

УДК 535.37+539.196

**ПРИМЕНЕНИЕ АГРЕГАТОВ ЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ****Г.Я. Гуральчук^{1*}, Р.С. Гринёв¹, И.К. Катрунов¹, А.В. Сорокин¹, С.Л. Ефимова¹,
Ю.В. Малюкин¹, С.М. Ярмолук².**¹Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины,
Пр. Ленина 60., 61001 Харьков, Украина, guralchuk@isc.kharkov.com²Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
Ул. Заболотного 150., 03143 Киев, Украина

Поступила в редакцию 26 января 2007 г.

При помощи методов оптической спектроскопии были исследованы особенности агрегации цианинового красителя 3,3'-dimethyl-9-(2-thienyl)-thiacarbocyanine iodide (Суап-βTh) в бинарном растворе ДМФА: водный буфер TRIS-HCl (pH = 8) в присутствии нуклеиновых кислот (ДНК и РНК). Было обнаружено, что агрегаты красителя взаимодействуют с ДНК по типу бороздкового связывания при этом спектры поглощения и люминесценции агрегатов имеют сложную структуру. Предложена «блочная» модель агрегации красителя Суап-βTh на нуклеиновых кислотах, при этом основным блоком являются димеры красителя. Получены кривые затухания люминесценции агрегатов и мономеров красителя, подтверждающие предложенную модель. Полосы поглощения и люминесценции агрегатов Суап-βTh в присутствии ДНК значительно отличаются от таковых в присутствии РНК, что позволяет предложить данный краситель в качестве специфического флуоресцентного зонда для детекции НК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нуклеиновые кислоты; бороздковое связывание; J-агрегаты; цианиновые красители; флуоресцентные зонды.

Нуклеиновые кислоты (НК) являются исключительными по своей важности объектами исследования, поскольку полностью определяют генетическую информацию и план построения любого живого организма. Известно, что некоторые химические соединения (белки, синтетические органические молекулы, флуоресцентные красители и ионы) могут взаимодействовать с НК и использоваться в качестве зондов для НК [1]. В частности, в качестве люминесцентных зондов для детекции НК широко используются цианиновые красители, для которых характерен резкий (на 2-3 порядка) рост интенсивности флуоресценции при связывании с НК за счет "жесткой" фиксации транс-конформации [1-9]. Есть два основных способа связывания цианиновых красителей с ДНК: интеркаляцией между пар оснований [1,10-12] или встраиванием в малую бороздку [1,6,7,13]. Интеркаляция – встраивание плоских ароматических или гетероциклических молекул в полость между соседними парами оснований двойной спирали за счет гидрофобного и ван-дер-ваальсова взаимодействий. Как правило, интеркаляторы не проявляют специфичности к последовательности оснований нуклеиновой кислоты или имеют слабую GC-специфичность. Также недостатком интеркалирующих цианиновых красителей является то, что они, во-первых, приводят к увеличению спирали ДНК, а во-вторых, одинаковым образом флуоресцируют при связывании как с двухцепочечной, так и с одноцепочечной ДНК [1,10-12]. При бороздковом связывании, кроме гидрофобного и ван-дер-ваальсова взаимодействий, происходит также электростатическое взаимодействие лиганда с фосфат-ионами и образование водородных связей с основаниями НК и гидроксильными группами сахарных остатков. Как правило, молекулы локализуются в малой бороздке НК. Бороздковое связывание может проявлять специфичность к последовательности оснований НК за счет агрегации красителя [1,6,7,13].

Как правило, монометиновые красители связываются преимущественно за счет интеркаляции [10-12,14], а увеличение длины полиметиновой цепи цианинов ведет к росту доли бороздкового взаимодействия [7,15,16].

При бороздковом связывании, цианиновые красители могут взаимодействовать между собой, образуя агрегаты, чаще всего «face-to-face» димеры [1,15-17]. Образование димеров приводит к гипсохромному сдвигу полосы поглощения, поэтому подобные типы агрегатов называют H-агрегатами [18,19]. Однако для некоторых типов красителей наблюдалась и head-to-tail агрегация (J-агрегация) красителей в малой бороздке ДНК [16,20-22], которая приводит к батохромному сдвигу полосы поглощения [23,24]. В отличие от H-димеров, J-агрегаты, образованные в малой бороздке, могут включать до нескольких десятков мономеров [16,20-22]. Т.к. оптические (экситонные) свойства J-

Применение агрегатов цианиновых красителей для детекции нуклеиновых кислот

агрегатов очень чувствительны к их окружению [23-25], то очевидно, что такая более протяженная структура может служить в роли зонда, чувствительного к строению нуклеиновых кислот.

В данной работе мы представлены результаты исследования особенностей формирования J-агрегатов красителя 3,3'-dimethyl-9-(2-thienyl)-thiocarbocyanine iodide (Cyan-βTh) (рис.1) в присутствии нуклеиновых кислот.

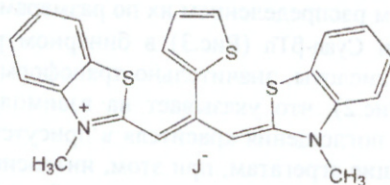


Рис.1. Структурная формула красителя Суан-βTh

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Краситель Суан-βTh был синтезирован в Институте молекулярной биологии и генетики НАН Украины (Киев). Образцы для исследований приготавливались из исходного раствора красителя в ДМФА (2 мМ) при разбавлении его в водном буфере TRIS-HCl ($C = 0.05$ М, $pH = 8$) в соотношении 1:19. Т.о. концентрация красителя во всех образцах составляла 10^{-4} М. ДНК (salmon testes, Sigma-Aldrich) растворяли в буферном растворе TRIS-HCl, а концентрация ДНК определялась спектроскопически по молярному коэффициенту экстинкции ($\epsilon = 13200$ М $^{-1}$ см $^{-1}$ при $\lambda = 260$ нм, где М = моль пар оснований/л). Раствор суммарной РНК (Sigma-Aldrich) также приготавливали в буферном растворе (4 мг/мл в исходном растворе) с последующим разбавлением в 100 раз. Во всех экспериментах использовались концентрации: DNA – 6×10^{-5} моль пар оснований/л, РНК – 1.2×10^{-4} моль оснований/л.

Для получения спектров люминесценции и возбуждения люминесценции, использовался спектрометрический комплекс на базе двух монохроматоров МДР-23 и ксеноновой лампы. Один из монохроматоров служил для выделения требуемой длины волны возбуждения (FWHM ~ 0.5 нм), другой – для регистрации люминесценции. Для измерения UV-vis спектров поглощения данный комплекс был дополнен лампой накаливания и дейтериевой лампой. Для измерения кривых затухания использовалась система коррелированного во времени счета одиночных фотонов с аппаратной функцией 500 пс. В качестве источника возбуждения использовался Nd:YAG лазер (вторая гармоника, $\lambda = 532$ нм) с синхронизацией продольных мод. Обработка кривых затухания проводилась при помощи программного обеспечения CFS_LS (Center for Fluorescent Spectroscopy, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мономеры красителя Суан-βTh в ДМФА выявляют типичные для цианиновых красителей спектры поглощения и люминесценции (рис.2), с максимумами $\lambda_{\text{погл}} = 576$ нм и $\lambda_{\text{люм}} = 605$ нм. В бинарном растворе ДМФА: водный буфер TRIS-HCl (0.05 М, $pH = 8$) (1:19) спектр поглощения трансформируется (рис.2): полоса мономеров сдвигается в коротковолновую область ($\lambda_{\text{max}} = 568$ нм), что связано с иной полярностью бинарного раствора по сравнению с ДМФА, а на длинноволновом краю спектра появляется новая полоса с максимумом $\lambda_{\text{abs}} = 679$ нм. Данная полоса достаточно широкая ($\Delta\nu_{\text{FWHM}} = 750$ см $^{-1}$) и имеет малую интенсивность. Также отметим увеличение интенсивности коротковолнового плеча ($\lambda_{\text{max}} = 532$ нм) полосы мономеров по отношению к спектру в ДМФА (рис.2).

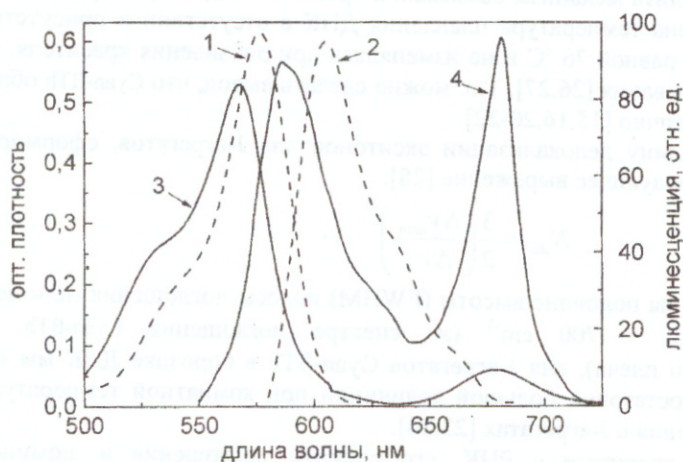


Рис.2. Спектры поглощения (1,3) и люминесценции (2,4) ($\lambda_{\text{exc}} = 530$ нм) Суан-βTh в ДМФА (1,2) и в бинарном растворе ДМФА: водный буфер TRIS-HCl ($pH = 8$) (3,4).

В спектре люминесценции Суан-βTh в бинарном растворе также появляется длинноволновая полоса ($\Delta\nu_{FWHM} = 340 \text{ см}^{-1}$) с максимумом $\lambda_{lum} = 681 \text{ нм}$, однако, в отличие от спектра поглощения, данная полоса интенсивна. Появление длинноволновой полосы в спектре поглощения и практически резонансной интенсивной полосы в спектре люминесценции указывает на образование J-агрегатов красителя. Значительная ширина полос поглощения и люминесценции, очевидно, связана с образованием J-агрегатных цепочек разной длины с широким распределением их по размерам [23,24].

Спектры поглощения и люминесценции Суан-βTh (Рис.3) в бинарном растворе ДМФА: водный буфер TRIS-HCl, содержащем нуклеиновые кислоты, значительно трансформируется по сравнению со спектрами красителя в растворе без НК (Рис.2), что указывает на взаимодействие красителя с НК, приводящее к агрегации Суан-βTh. В спектре поглощения красителя в присутствии ДНК (Рис.3а, кривая 1) можно выделить три полосы, принадлежащие агрегатам, при этом, интенсивность полосы мономеров настолько мала, что данная полоса не выделяется даже в виде перегиба, что указывает на высокую степень агрегации красителя на поверхности ДНК. Первая полоса поглощения с максимумом $\lambda = 536 \text{ нм}$ (будем обозначать ее Н-полоса) – это широкая и очень интенсивная полоса, сдвинутая в коротковолновую сторону по отношению к полосе мономеров. Эту полосу можно приписать т.н. Н-агрегатами [23,24] с «face-to-face» молекулярной упаковкой. Вторая полоса с максимумом $\lambda = 683 \text{ нм}$ (будем обозначать ее J-полоса) – узкая ($\Delta\nu_{FWHM} = 150 \text{ см}^{-1}$) и не очень интенсивная полоса, смещенная в длинноволновую область. Эту полосу можно приписать J-агрегатам (агрегатам с «end-to-end» молекулярной упаковкой [23,24]). Третья полоса представляет собой неинтенсивное плечо с максимумом $\lambda = 645 \text{ нм}$, также смещенное в длинноволновую область относительно полосы мономеров. Можно предположить, что данная полоса также принадлежит агрегатам с «end-to-end» молекулярной упаковкой, однако состоящим из малого числа мономеров (2-4). Спектр люминесценции J-агрегатов в присутствии ДНК (рис.3а, кривая 2) состоит только из двух полос: интенсивной узкой полосы свечения J-агрегатов ($\Delta\nu_{FWHM} = 200 \text{ см}^{-1}$, $\lambda_{max} = 685 \text{ нм}$) и малоинтенсивной полосы мономеров.

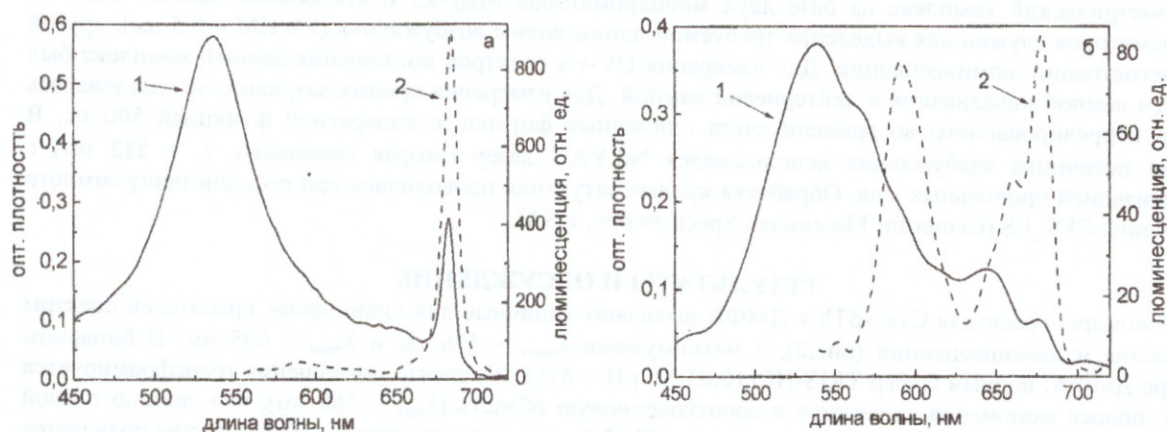


Рис.3. Спектры поглощения (1) и люминесценции (2) ($\lambda_{exc} = 530 \text{ нм}$) Суан-βTh (0.1 мМ) в присутствии: а) ДНК (0.6×10^{-4} моль пар оснований/л), б) РНК (1.2×10^{-4} моль оснований/л)

Для того чтобы определить механизм связывания красителя с ДНК (интеркаляция или бороздковое связывание), была определена температура плавления ДНК в отсутствии и присутствии Суан-βTh. Для чистого ДНК она оказалась равной 76 °C и не изменялась при добавления красителя, что характеризует бороздковый механизм связывания [26,27]. Т.о. можно сделать вывод, что Суан-βTh образует J-агрегаты в малой бороздке ДНК, аналогично [15,16,20-22].

Мы можем оценить длину делокализации экситонов для J-агрегатов, сформированных в малой бороздке ДНК, используя следующее выражение [28]:

$$N_{del} = \frac{3}{2} \left(\frac{\Delta\nu_{mon}}{\Delta\nu_J} \right)^2 - 1, \quad (1)$$

где $\Delta\nu_{mon}$ – полная ширина на половине высоты (FWHM) полосы поглощения мономеров, $\Delta\nu_J$ – FWHM J-полосы. Принимая $\Delta\nu_{mon} = 700 \text{ см}^{-1}$ (из спектра поглощения Суан-βTh в ДМФА после выделения коротковолнового плеча), для J-агрегатов Суан-βTh в бороздке ДНК мы получаем $N_{del} \approx 32$ мономера, что является достаточно большой величиной при комнатной температуре и указывает на высокую степень упорядочения в J-агрегатах [23,24].

При взаимодействии красителя с РНК, его спектры поглощения и люминесценции (рис.3б) отличаются от таковых для растворов с ДНК (рис.3а). В спектре поглощения наблюдается перераспределение интенсивностей всех полос, наблюдаемых в спектре красителя с ДНК (рис.3б, кривая

Применение агрегатов цианиновых красителей для детекции нуклеиновых кислот

1): уменьшается интенсивность H-полосы, при этом разрешается полоса мономеров, которая проявляется в виде плеча. Интенсивность J-полосы также уменьшается, а интенсивность новой полосы (с $\lambda_{\text{max}} = 645$ нм), наоборот, возрастает. В спектре люминесценции (рис.3б, кривая 2) наблюдается значительное уменьшение интенсивности полосы J-агрегатов (примерно в 10 раз) по сравнению с интенсивностью свечения в ДНК. При этом максимумы полос поглощения ($\lambda_{\text{max}} = 676$ нм) и люминесценции ($\lambda_{\text{max}} = 678$ нм) J-агрегатов несколько сдвинуты в коротковолновую область относительно полос в растворе с ДНК (на 7 нм), т.е. J-агрегаты, образующиеся на РНК, менее упорядочены. Также в спектре люминесценции наблюдается новая полоса ($\lambda_{\text{max}} = 660$ нм), которая проявляется в виде коротковолнового плеча полосы свечения J-агрегатов. Перераспределение интенсивностей полос мономеров и агрегатов (как J-, так и H-агрегатов), при взаимодействии красителя с РНК, понятно и связано с намного меньшей упорядоченностью структуры РНК по сравнению с ДНК. Т.е. в РНК уменьшается число мест, на которых может происходить протяженная агрегация. Поэтому основным вопросом является природа новой полосы ($\lambda_{\text{max}} = 645$ нм), которую будем называть D-полосой, проявляющейся в спектрах поглощения красителя при взаимодействии с обоими типами нуклеиновых кислот (рис.3).

В работах [20,21] для J-агрегатов СуанβiPr появление подобной полосы было объяснено Давыдовским расщеплением структуры возбужденных электронных энергетических состояний агрегатов, которое проявляется вследствие спиральной структуры агрегатов [18,29,30], образующихся в малой бороздке ДНК. Однако в [16] для J-агрегатов DiSC₃₁(5), взаимодействующих с ДНК, появление дополнительной полосы замечено не было. Кроме того, в спектре свечения агрегатов спиральной структуры не должно появляться новых полос, т.к. за счет быстрой внутримономерной релаксации люминесценция формируется только с нижних энергетических уровней, соответствующих J-полосе [18,24,29,30]. Более вероятным представляется предположение, что данная полоса связана с агрегатами с малой степенью ассоциации, а именно с димерами, т.к. димеры являются простейшей и наиболее распространенной формой агрегатов полиметиновых красителей [31]. Кроме того, появление в спектре агрегатов одновременно H- и J-полос [31-34] свидетельствует о наличии в элементарной ячейке подобных агрегатов двух молекул (т.е. димера) и является проявлением т.н. «давыдовского» расщепления [30].

При возбуждении люминесценции агрегатов Суан-βTh, связанных с РНК, в полосу димеров (D-полосу) (рис.4), видно, что происходит лишь небольшое перераспределение интенсивности в спектре: свечение D-полосы несколько возрастает, а J-полосы – убывает. В случае же взаимодействия красителя с ДНК, свечение D-полосы не наблюдается при возбуждении на любой длине волны. Можно предположить, что в случае взаимодействия с ДНК, при котором степень ассоциации намного выше, димеры находятся в непосредственной близости от более протяженных агрегатов, благодаря чему происходит эффективный перенос энергии с димеров на J-агрегаты. В случае же РНК, часть димеров не

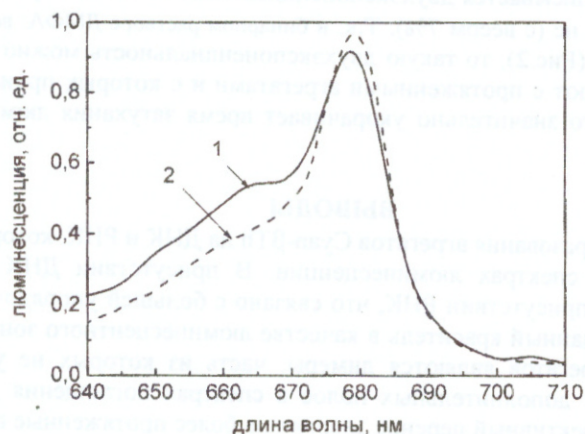


Рис.4. Полоса люминесценция агрегатов Суан-βTh в присутствии РНК при возбуждении: 1 – $\lambda_{\text{exc}} = 530$ нм и 2 – $\lambda_{\text{exc}} = 630$ нм

взаимодействует с большими агрегатами и поэтому наблюдается их свечение.

Для проверки данного предположения были получены кривые затухания люминесценции при регистрации в разных полосах свечения (рис.5). В обоих случаях (с ДНК и РНК, рис.5, кривые 2) кривые затухания в J-полосе мало отличаются от аппаратной функции, т.е. времена затухания очень короткие, что характерно для J-агрегатов и связано с экситонной природой их электронных возбуждений [24]. Кривые затухания в полосах мономеров (рис.5, кривые 1) наиболее хорошо аппроксимируются двухэкспоненциальным законом со следующими характеристиками: для ДНК – $\tau_1 = 0.08$ нс (с весом

12%) и $\tau_2 = 1.0$ нс (с весом 88%), для РНК – $\tau_1 = 0.08$ нс (с весом 42%) и $\tau_2 = 1.41$ нс (с весом 58%). Такой характер кривых затухания можно связать с наличием мономеров как в растворе, так и связанных с НК. Действительно, время затухания люминесценции мономеров в растворе (не приведены) очень короткое (менее разрешающей способности нашей аппаратуры), что связано с цис-транс фотоизомеризацией красителя [35]. Т.о. мономеров, оставшиеся в растворе, дают короткие времена (τ_1), причем их число (пропорциональное весу короткой составляющей) значительно больше в растворе с РНК, чем с ДНК, что также подтверждает высокую степень связывания красителя с ДНК. Более длинные времена затухания люминесценции мономеров относятся к красителю, связавшемуся с НК. То, что при связывании с ДНК, время затухания значительно меньше, можно объяснить высокой степенью ассоциации красителя, при этом с мономеров, которые не проассоциировали, происходит перенос

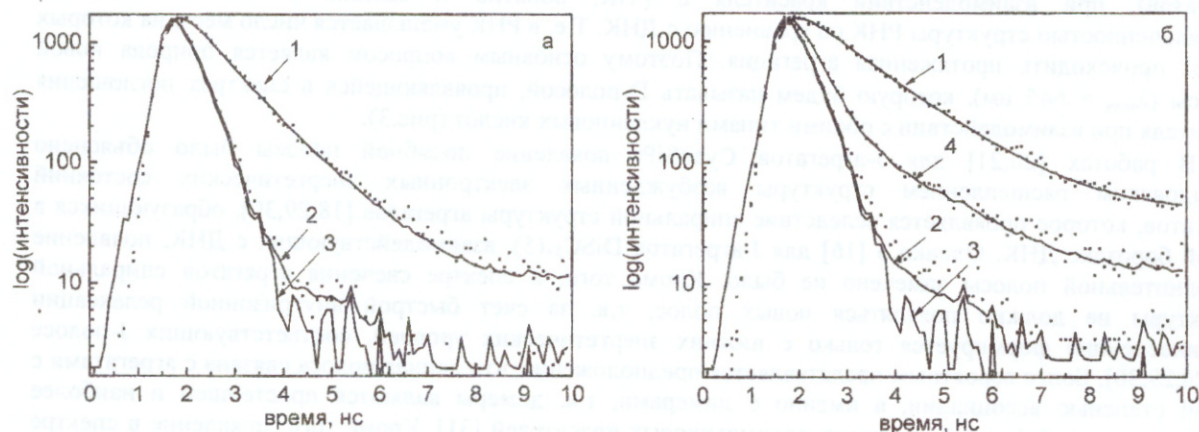


Рис.5. Кривые затухания люминесценции Суап-βТh в присутствии а) ДНК и б) РНК при регистрации в полосах: 1 – мономеров ($\lambda_{\text{рег}} = 595$ нм), 2 – J-агрегатов ($\lambda_{\text{рег}} = 680$ нм), 4 – димеров ($\lambda_{\text{рег}} = 655$ нм). 3 – аппаратная функция.

энергии на агрегаты, что и приводит к укорочению времени жизни мономеров [36]. Т.к. степень ассоциации красителя на РНК значительно меньше, то расстояние между мономерами и агрегатами больше некоторого критического расстояния и переноса энергии не происходит.

Кривая затухания люминесценции, зарегистрированная в полосе димеров (Рис.5б, кривая 4) лежит между кривыми затухания мономеров и агрегатов, что еще раз подтверждает, что мы имеем дело именно с димерами, а не с расщеплением энергетических уровней вследствие спиральности агрегатов. Данная кривая также наиболее хорошо описывается двухэкспоненциальным законом с временами затухания $\tau_1 = 0.11$ нс (с весом 93%) и $\tau_2 = 1.49$ нс (с весом 7%). Т.к. в бинарном растворе ДМФА: водный буфер TRIS-HCl полоса димеров не наблюдается (Рис.2), то такую двухэкспоненциальность можно объяснить наличием димеров, которые взаимодействуют с протяженными агрегатами и с которых происходит эффективный перенос энергии на агрегаты, что значительно укорачивает время затухания люминесценции димеров [36].

ВЫВОДЫ

Показана специфичность образования агрегатов Суап-βТh на ДНК и РНК, которая проявляется как в спектрах поглощения, так и в спектрах люминесценции. В присутствии ДНК степень ассоциации красителя намного выше, чем в присутствии РНК, что связано с большей упорядоченностью структуры НК. Это позволяет предложить данный краситель в качестве люминесцентного зонда для НК. Основной структурной единицей его J-агрегатов являются димеры, часть из которых не участвует в процессе агрегации и проявляется в виде дополнительных полос в спектрах поглощения и люминесценции. С данных димеров происходит эффективный перенос энергии на более протяженные агрегаты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M.J. Waring and J.B. Chaires (Eds.), *DNA binders and related subjects*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2005
2. R. Haugland, *Molecular Probes. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 9th ed.*, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, 2002
3. T.Y. Ohulchansky, H.E. Pudavar, S.M. Yarmoluk, V.M. Yashchuk, E.J. Bergey, P.N. Prasad, *Photochem. Photobiol.* **77**(2) (2003) 138-145.
4. S.M. Yarmoluk, M.Yu. Losytsky, V.M. Yashchuk, *J. Photochem. Photobiol. B.* **67**(1) (2002) 57-63.
5. I. V. Valyukh, V. B. Kovalska, Y. L. Slominski, S. M. Yarmoluk, *J. Fluoresc.* **12**(1) (2002) 105-107.

Применение агрегатов цианиновых красителей для детекции нуклеиновых кислот

6. M. Yu. Losytskyy, K. D. Volkova, V. B. Kovalska, I. E. Makovenko, Yu. L. Slominskii, O. I. Tolmachev and S. M. Yarmoluk, *J. Fluoresc.* **15**(6) (2005) 849-857.
7. V.B. Kovalska, K.D. Volkova, M.Yu. Losytskyy, O.I. Tolmachev, A.O. Balanda, S.M. Yarmoluk, *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **65**(2) (2006) 271-277.
8. V.B. Kovalska, V.P. Tokar, M.Yu. Losytskyy, T. Deligeorgiev, A. Vassilev, N. Gadjev, K.-H. Drexhage, S.M. Yarmoluk, *J. Biochem. Biophys. Method.* **68**(3) (2006) 155-165.
9. P.R. Bianco, L.R. Brewer, M. Corzett, R. Balhorn, Y. Yeh, S.C. Kowalczykowski, R.J. Baskin, *Nature* **409** (2001) 374-378.
10. L.S. Lerman, *J. Mol. Biol.* **3** (1961) 18-30.
11. H.S. Rye, S. Yue, D.E. Wemmer, M.A. Quesada, R.P. Haughland, R.A. Mathies, A. Glazer, *Nucleic Acids Res.* **20**(11) (1992) 2803-2812.
12. A. Larsson, C. Carlsson, M. Jonsson, B. Albinsson, *J. Am. Chem. Soc.* **116** (1994) 8459-8465.
13. D.E. Wemmer, H.D. Dervan, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7** (1997) 355-361.
14. B. Norden, *Biophys. Chem.* **6** (1977) 31-45.
15. J.L. Seifert, R.E. Connor, S.A. Kushon, M. Wang, B.A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 2987-2995.
16. M. Wang, G.L. Silva, and B. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.* **122**(41) (2000) 9977-9985.
17. D.E. Wemmer, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29** (2000) 439-461.
18. E.G. McRae, M. Kasha in L. Augenstein, R. Mason, B. Rosenberg (Eds.), *Physical processes in radiation biology*, Academic Press, New York, 1964, pp. 337-363.
19. V. Czikkely, H.D. Forsterling, H. Kuhn, *Chem. Phys. Lett.* **6**(3) (1970) 207-210.
20. T.Yu. Ogul'chansky, M.Yu. Losytskyy, V.B. Kovalska, S.S. Lukashov, V.M. Yashchuk, and S.M. Yarmoluk, *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **57**(13) (2001) 2705-2715.
21. M.Yu. Losytskyy, V.M. Yashchuk, S.S. Lukashov, S.M. Yarmoluk, *J. Fluoresc.* **12**(1) (2002) 109-112.
22. A. Chowdhury, S. Wachsmann-Hogiu, P.R. Bangal, I. Raheem, L.A. Peteanu, *J. Phys. Chem. B.* **105**(48) (2001) 12196-12201.
23. D. Mobius, *Adv. Matter.* **7**(5) (1995) 437-444.
24. T. Kobayashi (Ed.), *J-Aggregates*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, Singapore, New Jersey, London, Hong Kong, 1996.
25. S. Salvioli, A. Ardizzoni, C. Franceschi, A. Cossarizza, *FEBS Lett.* **411** (1997) 77-82.
26. Y. Maeda, K. Nunomura, E. Ohtsubo, *J. Mol. Biol.* **215** (1990) 321-329.
27. T. Biver, F. Secco, M.R. Tine and M. Venturini, *Arch. Biochem. Biophys.* **418** (2003) 63-70.
28. L.D. Bakalis, J. Knoester, *J. Lumin.* **87-89** (2000) 66-70.
29. S.S. Lampoura, C. Spitz, S. Dähne, J. Knoester, K. Duppen, *J. Phys. Chem. B.* **106** (2002) 3103-3117.
30. А.С. Давыдов, Теория молекулярных экситонов, Наука, Москва, 1968.
31. Б.И. Шапиро, *Успехи химии*, **75**(5) (2006) 484-509.
32. S. Ushiroda, N. Ruzycski, Y. Lu, M.T. Spittler and B.A. Parkinson, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 5158-5168.
33. D.M. Basko, A.N. Lobanov, A.V. Pimenov, A.G. Vitukhnovsky, *Chemical Physics Letters* **369** (2003) 192-197.
34. B. Birkan, D. Gulien, and S. Özçelik, *J. Phys. Chem B* **110** (2006) 10805-10813.
35. А.А. Ищенко, *Строение и спектрально-люминесцентные свойства полиметиновых красителей*, Наукова думка, Киев, 1994.
36. Дж. Лакович, *Основы флуоресцентной спектроскопии*, Мир, Москва, 1986.