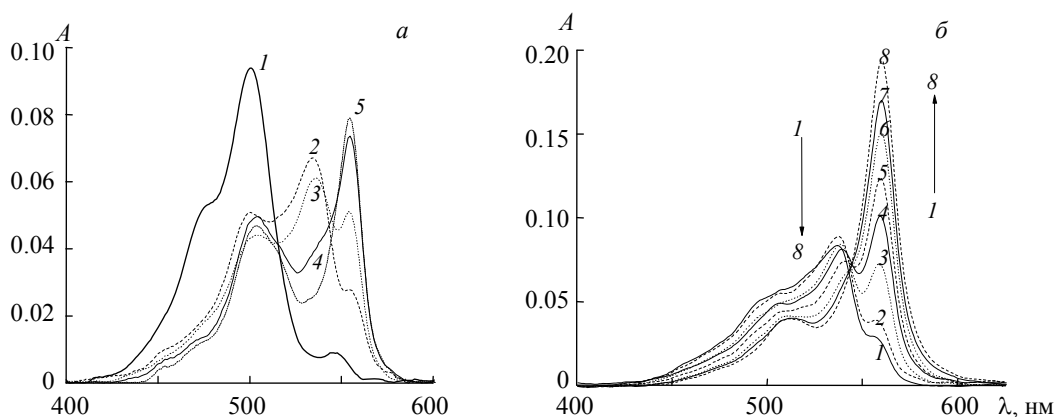


Рис. 3. Спектры поглощения красителя ОКЦ: *а* — $c_{\text{ОКЦ}} = 9.8 \cdot 10^{-7}$ моль/л, $c_{\text{ПЭИ}} = 0$ (1), $8.3 \cdot 10^{-5}$ (2), $1.65 \cdot 10^{-4}$ (3), $3.25 \cdot 10^{-4}$ (4), $6.25 \cdot 10^{-4}$ моль/л (5), зарегистрированные через 2 мин после введения ПЭИ в кювету; *б* — $c_{\text{ОКЦ}} = 1.15 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $c_{\text{ПЭИ}} = 9.0 \cdot 10^{-5}$ моль/л, зарегистрированные через 3 (1), 6 (2), 10 (3), 15 (4), 19 (5), 23 (6), 27 (7) и 33 мин (8)

По данным спектров поглощения получены кинетические зависимости для перестройки J-агрегатов ОКЦ в присутствии ПЭИ. Зависимость поглощения длинноволновых J¹-агрегатов от времени имеет характер, близкий к сигмовидной кривой с $t_{1/2} = 950$ с, с более низкой скоростью в начале (данные не приведены). Для количественного описания наблюдаемого эффекта определена скорость перестройки J-агрегатов: на начальном участке $dA_J/dt \sim 1.04 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, максимальная скорость на среднем участке $(dA_J/dt)_{\text{max}} = 1.61 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$.

В спектрах флуоресценции красителя ОКЦ в присутствии ПЭИ (рН нейтральный) наряду с полосами мономерного ОКЦ ($\lambda_{\text{фл}} = 525$ нм) наблюдается флуоресценция J-агрегатов обоих типов. При $c_{\text{ПЭИ}} = 8.39 \cdot 10^{-5}$ моль/л (2.1 мг/мл) присутствует полоса флуоресценции коротковолновых J-агрегатов $\lambda_{\text{фл}} = 540$ нм (тип J², рис. 4, кривая 2; спектры записаны через 2 мин после введения ПЭИ в кювету). Квантовый выход флуоресценции J-агрегатов типа J² не превышает 7 %. При увеличении содержания полимера до $c_{\text{ПЭИ}} = 6.28 \cdot 10^{-5}$ моль/л (15.7 мг/мл) флуоресценция коротковолновых J²-агрегатов уменьшается, а длинноволновых (тип J¹, $\lambda_{\text{фл}} = 557$ нм) нарастает (кривые 3, 4), что является следствием их перестройки. Квантовый выход флуоресценции J¹-агрегатов ОКЦ оказался ~2—3 %, что сравнимо с квантовым выходом флуоресценции мономерного ОКЦ в водном растворе. В спектрах возбуждения флуоресценции ($\lambda_{\text{рег}} = 570$ нм) J-агрегатам ОКЦ соответствуют полосы с $\lambda_{\text{max}} = 535$ и 556 нм

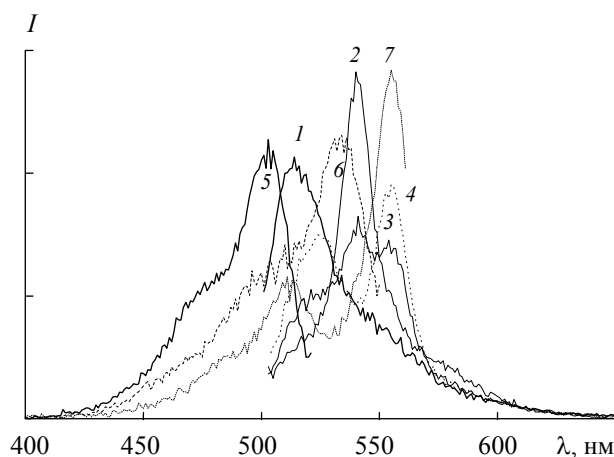


Рис. 4. Спектры флуоресценции $\lambda_{\text{возб}} = 495$ нм (1—4) и возбуждения флуоресценции $\lambda_{\text{рег}} = 530$ (5), 560 (6), 570 нм (7) красителя ОКЦ ($c_{\text{ОКЦ}} = 9.8 \cdot 10^{-7}$ моль/л) при $c_{\text{ПЭИ}} = 0$ (1, 5), $8.3 \cdot 10^{-5}$ (2, 6), $3.25 \cdot 10^{-4}$ (3) и $6.25 \cdot 10^{-4}$ моль/л (4, 7)

(кривые 6, 7). В присутствии ПЭИ *M*-полоса ОКЦ в спектрах возбуждения флуоресценции сдвинута в длинноволновую область по сравнению с исходным спектром красителя в воде (кривые 5—7; $\lambda_{\max} = 513$ и ~ 503 нм).

В растворе ПЭИ с pH 3.5 ОКЦ образует только длинноволновые J^1 -агрегаты ($\lambda_{\max} = 554$ нм; спектры не приведены). Полоса поглощения мономерного красителя ОКЦ сдвигается в длинноволновую область ($\lambda_{\max} = 510$ нм). Количество мономеров ОКЦ в J -агрегате ~ 11 , значения K_n выше, чем для взаимодействия ОКЦ с ПЭИ с нейтральным pH (табл. 1). Взаимодействие ОКЦ с ПЭИ приводит к почти двукратному увеличению интенсивности флуоресценции *M*-формы красителя, сопровождающемуся длинноволновым сдвигом максимумов полос в спектрах флуоресценции ($\Delta\lambda = 13$ нм при $c_{\text{ПЭИ}} = 9.2 \cdot 10^{-4}$ моль/л, или 23 мг/мл), что можно объяснить связыванием мономера красителя с полимером. Константа равновесия комплексообразования *M*-формы ОКЦ с ПЭИ $K_a \sim 2.4 \cdot 10^4$ л/моль. В присутствии ПЭИ (pH 3.5) наблюдается флуоресценция J -агрегатов ($\lambda_{\text{фл}} = 558$ нм), в спектрах возбуждения флуоресценции ($\lambda_{\text{рег}} = 575$ нм) J -агрегатам соответствует $\lambda_{\max} = 554$ нм (соответствует спектру поглощения).

ПВП слабо стимулирует J -агрегацию красителя при нейтральных и кислых pH (табл. 1). В водном растворе (pH нейтральный) при увеличении концентрации ПВП (максимальная концентрация полимера 0.015 мг/мл, или $6 \cdot 10^{-7}$ моль/л) максимум *M*-полосы претерпевает небольшой сдвиг в длинноволновую область ($\lambda_{\max} = 508$ нм), наблюдается слабый рост интенсивности полосы J -агрегатов ОКЦ ($\lambda_{\max} = 550$ нм). В спектрах флуоресценции в присутствии ПВП не наблюдается флуоресценция J -агрегатов красителя.

Образование двух различных типов J -агрегатов ранее наблюдалось для тиа- и оксакарбоцианиновых красителей (в частности, для более гидрофобного аналога ОКЦ 3,3'-ди-(γ -сульфобутил)-5,5'-дифенил-9-этилоксакарбоцианина в водных растворах в присутствии ионов солей) и объяснялось присутствием в растворах двух изомерных форм красителей — *транс*- (EEEE) и *моно-цис*-изомеров (EEZE), которые образуют два типа J -агрегатов [40, 41]. Известно, что ОКЦ в водном растворе находится в форме *транс*-изомера [36], в присутствии САЧ краситель частично переходит в *цис*-форму [24]. В случае денатурированного САЧ два типа J -агрегатов ОКЦ могут быть образованы разными изомерами красителя. Однако в присутствии ПЭИ в спектрах не наблюдается подтверждений сдвига изомерного равновесия красителя ОКЦ в сторону *цис*-изомера.

Второй возможной причиной образования двух типов J -агрегатов ОКЦ при взаимодействии с денатурированным САЧ и ПЭИ является разная упаковка молекул красителя в агрегатах J^1 и J^2 , преимущественное формирование которых определяется стерическими параметрами центров J -агрегации. Агрегаты различных типов могут иметь разные углы (α) между хромофорами красителя и осью агрегата и расстояния между хромофорами в ансамбле агрегата.

Для учета влияния параметров упаковки молекул красителя на спектры поглощения J -агрегата можно использовать полуклассическое выражение [20]:

$$\Delta\nu = \nu_A - \nu_M = \frac{1}{4} \pi \epsilon_0 \frac{(n-1)}{n} \frac{2}{h} \frac{\langle M^2 \rangle}{r^3} (1 - 3\cos^2\alpha), \quad (5)$$

где ϵ_0 — абсолютная диэлектрическая проницаемость; h — постоянная Планка; $\langle M^2 \rangle$ — среднеквадратичное значение дипольного момента перехода красителя. Согласно (5), bathochromный сдвиг ($\Delta\nu$, см^{-1}) полосы поглощения J -агрегата (ν_A , см^{-1}) относительно положения спектра мономера (ν_M , см^{-1}) усиливается при уменьшении геометрических размеров частицы агрегата (r) и угла (α) между хромофорами красителя и осью агрегата ($\alpha < 54.7^\circ$). Уменьшение “когерентной длины” ($n < 6$) агрегата также влияет на $\Delta\nu$.

Согласно предлагаемому объяснению макромолекулы должны иметь центры, строение которых стимулирует образование J -агрегатов, имеющих упаковку молекул, характерную для типов J^1 или J^2 . Это объяснение лучше подходит для описания эффектов перестройки J -агрегатов, наблюдаемых в случае разветвленного ПЭИ. Однако подобная перестройка не наблюдалась в случае J -агрегации красителя в присутствии денатурированного САЧ (спектры стабильны во времени), что дополнительно может свидетельствовать в пользу образования J -агрегатов ОКЦ из разных изомеров красителя.

Заключение. Благодаря особенностям строения оксакарбоцианиновый краситель 3,3'-ди-(γ -сульфопропил)-5,5'-дифенил-9-этилоксакарбоцианин способен образовывать J -агрегаты при взаимодействии с рядом макромолекул (белков, полиэлектролитов). Показано, что взаимодействие этого

красителя с различными белками (коллагенами, альбуминами, иммуноглобулином G) и синтетическими полиэлектролитами способно по-разному стимулировать образование J-агрегатов, что может быть использовано на практике. Спектральные свойства J-агрегатов, образующихся в присутствии биополимеров, отличаются от свойств агрегатов, образующихся в отсутствие добавок, что является дополнительным способом контроля типа и состояния биополимера [37]. В присутствии денатурированного сывороточного альбумина человека и полиэтиленimina краситель образует J-агрегаты двух типов с характерными узкими полосами поглощения и резонансной флуоресценции в длинноволновой области спектров. В случае полиэтиленimina обнаружена перестройка агрегатов молекул красителя, с помощью спектров поглощения определены кинетические характеристики процесса.

Авторы выражают благодарность проф. Б. И. Шапиро за предоставление полиметинового красителя, Е. А. Воротеляк и П. В. Авдонину (ИБР РАН) за предоставление образцов коллагенов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 16-03-00735.

- [1] **I. Johnson.** *Histochem. J.*, **30** (1998) 123—140
- [2] **A. S. Tatikolov.** *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.*, **13** (2012) 55—90
- [3] **A. Mishra, R. K. Behera, P. K. Behera, B. K. Mishra, G. B. Behera.** *Chem. Rev.*, **100** (2000) 1973—2011
- [4] **А. А. Ищенко.** Строение и спектрально-люминесцентные свойства полиметиновых красителей, Киев, Наукова думка (1994)
- [5] **D. Noukakis, M. Van der Auweraer, S. Toppet, F. De Schryver.** *J. Phys. Chem.*, **99** (1995) 11860—11866
- [6] **A. K. Chibisov, G. V. Zakharova, H. Gerner.** *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **1** (1999) 1455—1460
- [7] **A. S. Tatikolov, S. M. B. Costa.** *Biophys. Chem.*, **107** (2004) 33—49
- [8] **М. П. Самцов, Е. С. Воропай, Д. Г. Мельников, Л. С. Ляшенко, А. А. Луговский, Ю. П. Истомин.** *Журн. прикл. спектр.*, **77** (2010) 438—444 [**M. P. Samtsov, E. S. Voropay, D. G. Melnikau, L. S. Liashenka, A. A. Lugovskii, Yu. P. Istomin.** *J. Appl. Spectr.*, **77** (2010) 406—412]
- [9] **W. West, S. Pearce.** *J. Phys. Chem.*, **69** (1965) 1894—1903
- [10] **E. E. Jelley.** *Nature*, **138** (1936) 1009
- [11] **G. Scheibe.** *Angew. Chem.*, **49** (1936) 563
- [12] **F. Wurthner, T. E. Kaiser, C. R. Saha-Moller.** *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50** (2011) 3376—3410
- [13] **Б. И. Шапиро.** *Успехи химии*, **75** (2006) 484—510
- [14] **T. D. Slavnova, A. K. Chibisov, H. Gerner.** *J. Phys. Chem. A*, **109** (2005) 4758—4765
- [15] **K. Ikegami.** *Chem. Phys. Lett.*, **401** (2005) 590—591
- [16] **T. F. A. De Greef, M. M. J. Smulders, M. Wolffs, A. P. H. J. Schenning, R. P. Sijbesma, E. W. Meijer.** *Chem. Rev.*, **109** (2009) 5687—5754
- [17] **D. A. Higgins, P. F. Barbara.** *J. Phys. Chem.*, **99** (1995) 3—7
- [18] **E. Rousseau, M. M. Koetse, M. Van der Auweraer, F. C. De Schryver.** *Photochem. Photobiol. Sci.*, **1** (2002) 395—406
- [19] **C. Peyratout, L. Daehne.** *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **4** (2002) 3032—3039
- [20] **U. De Rossi, S. Daehne, M. Lindrum.** *Langmuir*, **12** (1996) 1159—1165
- [21] **A. S. Tatikolov, S. M. B. Costa.** *Photochem. Photobiol. Sci.*, **1** (2002) 211—218
- [22] **A. Sidorowicz, C. Morab, S. Jablonka, A. Polaa, T. Modrzycka, D. Mosiadza, K. Michalaka.** *J. Mol. Struct.*, **744-747** (2005) 711—716
- [23] **K. C. Hannah, B. A. Armitage.** *Acc. Chem. Res.*, **37** (2004) 845—853
- [24] **П. Г. Пронкин, А. С. Татиколов.** *Журн. прикл. спектр.*, **82** (2015) 429—435 [**P. G. Pronkin, A. S. Tatikolov.** *J. Appl. Spectr.*, **82** (2015) 438—444]
- [25] **П. Г. Пронкин, А. С. Татиколов.** *Журн. прикл. спектр.*, **83** (2016) 884—890 [**P. G. Pronkin, A. S. Tatikolov.** *J. Appl. Spectr.*, **83** (2016) 938—944]
- [26] **А. К. Чибисов, Т. Д. Славнова, Х. Гернер.** *Рос. нанотехнол.*, **3** (2008) 26—41
- [27] **Е. А. Воротеляк, А. Ш. Шихвердиева, А. В. Васильев, В. В. Терских.** *Изв. РАН. Сер. биол.*, **4** (2002) 421—426
- [28] **P. M. Gallop, S. Seifter.** *Meth. Enzymol.*, **6** (1963) 635—641
- [29] **C. A. Parker, W. T. Rees.** *Analyst*, **85** (1960) 857—600

-
- [30] **A. H. Herz.** *Photogr. Sci. Eng.*, **18** (1974) 323—335
- [31] **V. Sundstrom, T. Gilbro, R. A. Gadonas, A. Piskarskas.** *J. Chem. Phys.*, **89** (1988) 2754—2762
- [32] **G. Busse, B. Frederichs, N. Kh. Petrov, S. Techert.** *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **6** (2004) 3309—3314
- [33] **K. Kemnitz, N. Tamai, I. Yamazaki, N. Nakashima, K. Yoshihara.** *J. Phys. Chem.*, **90** (1986) 5094—5101
- [34] **A. V. Hill.** *J. Physiol.*, **40** (1910) iv—vii
- [35] **S. Goutellea, M. Maurinc, F. Rougierb, X. Barbautb, L. Bourguignona, M. Ducherb, P. Mairea.** *Fundament. Clin. Pharmacol.*, **22** (2008) 633—648
- [36] **M. Caselli, L. Latterini, G. Ponterini.** *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **6** (2004) 3857—3863
- [37] **А. С. Татиколов, Н. Г. Панова.** *ХВЭ*, **4** (2005) 275—279
- [38] **O. Kratky, I. Pilz, Q. Rev. Biophys., **5** (1972) 481—537**
- [39] **C. Leggio, L. Galantini, P. V. Konarev, N. V. Pavel.** *J. Phys. Chem. B*, **113** (2009) 12590—12602
- [40] **R. Steiger, R. Kitzing, R. Hagen, H. Stoeckli-Evanss, E. Morsar.** *J. Photograph. Sci.*, **22** (1974) 151—167
- [41] **H. Gorner, T. D. Slavnova, A. K. Chibisov.** *J. Phys. Chem. B*, **114** (2010) 9330—9337