

УДК 535.343.3:535.372:547.97

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГИДРОФОБНЫХ ПОЛИМЕТИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ С ЛИПОСОМАМИ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ МЕТОДОМ ОПТИЧЕСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

И.Ю. Курильченко<sup>1</sup>, С.Л. Ефимова<sup>2\*</sup>, Т.Н. Ткачева<sup>2</sup>, Н.С. Кавок<sup>2</sup>, А.В. Сорокин<sup>2</sup>,  
Ю.В. Малюкин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Славянский государственный педагогический университет, ул. Батюка, 19, Славянск 84116, Украина

<sup>2</sup>Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины, пр. Ленина, 60, 61001 г. Харьков, Украина

\*e-mail: ephimova@isma.kharkov.ua

Поступила в редакцию 4 апреля 2012 года

Принята 26 апреля 2012 года

Методом оптической спектроскопии исследовано взаимодействие катионных полиметиновых красителей 3,3'-диоктадецилоксакарбоцианин перхлорат (DiO), 1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметиллиндокарбоцианин перхлорат (DiI) и 1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметиллиндодикарбоцианин перхлорат (DiD) с цвиттерионными липосомами фосфатидилхолина яичного желтка (ФХ). По изменению оптической плотности растворов красителей при варьировании концентрации ФХ, используя уравнение Скотта, оценены константы связывания красителей с липосомами ФХ ( $K_c$ ) и рассчитаны термодинамические параметры комплексообразования «краситель-липосома» ( $\Delta G^0$ ,  $\Delta H^0$  и  $\Delta S^0$ ). Показано, что процесс комплексообразования является самопроизвольным и энергетически выгодным процессом, связанным с переходом красителя из агрегированной формы в мономерную. Основной вклад в процесс комплексообразования вносят гидрофобные и ван-дер-ваальсовы взаимодействия, вклад электростатических взаимодействий незначителен.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** полиметиновый краситель, липосома, константа связывания, межмолекулярное взаимодействие, термодинамические параметры.

## ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ ГІДРОФОБНИХ ПОЛІМЕТИНОВИХ БАРВНИКІВ З ЛІПОСОМАМИ В ВОДНИХ РОЗЧИНАХ МЕТОДОМ ОПТИЧНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ

І.Ю. Курільченко<sup>1</sup>, С.Л. Єфімова<sup>2\*</sup>, Т.М. Ткачева<sup>2</sup>, Н.С. Кавок<sup>2</sup>, О.В. Сорокін<sup>2</sup>,  
Ю.В. Малюкін<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Слов'янський державний педагогічний університет, вул. Батюка, 19, Слов'янськ 84116, Україна

<sup>2</sup>Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України, пр. Леніна, 60, 61001, м.Харків, Україна

Методом оптичної спектроскопії досліджено взаємодію катіонних поліметинових барвників 3,3'-діоктадецилоксакарбоціанін перхлорат (DiO), 1,1'-діоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилліндокарбоціанін перхлорат (DiI) і 1,1'-діоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилліндодікарбоціанін перхлорат (DiD) з цвиттеріонними ліпосомами фосфатиділхоліна яєчного жовтка (ФХ). За зміною оптичної густини розчинів при варіюванні концентрації ФХ з використанням рівняння Скотта, проведено оцінку констант зв'язування барвників з ліпосомами ФХ ( $K_c$ ) та розраховано термодинамічні параметри утворення комплексів «барвник – ліпосома» ( $\Delta G^0$ ,  $\Delta H^0$  і  $\Delta S^0$ ). Показано, що процес утворення комплексів є доволіним та енергетично вигідним процесом, який пов'язаний з переходом барвника з агрегованої форми до мономерної. Основний вклад в процес утворення комплексів належить гідрофобним та ван-дер-ваальсовим взаємодіям, внесок електростатичної взаємодії незначний.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** поліметиновий барвник, ліпосома, константа зв'язування, міжмолекулярна взаємодія, термодинамічні параметри.

## SPECTROSCOPIC STUDY OF INTERACTIONS BETWEEN POLYMETHINE DYES AND LIPOSOMES IN AQUEOUS SOLUTIONS

I.Yu. Kurilchenko<sup>1</sup>, S.L. Yefimova<sup>2\*</sup>, T.N. Tkacheva<sup>2</sup>, N.S. Kavok<sup>2</sup>, A.V. Sorokin<sup>2</sup>,  
Yu.V. Malyukin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Slavyansk State Pedagogical University, Slavyansk 84116, Ukraine, Batyuka str., 19, Slavyansk 84116, Ukraine

<sup>2</sup>Institute for Scintillation Materials NAS of Ukraine, 60 Lenin ave., 61001 Kharkov, Ukraine

Interaction between cationic polymethine dyes 3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate (DiO), 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI), 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate (DiD) and zwitterionic liposomes of L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine from egg yolk (PC) has been studied by spectroscopic method. Analyzing changes in the dye absorption spectra under the variation of PC concentration and using Scott equation, binding constants ( $K_c$ ) and thermodynamic parameters ( $\Delta G^0$ ,  $\Delta H^0$  и  $\Delta S^0$ ) of "dye-to-liposome" complex formation have been calculated. It has been shown that the complex formation is spontaneous and energetically favorable process associated with the change in dye aggregate state from associates to monomer form. The main contribution in complex formation process belongs to hydrophobic and Van der Waals forces, while the contribution of electrostatic interactions is negligible.

**KEY WORDS:** polymethine dyes, liposome, binding constant, intermolecular interaction, thermodynamics parameters

Полиметиновые красители очень широко применяются в биологических исследованиях и медицинской диагностике в качестве флуоресцентных зондов и метчиков [1,2]. Привлекательными спектральными свойствами полиметинов, обуславливающими их применение, является экстремально высокое значение коэффициента молярного поглощения ( $> 100 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ) и высокая, по сравнению с другими органическими красителями, фотостабильность и узкие полосы люминесценции [1,2]. Флуоресцентные зонды этого класса с короткими углеводородными радикалами ( $< 7$  углеродных атомов) используются как потенциал-чувствительные сенсоры, для визуализации клеточных органелл (митохондрии, эндоплазматическая сеть) и контроля функционального состояния клеток по изменению митохондриального потенциала [1,2]. Полиметины с длинными углеводородными радикалами ( $> 12$  углеродных атомов) обладают ярко выраженными липофильными свойствами и используются для мониторинга нейронов, трайсинга липопротеинов, долговременного наблюдения клеток в культуре, включая трансплантацию клеток, криоконсервирование, изучение жизнеспособности клеточных культур в связи с этими процессами и др. [1-9]. Однако, несмотря на широкое использование полиметиновых красителей в биологических и медицинских исследованиях, работы по спектроскопии этих флуоресцентных зондов малочисленны [10-13]. Подобные исследования также важны с точки зрения использования полиметиновых красителей для визуализации и мечения наноразмерных контейнеров, таких как полимерные мицеллы и липосомы, очень интенсивно используемые в последнее время в биологии, фармакологии и медицине для целевой доставки различных веществ внутрь живой клетки [14-18].

В настоящей работе методами оптической спектроскопии исследуется процесс взаимодействия гидрофобных катионных полиметиновых красителей 3,3'-диоктадецилоксакарбоцианин перхлорат (DiO), 1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианин перхлорат (DiI) и 1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианин перхлорат (DiD) с наноразмерными контейнерами – липосомами цвиттерионного фосфолипида – фосфатидилхолина яичного желтка (ФХ).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Полиметиновые красители DiO, DiI и фосфолипид ФХ (рис.1) куплены у Sigma Aldrich, краситель DiD - у фирмы Invitrogen и использовались без дополнительной очистки. Для приготовления исходных растворов красителей ( $1 \times 10^{-3}$  М) и липида (40 мг/мл) использовался хлороформ (Sigma Aldrich) спектроскопической чистоты.

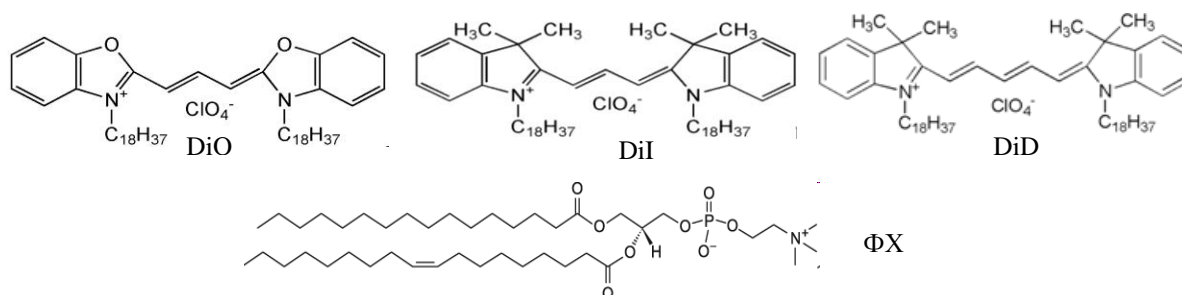


Рис.1. Структурные формулы используемых полиметиновых красителей и фосфолипида.

Растворы для исследования готовились по следующей схеме. Сначала готовили исходные растворы каждого красителя в хлороформе концентрацией  $1 \times 10^{-3}$  М. При проведении исследований готовились серии растворов с определенным соотношением краситель:ФХ, при этом варьировалась концентрация ФХ, концентрация красителей во всех растворах была одинакова -  $1 \times 10^{-6}$  М. Поскольку концентрация ФХ варьировалась в широком диапазоне (от  $2 \times 10^{-5}$  до  $1 \times 10^{-3}$  М), для приготовления водных растворов с малым количеством ФХ были также необходимы растворы ФХ в хлороформе концентрациями  $1 \times 10^{-2}$  и  $1 \times 10^{-4}$  М. Исходные растворы нужного красителя и ФХ смешивались в заданном соотношении. После испарения хлороформа полученная липидная пленка, содержащая краситель, гидратировалась водой двойной перегонки, в результате чего получалась суспензия, содержащая большие многослойные липосомы с красителем [19]. Для получения маленьких однослойных липосом, полученная липидная суспензия обрабатывалась ультразвуком при помощи ультразвукового диспергатора УЗД 22/44 (Украина) в течение 5 мин [19].

Спектры поглощения регистрировали с помощью UV-Vis спектрофотометра Specord 200 (Analytic, Jena, Германия) с применением кварцевой кюветы с длиной оптического пути 1 см. Все измерения проводили как минимум трижды при температурах 288 К, 298 К, 308 К, и 318 К. Температуру контролировали с помощью термостатирующей ячейки. Времена затухания люминесценции красителей в разных средах (растворители, мицеллы додецилсульфата натрия (ДСН) и липосомы ФХ) измерялись на спектрометре с временным разрешением FluoTime 2000 (PicoQuant, Германия), работающим по методике время-коррелированного счета единичных фотонов (Time-Correlated Single Photon Counting, TCSPC) с аппаратной функцией 100 пс. Для возбуждения люминесценции использовались лазерные пикосекундные диодные головки  $\lambda_{\text{макс}} = 439$  и 531 нм (PicoQuant, Германия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все красители, используемые в работе, благодаря длинным углеводородным радикалам  $C_{18}H_{37}$  обладают чрезвычайно низкой растворимостью в воде. При добавлении воды, например, к раствору красителя DiI в этаноле происходит образование ассоциатов, что приводит к трансформации спектров поглощения (рис.2а). Люминесценция красителя в таких растворах также потушена (рис.2б). Однако в водных растворах, содержащих мицеллы ДСН или липосомы ФХ, благодаря эффекту солюбилизации происходит встраивание молекул красителя в мицеллы или липидный бислой липосом, что приводит к резким изменениям в спектрах поглощения и люминесценции (увеличение интенсивности, восстановление формы полос и сдвиг

спектров, рис.2а,б) [20-24]. Для красителей DiO и DiD наблюдаются аналогичные изменения спектров (не приводится).

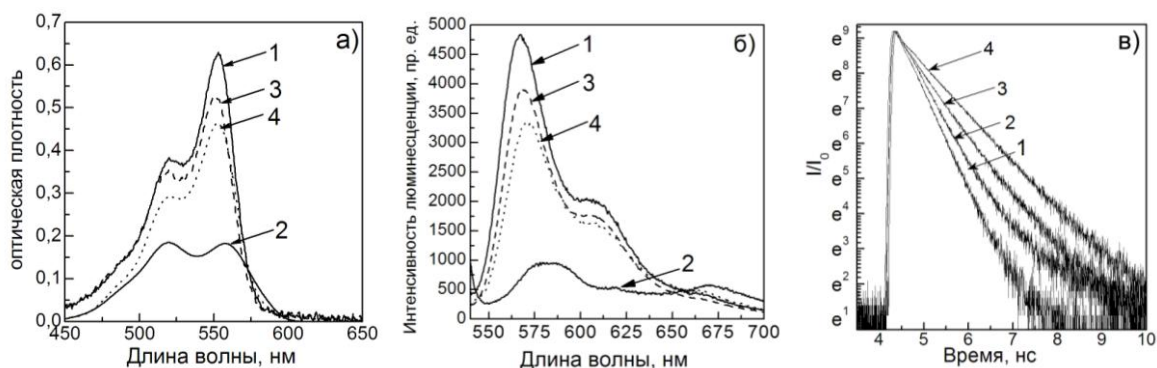


Рис.2. Спектры поглощения (а) и люминесценции (б) красителя DiI в разных растворителях: 1 – этанол, 2 – этанол:вода (60%), 3 – водно-мицеллярный раствор ДСН, 4 – водный раствор, содержащий липосомы ФХ; (в) Кривые затухания люминесценции красителя DiI в разных растворителях: 1 – этанол; 2 – водный раствор, содержащий липосомы ФХ; 3 – водно-мицеллярный раствор ДСН; 4 – хлороформ.  $[DiI] = 1 \times 10^{-5}$  М.

О встраивании красителей в мицеллы или липосомы свидетельствует также увеличение времени затухания красителей в растворах, содержащих ПАВ (рис.2в, кривые 2 и 3). Так, для DiI времена затухания люминесценции составляют 0,37 нс (этанол), 0,42 нс (водный раствор, содержащий липосомы ФХ), 0,54 нс (водно-мицеллярный раствор) и 0,7 нс (хлороформ). Поскольку люминесценция красителей в водных растворах полностью потушена, то для наглядности времена затухания сравнили с таковыми в этаноле ( $E_T = 51,9$  ккал/моль) и хлороформе ( $E_T = 39,1$  ккал/моль), как растворителях с большей (этанол) и меньшей (хлороформ) полярностью [25].

Полученные экспериментальные данные однозначно указывают на образование в водных растворах, содержащих мицеллы или липосомы, комплексов «краситель – мицелла/липосома». Процессы комплексообразования в системе «краситель – мицелла» были подробно изучены ранее [22-24]. Интересным было исследовать процесс комплексообразования в системе «краситель – липосома», поскольку красители DiO, DiI и DiD используются для флуоресцентного мечения липосом при исследовании их взаимодействия с живыми клетками [26,27].

Процессы образования комплексов в растворах характеризуются не только спектральными характеристиками, но и другими параметрами, в частности эффективностью таких процессов (степенью связывания).

Если рассматривать липосому ФХ как отдельную частицу  $L$ , то процесс комплексообразования между красителем  $K$  и липосомой  $L$  может быть описан, как равновесная реакция:



где  $KL$  – комплекс липосомы с молекулой красителя,  $K_c$  – константа равновесия, в данном случае, константа связывания.

Для определения константы равновесия процесса комплексообразования анализировались спектры поглощения красителей в водных растворах при добавлении

ФХ разной концентрации [28,29]. Константа связывания  $K_c$  при разных температурах (288 К, 298 К, 308 К, и 318 К) оценивалась с использованием уравнения Скотта в следующем модифицированном виде [30]:

$$\frac{[D][\Phi X]l}{A - A_0} = \frac{[D] + [\Phi X]}{\varepsilon - \varepsilon_0} + \frac{1}{K_c(\varepsilon - \varepsilon_0)}, \quad (2)$$

где  $[D]$  и  $[\Phi X]$  – концентрации красителя и ФХ, соответственно;  $\varepsilon$  и  $\varepsilon_0$  – коэффициент молярной экстинкции красителя связанного и несвязанного с липосомой;  $A$  и  $A_0$  – оптическая плотность раствора красителя, содержащего ФХ и без ФХ, соответственно, измеренная в максимуме поглощения комплекса;  $l$  – длина оптического пути.

Как видно из уравнения (2), константа связывания  $K_c$  может быть определена графически по наклону прямой зависимости  $[D][\Phi X]l/(A - A_0)$  от  $[D] + [\Phi X]$ . На рис.3 а приведено семейство спектров поглощения красителя DiO в водном растворе при увеличении концентрации ФХ.

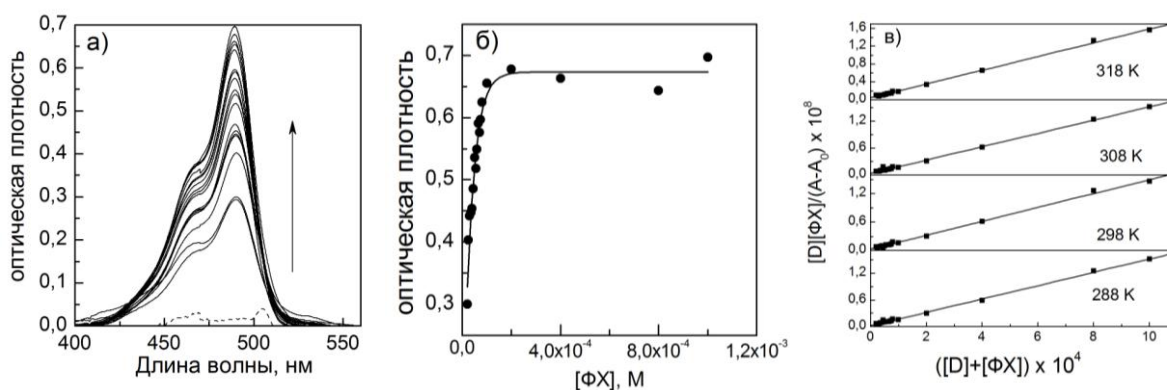


Рис.3 (а) Спектры поглощения красителя DiO в водном растворе при варьировании концентрации ФХ ( $2 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$  М).  $[DiO] = 1 \times 10^{-6}$  М. Пунктиром приведен спектр DiO в воде без ФХ; (б) Изменение оптической плотности водных растворов DiO как функция концентрации ФХ.  $T=298$  К; (в) графическое определение константы связывания красителя DiO с липосомами ФХ при разных температурах и аппроксимация экспериментальных точек уравнением Скотта (прямая линия).

Видно, что добавление в раствор ФХ приводит к восстановлению спектра поглощения DiO и смещению его максимума, что свидетельствует, как уже говорилось выше, о встраивании красителя в липосомы. На рис.3б приведено изменение оптической плотности растворов при увеличении концентрации ФХ. Видно, что увеличение концентрации ФХ приводит к постепенному росту оптической плотности и затем, выше определенной концентрации, кривая зависимости выходит на насыщение, что указывает на то, что весь краситель встроился в липидный бислой липосом. Полученная зависимости  $[D][\Phi X]l/(A - A_0)$  от  $[D] + [\Phi X]$  оказалась прямой линией для при всех температурах (рис.3 в), что является доказательством образования комплекса «краситель – липосома» состава 1:1 [28,29] и позволило получить константу связывания  $K_c$  при разных температурах как тангенс угла наклона прямых. Для красителей DiI и DiD влияние ФХ на спектры поглощения аналогично.

Зависимости  $[D][\Phi X]l/(A - A_0)$  от  $[D] + [\Phi X]$  также являются прямыми линиями (не приводится). Полученные константы связывания для всех красителей при разных температурах приведены в Табл.1.

Таблица 1

Константы связывания и термодинамические параметры комплексообразования «краситель – липосома»

Краситель	T, (K)	$K_c$ , л·мол <sup>-1</sup>	$\Delta G^0$ , кДж·мол <sup>-1</sup>	$\Delta H^0$ , кДж·мол <sup>-1</sup>	$\Delta S^0$ , Дж·мол <sup>-1</sup> град <sup>-1</sup>
DiO	288	$7,16 \times 10^4$	-26,75	-15,64	38,56
	298	$5,0 \times 10^4$	-26,79		37,40
	308	$4,74 \times 10^4$	-27,55		38,66
	318	$3,68 \times 10^4$	-27,78		38,15
DiI	288	$13,6 \times 10^4$	-28,28	-20,71	26,29
	298	$9,4 \times 10^4$	-28,35		25,63
	308	$6,85 \times 10^4$	-28,49		25,26
	318	$6,13 \times 10^4$	-29,13		26,45
DiD	288	$10,0 \times 10^4$	-27,56	-6,71	72,40
	298	$8,38 \times 10^4$	-28,07		71,67
	308	$8,17 \times 10^4$	-28,94		72,19
	318	$7,57 \times 10^4$	-29,68		72,24

Рассчитанные константы связывания для всех красителей имеют довольно большие значения, что говорит о сильном взаимодействии между красителем и липосомой и смещении равновесия в уравнении (1) в сторону образования комплекса *KL*. Увеличение температуры не значительно влияет на процесс комплексообразования, что указывает на прочность образующихся комплексов «краситель – липосома».

Можно также оценить эффективность связывания красителя с липосомами ФХ рассчитав долю связанного красителя ( $f_{mic}$ ), используя полученные из уравнения параметры по следующей формуле [31]:

$$f_{mic} = \frac{\Delta A}{DI(\varepsilon_m - \varepsilon_0)}, \quad (3)$$

Расчеты показали, что для DiO и DiI эта величина составляет 0,999, а для DiD – 0,97. То есть в водном растворе, содержащем липосомы ФХ, практически 100% молекул красителей связано с липосомами.

В общем случае, взаимодействие между катионной гидрофобной молекулой красителя и липосомой цвиттерионного фосфолипида ФХ будет определяться силами гидрофобного, ван-дер-ваальсового и электростатического взаимодействий, вклад которых определяется знаком и величиной термодинамических параметров комплексообразования [32]. Используя значения константы связывания  $K_c$ , полученные для разных температур, можно рассчитать изменение свободной энергии Гиббса ( $\Delta G^0$ ), энтальпию ( $\Delta H^0$ ) и энтропию ( $\Delta S^0$ ) процесса комплексообразования используя выражения [32]:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_c \quad (4)$$

$$\Delta H^0 = \left[ \frac{\partial(\Delta G^0/T)}{\partial(1/T)} \right]_p \quad (5)$$

$$\Delta S^0 = \frac{\Delta H^0 - \Delta G^0}{T} \quad (6)$$

Из уравнения (5) видно, что величина  $\Delta H^0$  может быть получена графически, используя зависимость  $\Delta G^0/T$  от  $1/T$ , которая должна быть прямой линией с наклоном равным  $\Delta H^0$ . Полученные значения термодинамических параметров для всех красителей приведены в Табл.1.

Отрицательные значения изменения свободной энергии Гиббса свидетельствуют о том, что процесс комплексообразования является самопроизвольным энергетически выгодным процессом [32]. Зависимости  $\Delta G^0/T$  от  $1/T$  для всех красителей оказались линейными (рис.4), а полученные значения  $\Delta H^0$  – отрицательными величинами (Табл.1), что указывает на то, что связывание красителей с липосомой – экзотермический процесс.

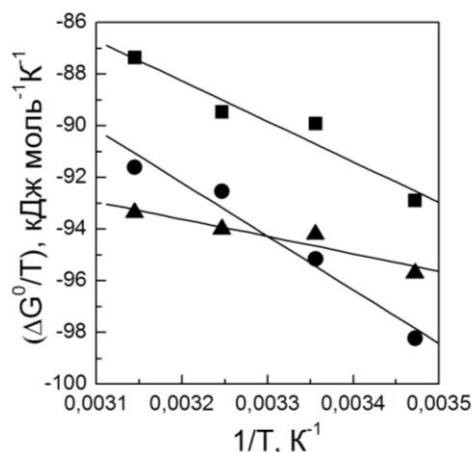


Рис.4. График зависимости  $\Delta G^0/T$  от  $1/T$  для связывания красителя DiO (квадраты), DiI (точки) и DiD (треугольники) с липосомами ФХ.

Изменение энтропии ( $\Delta S^0$ ), рассчитанное по уравнению (6) для всех красителей оказалось положительным (Табл.1). Обычно положительное значение изменения энтропии характерно для процессов, сопровождающихся изменением агрегатного состояния вещества, таких, например, как растворение кристаллических веществ – переход вещества из твердого состояния в жидкое [32]. Подобный процесс происходит и в наблюдаемой нами системе. При связывании красителей, которые в воде образуют нерастворимые ассоциаты, липосомами ФХ, происходит переход красителя из агрегированного состояния в мономерное за счет «растворения» в липидном бислое липосомы.

В работах P.D. Ross [33], M.H. Rahman [34] и соавторов была детально изучена термодинамика процесса взаимодействия различных лигандов (органических молекул) с биологическими макромолекулами (протеинами) [34], а также процессы ассоциации протеинов [33] в растворах. Было показано, что положительное значение  $\Delta S^0$  указывает

на участие гидрофобных взаимодействий в процессе связывания лиганда и протеина [34]. Данный вывод может быть применен и к случаю взаимодействия органического красителя с липосомой ФХ. Для чисто гидрофобного взаимодействия, значения как  $\Delta H^0$ , так и  $\Delta S^0$  должны быть положительными [34]. Отрицательные значения  $\Delta H^0$  указывают на вклад электростатических взаимодействий в процесс комплексообразования «краситель – липосома». Однако для того чтобы этот вклад был заметным, значение изменения энтальпии  $\Delta H^0$  должны быть немного меньше или равно нулю [34]. В нашем случае значения  $\Delta H^0$  существенно меньше нуля. Отрицательные значения изменения энтальпии могут указывать на роль водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий в процессе комплексообразования [33].

В изменение свободной энергии Гиббса ( $\Delta G^0$ ), которой характеризуется процесс комплексообразования, вносят вклад одновременно два противоположных фактора энтропийный ( $T\Delta S^0$ ) и энтальпийный ( $\Delta H^0$ ) [32]:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (7)$$

Для красителей DiO и DiI значения  $|T\Delta S^0| < |\Delta H^0|$ , что означает, что в этом случае движущей силой комплексообразования «краситель – липосома» является изменение энтальпии. Тогда как в случае красителя DiD,  $|T\Delta S^0| > |\Delta H^0|$ , а значит, процесс комплексообразования управляется изменением энтропии. Причина таких отличий в значениях термодинамических параметров для красителя DiD неясна и требует дальнейших исследований. Одной из возможных причин может являться особенность строения молекулы (рис.1). Молекула DiD обладает наиболее длинной полиметиновой цепочкой в флуорофорной части молекулы, по сравнению с молекулами DiO и DiI, что увеличивает гибкость молекулы и возможность вращения ее фрагментов относительно друг друга. В работе [22] на основе анализа кривых затухания анизотропии флуоресценции молекул DiI и DiD в мицеллах ДСН, было показано, что вращение молекулы DiD более свободно, по сравнению с DiI, что объяснялось тем фактом, что из-за особенностей своей структуры в мицеллу может встраиваться только один углеводородный радикал. Подобная ситуация может наблюдаться и в случае липосом ФХ.

## ВЫВОДЫ

Таким образом, исследование изменения оптической плотности водных растворов красителей DiO, DiI, DiD при добавлении фосфолипида ФХ показывает, что в водном растворе происходит образование комплексов «органический краситель – липосома ФХ». Полученные большие значения констант связывания  $K_c$  и доли связанного красителя (0,97 – 0,99 %) говорит, что процесс комплексообразования является очень эффективным. Рассчитанные термодинамические параметры комплексообразования свидетельствуют о том, что этот процесс определяется главным образом силами гидрофобного и ван-дер-ваальсового взаимодействий ( $\Delta S^0 > 0$ ). Влияние электростатических взаимодействий незначительно ( $\Delta H^0 < 0$ ).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hauglang R.P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Products / R.P. Hauglang [9th ed.]. – New York: Molecular probes. – 2002. – 676 p.
2. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов / Г.Е. Добрецов. – М: Наука. – 1989 – 273 с. /Dobrecov G.E. Fluorescentnye zondy v issledovanii kletok, membran i lipoproteinov / G.E. Dobrecov. – М: Nauka. – 1989 – 273 s./



3. Применение карбоцианиновых флуоресцентных зондов для оценки функционального состояния культивированных клеток после криоконсервации / Е.И.Гончарук, Е.В. Онищенко, В.В. Тимон, [и др.] // Биополимеры и клетка. – 2008. – Т. 24, № 3. – С. 225-231. /Primenenie karbocianinovyh fluorescentnyh zondov dlja ocenki funkcional'nogo sostojanija kul'tivirovannyh kletok posle kriokonservacii / E.I.Goncharuk, E.V. Onishhenko, V.V. Timon, [i dr.] // Biopolimery i kletka. – 2008. – t. 24, № 3. – S. 225-231./
4. Накопление оксакарбоцианинов с различной длиной алкильных цепей в клетках костного мозга и гепатоцитах / Ю.В. Малюкин, И.А. Боровой, Н.С. Кавок, [и др.] // Биофизика. – 2007. – Т. 52, № 4. – С. 667-673. /Nakoplenie oksakarbocianinov s razlichnoj dlinoj alkil'nyh cepej v kletkah kostnogo mozga i hepatocitah / Ju.V. Maljukin, I.A. Borovoj, N.S. Kavok, [i dr.] // Biofizika. – 2007. – T. 52, № 4. – S. 667-673./
5. Newly synthesized fluorescent probes, their characteristics and behavior in proliferating cultures / E.I. Goncharuk, I.A. Borovoy, E.V. Pavlovich, [et al.] // Biopolymers and Cell. – 2009. – V.25, № 6. – P. 484-490.
6. Waggoner A.S. Dye indicators of membrane potential / A.S. Waggoner // Ann. Rev. Biophys. Bioeng. – 1979. – V. 8. – 47-68.
7. Generation of a proton motive force by the excretion of metal-phosphate in the polyphosphate-accumulating acinetobacter johnsonii strain 210A / H.W van Veen, T. Abee, G.J Kortstee, [et al.] // J. Biol. Chem. – 1994. – V.269, №47. – P. 29509-29514.
8. Accumulate flow cytometric membrane potential measurement in bacteria using diethyloxycarbocyanine and a ratiometric technique / D. Novo, N.G. Perlmutter, R.H. Hunt, H.M. Shapiro // Cytometry. – 1999. – V. 35. – P. 55-63.
9. Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability, and bacterial counts of staphylococcus aureus and micrococcus luteus / D. Novo, N.G. Perlmutter, R.H. Hunt, H.M. Shapiro // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2000. – V. 44, №4. – P. 827-834.
10. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against Escherichia coli / J. Xu, F. Zhou, B.-P. Ji, [et al.] // Letters in Applied Microbiology. – 2008. – V.47, №3. – P. 174-179.
11. Wiegand D.H. Spectroscopic and Fluorometric Characterization of Oxacyanine Dyes in Water and Nitrobenzene / D. H. Wiegand, P. Vanýsek // Appl. Spectrosc. – 1988. – V. 42. – P. 958-961.
12. Koti A.S.R. Cyanine induced aggregation in meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin anions / A.S.R. Koti, N. Periasamy // Journal of Material Chemistry. – 2002. – V. 12, №8. – P. 2312-2317.
13. Studies on the mechanism by which cyanine dyes measure membrane potential in red blood cells and phosphatidylcholine vesicles / P.J. Sims, A.S. Waggoner, C.H. Wang, J.F. Hoffman // Biochemistry. – 1974. – V. 13. – P.3315-3330.
14. Block copolymer nanostructures / T. Smart, H. Lomas, M. Massignani, [et al.] //NanoToday. – 2008. – V. 3, №3-4. – P. 38-46.
15. Liposomal drug delivery, a novel approach: PLARosomes / A. Kozubek, J. Gubernator, E. Przeworska, M. Stasiuk //Acta Biochimica Polonica. – 2000. – V. 47, №3. –P. 639-649.
16. Liposomal drug delivery systems – clinical applications / P. Goyal, K. Goyal, S.G.V. Kumar, [et al.] // Acta Pharm. – 2005. – V. 55. – P. 1-25.
17. Petros R.A. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic application / R.A. Petros, J.M. DeSimone //Nature Reviews Drug Discovery. – 2010. – V. 9. – P. 615-627.
18. Nishiyama N. Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery / N.Nishiyama, K.Kataoka // Pharmacology and Therapeutics. – 2006. – V. 112. – P. 630-648.
19. Liposomes: a practical approach. – 2<sup>nd</sup> ed. – [ed. by V. Torchilin and V. Weissig]. – Oxford: Oxford Univ. Press. – 2003. – 396 p.
20. Ефимова С.Л. Спектрально-люминесцентные свойства 1,1-диоктадецил-3,3',3'-тетраметилиндодикарбоцианинперхлората в бинарных растворах / С.Л. Ефимова, Ю.В. Малюкин, К. Кемнитц // Журн. прикл. спектр. – 2001. – Т. 68. – С. 569-572. /Efimova S.L. Spektral'no-ljuminiscentnye svojstva 1,1-dioktadecil-3,3',3'-tetrametilindodikarbocianinperhlorata v binarnyh rastvorah / S.L. Efimova, Ju.V. Maljukin, K. Kemnitc // Zhurn. prikl. spektr. – 2001. – T. 68. – S. 569-572./
21. Malyukin Yu.V. Spectroscopy of intermolecular interaction in the system: dye-sodium dodecylsulphate micelle / Yu.V. Malyukin, S.L. Efimova, K. Kemnitz // J. Lumin. – 2001. – 94-95. – P. 239-242.
22. Безызлучательный перенос энергии в композициях карбоцианиновых красителей в нанобъеме мицеллы ПАВ / С.Л. Ефимова, А.В. Сорокин, А.Н. Лебеденко, [и др.] // Журн. прикл. спектр. – 2006. – Т. 73. – С. 152-157. /Bezyzluchatel'nyj perenos jenergii v kompozicijah karbocianinovyh krasitelej v nanoob#eme micelly PAV / S.L. Efimova, A.V. Sorokin, A.N. Lebedenko, [i dr.] // Zhurn. prikl. spektr. – 2006. – T. 73. – S. 152-157./

23. Influence of dye hydrophobicity on the efficiency of fluorescence resonance energy transfer between dyes in surfactant micelles / S.L. Yefimova, A.S. Lebed, G.Ya. Guralchuk, [et al.] // *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* – 2001. – V. 535. – P. 204-211.
24. Влияние гидрофобности катионных карбоцианиновых красителей DiOCn на эффективность связывания с мицеллами поверхностно-активного вещества / А.С. Лебедь, С.Л. Ефимова, Г.Я. Гуральчук, [и др.] // *Журн. прикл. спектр.* – 2010. – Т. 77, №2. – С. 198-203. /Vlijanie gidrofobnosti kationnyh karboisianinovyh krasitelej DiOCn na jeffektivnost' svjazyvanija s micellami poverhnostno-aktivnogo veshhestva / A.S. Lebed', S.L. Efimova, G.Ja. Gural'chuk, [i dr.] // *Zhurn. prikl. spektr.* – 2010. – Т. 77, №2. – С. 198-203./
25. Райхард Х. Растворители в органической химии / Х. Райхард; [пер. с нем. Э.Р. Захса]. – Л.: Химия, 1973. – 152 с. /Rajhard H. Rastvoriteli v organicheskoj himii / H. Rajhard; [per. s nem. Je.R. Zahsa]. – L.: Himija, 1973. – 152 s./
26. Nano-scale liposomal container with a “signal system” for substances delivering in living cells / S.L. Yefimova, A.S. Lebed', G.Ya. Guralchuk, [et al.] // *Biopolymer and Cell.* - 2011. - V. 27(1). – P.47-52.
27. Comparative study of dye-loaded liposome accumulation in sensitive and resistant human breast cancer cells / S.L. Yefimova, I.Yu. Kurilchenko, T.N. Tkacheva, [et al.] // *Experimental Oncology.* - 2012. - V. 34(2). – P. 101-106.
28. Колычев В.Б. Спектроскопические методы в химии комплексных соединений / В.Б. Колычев, В.И. Парамонов; [под редакцией В.М. Вдовенко]. – Л.: Химия, 1964. – с. 30–73. /Kolychev V.B. Spektroskopicheskie metody v himii kompleksnyh soedinenij / V.B. Kolychev, V.I. Paramonov; [pod redakciej V.M. Vdovenko]. – L.: Himija, 1964. – s. 30–73./
29. О.В. Свердлова. Электронные спектры в органической химии. Л.: Химия, 1985. – 248 с. /O.V. Sverdlova. Jelektronnye spektry v organicheskoj himii. L.: Himija, 1985. – 248 s./
30. Bhowmik B.B. Photophysical studies of 3,3' dioctadecyloxycarbocyanine dye in model biological membranes and different solvents / B.B. Bhowmik, S. Basu, D. Ray // *Chemistry and Physics of Lipids.* – 2001. – V. 109. – P. 175-183.
31. Göktürk S. Spectral studies of safranin-O in different surfactant solutions / S. Göktürk, M. Tuncay // *Spectrochimica Acta Part A.* – 2003. – V. 59. – P. 1857-1866.
32. Семиохин И.А. Физическая химия: Учебник / И.А. Семиохин. — Изд-во МГУ, 2001. —. 272 с. /Semiohin I.A. Fizicheskaja himija: Uchebnik / I.A. Semiohin. — Izd-vo MGU, 2001. —. 272 s./
33. Ross P.D. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability / P.D. Ross, S.Subramanian // *Biochemistry.* – 1981. – V. 20. – P. 3096-3102.
34. Study of interaction of carprofen and its enantiomers with human serum albumin-I.Mechanism of binding studied by dialysis an spectroscopic methods / M.H. Rahman, T.Maruyama, T. Okada, [et al.] // *Biochemical Pharmacology.* – 1993. – V. 46(10). – P. 1721-1731.