

УДК 577.345+535.37+543.426

ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ КОМПЛЕКСОВ ТРИКАРБОЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ С БЕЛКАМИ ПЛАЗМЫ КРОВИСАМЦОВ М.П.¹, ТАРАСОВ Д.С.^{1,2}, МАЛЮШКОВА Е.В.², ХЛУДЕЕВ И.И.³, ЛУГОВСКИЙ А.А.¹, СЕМАК И.В.²¹НИУ «Институт прикладных физических проблем имени А.Н. Севченко» БГУ, Курчатова 7, Минск, 220045, Беларусь²Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, Минск, 220030, Беларусь³Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники, Беларусь

Аннотация. В работе приведены результаты исследований комплексобразования трикарбоцианиновых красителей с белками плазмы крови с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Основная полоса поглощения исследованных красителей расположена в ближней ИК-области, что осложняет их визуальное обнаружение на электрофореграмме. В связи с этим детектирование локализации красителей выполнялось по их флуоресценции с помощью лазерного флуоресцентного спектрометра. Для сканирования гелей с координатной привязкой использовано устройство, состоящее из перемещаемой микрометрическими винтами платформы, на которой перпендикулярно плоскости измерения закреплялся держатель световода спектрометра. Сканирование гелей выполнялось до стадии окрашивания и визуализации белков, на которой было обнаружена необратимая деструкция трикарбоцианиновых красителей. Координаты фиксировались относительно границ гелей, что позволило совместить распределение белков и индотрикарбоцианиновых красителей на электрофореграмме. Белки в комплексах с красителями идентифицировались по их молекулярной массе. На примере исследования с помощью гель-электрофореза окрашенных трикарбоцианиновыми красителями растворов человеческой сыворотки крови и бычьего сывороточного альбумина показана возможность обнаружения и идентификации комплексов красителей с белками сыворотки крови. В результате установлено, что трикарбоцианиновые красители с хлорзамещенным ортофениленовым мостиком способны образовывать ковалентные комплексы с альбумином и Аполипопротеин А-I, основным структурным элементом липопротеинов высокой плотности. Показано, что полиэтиленгликоли с молекулярной массой 300 Да на концевых группах красителей не влияют на это свойство.

Ключевые слова: трикарбоцианиновые красители, комплексобразование, белки плазмы крови, гель-электрофорез, лазерная флуоресцентная спектроскопия.

Конфликт интересов. Автор (-ы) заявляют об отсутствии конфликта интересов.

GEL-ELECTROPHORESIS OF COMPLEXES OF TRICARBOCYANINE DYES WITH BLOOD PLASMA PROTEINSM. P. SAMTSOV¹, D. S. TARASOV^{1,2}, E. V. MALIUSHKOVA², I. I. KHLUDEYEV³, A. A. LUGOVSKI¹, I. V. SEMAK²¹A.N Sevchenko Institute for Applied Physical Problems of BSU, 220045 Minsk, Belarus²Belarussian State University, 220030 Minsk, Belarus³Belarusian State University of Informatics and Radioelectronics, 220013 Minsk, Belarus

Abstract. The paper presents the results of studies of the complexation of tricarbocyanine dyes with blood plasma proteins using polyacrylamide gel electrophoresis. The main absorption band of the dyes under study is located in the near-IR region, which complicates their visual detection on an electrophoregram. In this regard, the detection of localization of dyes was carried out by their fluorescence using a laser fluorescence spectrometer. For scanning gels with a coordinate binding, a device was used, which consisted of a platform movable by micrometric screws, on which the spectrometer fiber holder was fixed perpendicular to the measurement plane. Scanning of the gels was performed until the stage of staining and visualization of proteins, at which irreversible destruction of tricarbocyanine dyes was detected. The coordinates were fixed relative to the boundaries of the gels, which made it possible to combine the distribution of proteins and indotricarbocyanine dyes on the electrophoregram. Proteins in complexes with dyes were identified by their molecular weight. On the example of a study using gel electrophoresis of solutions of human serum and bovine serum albumin stained with tricarbocyanine dyes, the possibility of detecting and identifying complexes of dyes with blood serum proteins has been shown. As a result, it was found that tricarbocyanine dyes with a chlorine-substituted orthophenylene bridge are able to form covalent complexes with albumin and Apolipoprotein A-I, the main structural element of high-density lipoproteins. It has been shown that polyethylene glycols with a molecular weight of 300 Da at the end groups of dyes do not affect this property.

Keywords: tricarbocyanine dyes, complexation, blood plasma proteins, gel-electrophoresis, laser-induced fluorescence spectroscopy.

Conflict of interests. The author (-s) declare no conflict of interests.

Введение

Разработка новых материалов и методов в области медицины и биотехнологий является общемировым трендом в направлениях развития научных исследований. Полиметиновые красители (ПК) благодаря широким возможностям структурной модификации стали центральным объектом исследований для различных медико-биологических приложений. В нашей стране исследования в этом направлении выполняются в НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ, где целенаправленно ведется разработка фотосенсибилизаторов (ФС) на основе трикарбоцианиновых красителей для тераностики злокачественных новообразований. По результатам комплексных исследований фотофизических свойств ряда индотрикарбоцианиновых красителей в модельных средах и опухолевых моделях на экспериментальных животных *in vivo* выделен краситель с оптимальными свойствами [1]. Отличительными особенностями его структуры являются наличие хлорзамещенного ортофениленового мостика в цепи сопряжения и двух цепочек полиэтиленгликолей (ПЭГ) с молекулярной массой 300 Да, которые ковалентно связаны с концевыми группами. Структурная модификация с помощью полиэтиленгликолей обеспечило новому фотосенсибилизатору высокую растворимость в воде и биосовместимость.

Эффективность фотосенсибилизатора во много зависит от избирательности накопления в опухолевых тканях. Большое количество исследований посвящено разработкам новых способов адресной доставки препаратов. Одним из путей решения этого вопроса – образование комплексов молекул ФС с носителями, которые обеспечивают эффективное накопление в опухолевых клетках. В этом плане, отдельное внимание заслуживают компоненты плазмы крови – белки и липопротеины в качестве эндогенных переносчиков. В работе [2] с помощью методов спектрофотометрии и эксклюзионной хроматографии показано образование комплексов трикарбоцианиновых красителей с белками плазмы крови. Используемые в этой работе методы не позволяют определить с какими именно белками образуются комплексы, а также не установлен характер связи в них. Электрофоретический метод разделения белков стандартно используется для идентификации белков по их молекулярной массе [3]. Можно ожидать, что комплексы трикарбоцианиновых красителей ковалентно связанные с белками плазмы крови будут обнаруживаться на электрофореграмме в полосах соответствующих белков. В частности, такой подход используется в исследованиях с помощью гель-электрофореза протеинов, окрашенных коммерческими флуоресцентными маркерами на основе полиметиновых красителей Су3 и Су5 [4].

Данная работа посвящена исследованию окрашенной трикарбоцианиновыми красителями сыворотки крови с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

Методика

Основным объектом исследования выступал разработанный в лаборатории спектроскопии НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ симметричный индотрикарбоцианиновый краситель ПК1 (рис. 1), который по многим параметрам перспективен для использования в качестве фотосенсибилизатора для ФДТ [1], а также два близких по структуре красителя – ПК2 и ПК3. У первого по сравнению с ПК1 отсутствуют полиэтиленгликоли на концевых группах, а у второго – хлорзамещенный ортофениленовый мостик.

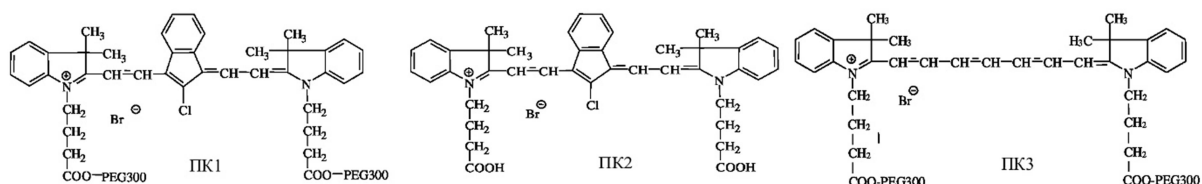


Рис. 1. Структурные формулы исследованных красителей

Fig. 1. Structural formulas of the studied dyes

В качестве модельных сред использовался 5 % раствор сыворотки крови человека (ЧСК), а также раствор бычьего сывороточного альбумина (концентрация белка 2 г/л). Сыворотку крови получали путем свертывания крови и осаждения клеточного сгустка центрифугированием. Альбумин является основным транспортным белком сыворотки крови [5, 6], что обуславливает важность исследований взаимодействия красителей с ним. С другой стороны, это хороший модельный образец с одним типом белка для отработки методики анализа окрашенных красителями белковых растворов.

Растворы готовились в натрий-калиевом фосфатном буфере Дюльбекко (0,14 моль/л) с pH=7,4 (ФСБ). Концентрация белков в анализируемых на электрофорезе образцах составляла порядка 30 мкМ, что обеспечило эффективное обнаружение различных белковых фракций.

Стоковые растворы красителей готовились в ФСБ. Краситель ПК2 обладает низкой растворимостью в воде, в связи с чем стоковый раствор для него готовился с 5 % содержанием этанола. Исследования проводились при двух концентрациях красителей – 30 мкМ и 10 мкМ.

Спектры поглощения регистрировались с помощью спектрофотометра Solar PV1251. Люминесцентные характеристики изучались с помощью спектрофлуорометра Fluorolog. В отдельных экспериментах использовался лазерный флуоресцентный спектрометр с длиной волны возбуждающего лазера 684 нм [7]. Подвод возбуждающего излучения к исследуемому образцу и свечения флуоресценции в полихроматоре осуществлялся с помощью оптоволоконка.

Анализ связывания красителей с белками в растворах ЧСК и БСА выполнялся с помощью электрофореза белков по методу Лэмбли в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях (SDS-PAGE). Электрофоретическое разделение белков проводили в 15 % полиакриламидном геле в диссоциирующих условиях.

Основная полоса поглощения исследуемых красителей располагается в области 700-800 нм, что затрудняет визуальное обнаружение локализации исследованных красителей на электрофореграмме. В связи с этим, для анализа расположения молекул красителей в белковых фракциях в результате гель-электрофореза использовано устройство, которое состоит из перемещаемой микрометрическими винтами платформы. На платформе перпендикулярно плоскости измерения закрепляли держатель световода лазерного флуоресцентного спектрометра. Координаты локализации молекул красителей в составе белков определяли по устойчивому превышению сигнала флуоресценции красителей по сравнению с фоновым при перемещении светоколлектора вдоль белковых полос на электрофореграмме. В связи с тем, что на стадии окрашивания используются агрессивные среды, которые приводят к необратимой деструкции индотрикарбоцианиновых красителей, места локализации красителей на электрофореграмме определяли до начала процедуры окрашивания и визуализации полос белков. В обоих случаях координаты фиксировались относительно границ гелей, что позволило совместить распределение белков и индотрикарбоцианиновых красителей на электрофореграмме. Отсутствие деструкции красителей на стадии электрофоретического разделения белков подтверждена спектральными измерениями при моделировании соответствующих условий в кювете.

После детектирования красителя осуществляли осаждение белков в геле с помощью 30% раствора трихлорукусной кислоты. Далее проводили окрашивание раствором Кумасси. После окрашивания, гель отмывали 7% уксусной кислотой до полного обесцвечивания фона.

Имеющееся в распоряжении оборудование позволяет исследовать на одной электрофореграмме до 9 образцов. Для определения молекулярной массы белков в одну из лунок вносили набор белков стандартов с известными молекулярными массами – от 10 кДа до 200 кДа. Полученные визуализированные электрофореграммы исследуемых образцов фиксировались с помощью фотоаппарата, и на снимки переносились координаты обнаружения красителей.

Результаты и их обсуждение

Спектральные характеристики красителей в фосфатно-солевом буфере определяются процессом агрегации молекул в водном окружении. В водном окружении гидрофобный краситель ПК2 без ПЭГ склонен к сильной агрегации по Н- и J-типу в зависимости от концентрации красителя, pH рас-

творя и температуры [8]. В спектрах поглощения его растворов в ФСБ обнаруживаются полосы, соответствующие мономерам, Н- и J-агрегатам (рис. 2). Максимум полосы мономеров располагается вблизи 707 нм. Краситель ПК1 гидрофильный [9], его растворы в ФСБ представляют собой равновесную смесь мономеров и димеров Н-типа. Максимум поглощения мономеров располагается на длине волны 708 нм. Следует отметить, что при одинаковой концентрации краситель ПК1 в ФСБ агрегирован в меньшей степени по сравнению с его прекурсором без ПЭГ – ПК2. Анализ спектрально-люминесцентных свойств ПК3 в растворах в ФСБ позволяет утверждать, что его молекулы находятся преимущественно в форме мономеров (максимум поглощения – 746 нм).

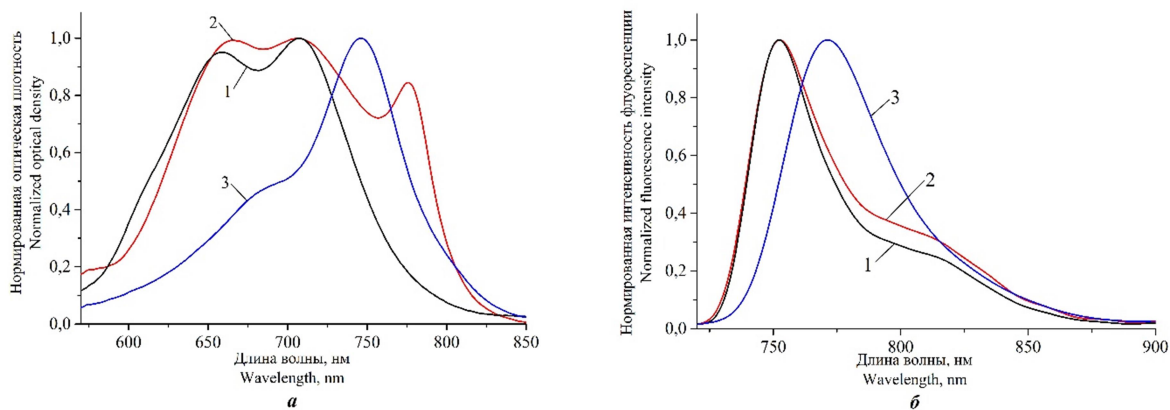


Рис. 2. Спектры поглощения (*а*) и флуоресценции (*б*) при возбуждении излучением с длиной волны 684 нм растворов трикарбоцианиновых красителей (10 мкМ) в натрий-калиевом фосфатном буфере Дюльбекко (0,14 моль/л) с рН=7,4: 1 – ПК1; 2 – ПК2; 3 – ПК3

Fig. 2. Absorption (*a*) and fluorescence (*b*) spectra with excitation by radiation with a wavelength of 684 nm of solutions of tricarbocyanine dyes (10 μ M) in Dulbecco's sodium-potassium phosphate buffer (0.14 mol/L) with pH = 7.4: 1 – PD1; 2 – PD2; 3 – PD3

Спектральные параметры растворов ПК1 и ПК2 в присутствии белковых молекул сыворотки крови (рис. 3) резко отличаются от таковых в ФСБ: наблюдается смещение максимума поглощения (ПК1 – 723 нм, ПК2 – 730 нм) и флуоресценции (ПК1 – 757 нм, ПК2 – 757 нм) в длинноволновую область, уменьшается поглощение в полосе агрегатов, возрастает квантовый выход и время жизни флуоресценции. Подобное батохромное смещение положения спектров для данных красителей наблюдается при переходе от полярных растворителей к малополярным. Следовательно, в растворах с сывороткой крови молекулы красителей находятся в окружении с более низкой полярностью вследствие образования комплексов с белковыми молекулами. При эквимольной концентрации белков и красителей (30 мкМ) в основной полосе поглощения наряду с интенсивной полосой мономеров наблюдается и полоса ассоциатов красителя. В растворах с меньшей концентрацией красителей (10 мкМ) при сохранении концентрации белков \sim 30 мкМ уменьшается поглощение в полосе ассоциатов (коротковолновый край основной полосы), точное определение степени ассоциации красителей требует более детальных исследований. Для анализа окрашенных красителями растворов ЧСК с помощью электрофореза важно учитывать, что связывание молекул красителей происходит в мономерной и агрегированной формах.

Не обнаружено влияние белков сыворотки крови на спектрально-люминесцентные свойства ПК3, у которого отсутствует хлорзамещенный ортофениленовый мостик на полиметиновой цепи сопряжения.

Характерное время образования комплексов красителей ПК1 и ПК2 с белками в растворах ЧСК и БСА удалось оценить путем измерения спектров флуоресценции с помощью лазерного флуоресцентного спектрометра. При добавлении ЧСК или БСА в ФСБ происходит смещение в длинноволновую область спектра флуоресценции данных красителей в пределах времени регистрации сигнала спектрометром (200-500 мс). С течением времени после введения наблюдается медленная де-

формация спектров поглощения и флуоресценции – смещение в длинноволновую область, которая наиболее выражена у ПК1. Скорость данного процесса зависит от температуры, при комнатной температуре (~20 °С) выход на квазистационарное состояние занимает ~24 часов, при 37 °С ~100-140 минут [2]. В связи с этим исследования на электрофорезе проводились для двух серий образцов: при комнатной температуре (22 °С) и при инкубации в течение 120 минут при 37 °С.

В результате сканирования лазерным флуоресцентным спектрометром гелеэлектрофореграммы обнаружено несколько позиций с выраженным сигналом, близким по спектральному составу с сигналом флуоресценции исследованных красителей. На фотографиях гелей после окрашивания эти позиции отмечены метками (рис. 4). В пределах полос, соответствующих движению белков не окрашенных красителями не наблюдаться никакого свечения при возбуждении лазером с длиной волны 684 нм.

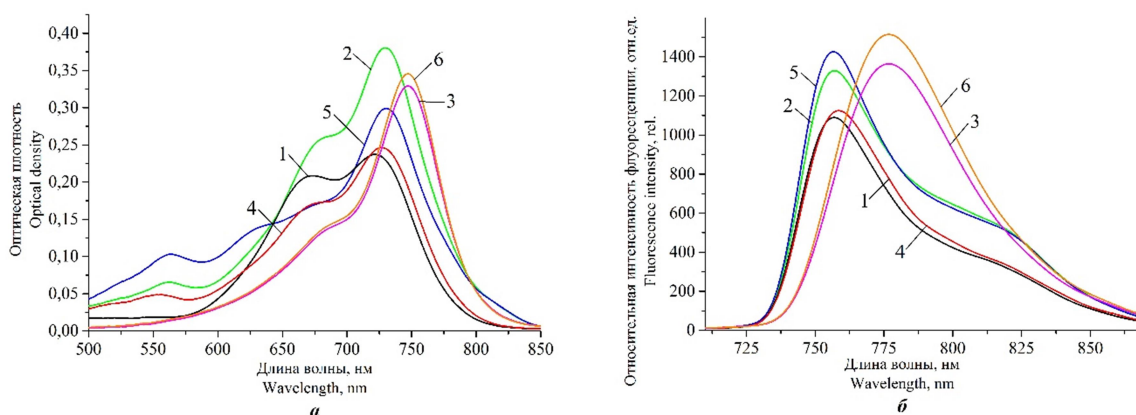


Рис. 3. Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) при возбуждении излучением с длиной волны 684 нм растворов трикарбоцианиновых красителей (30 мкМ) в ЧСК для денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле:

1 – ПК1, 22 °С; 2 – ПК2, 22 °С; 3 – ПК3, 22 °С; 4 – ПК1, 37 °С; 5 – ПК2, 37 °С; 6 – ПК3, 37 °С

Fig. 3. Absorption (a) and fluorescence (b) spectra with excitation by radiation with a wavelength of 684 nm of solutions of tricarbocyanine dyes (30 μM) in HBS for denaturing electrophoresis in polyacrylamide gel:

1 – PD1, 22 °С; 2 – PD2, 22 °С; 3 – PD3, 22 °С; 4 – PD1, 37 °С; 5 – PD2, 37 °С; 6 – PD3, 37 °С

Прежде всего, следует обратить внимание на сигнал флуоресценции вблизи полосы белков с молекулярной массой (72±4) кДа в образцах окрашенных красителями ПК1 и ПК2 растворов БСА. Сигнал флуоресценции наблюдали для двух серий: без и с инкубацией при 37 °С в течение 2 часов. Молекулярная масса бычьего сывороточного альбумина – 69 кДа, учитывая пространственное разрешение сканирующей системы, можно утверждать, что флуоресценция в данной области соответствует ковалентным комплексам ПК1 и ПК2 с альбумином.

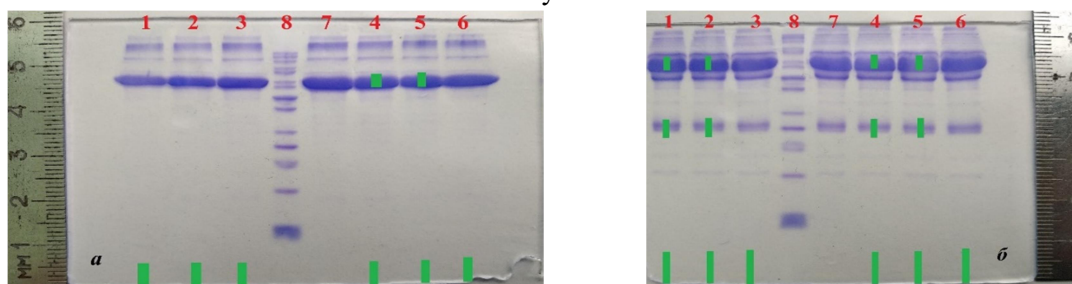


Рис. 4. Электрофореграммы окрашенных трикарбоцианиновыми красителями растворов БСА (а) и ЧСК (б): 1 – ПК1, 22 °С; 2 – ПК2, 22 °С; 3 – ПК3, 22 °С; 4 – ПК1, 37 °С; 5 – ПК2, 37 °С; 6 – ПК3, 37 °С; 7 – раствор без красителей; 8 – набор белков стандартов с известными молекулярными массами

Fig. 4. Electropherograms of BSA (a) and HBS (b) solutions stained with tricarbocyanine dyes: 1 – PD1, 22 °С; 2 – PD2, 22 °С; 3 – PD3, 22 °С; 4 – PD1, 37 °С; 5 – PD2, 37 °С; 6 – PD3, 37 °С; 7 – solution without dyes; 8 – set of protein standards with known molecular weights

Выраженный сигнал флуоресценции ПК1 и ПК2 вблизи полосы альбумина человека (66,5 кДа) также обнаружен на электрофореграмме образцов в растворах ЧСК – (68±4) кДа. В работах [10-12] отмечали способность к образованию ковалентного комплекса с альбумином красителей с хлором в мезоположении. Наиболее вероятный путь – это взаимодействие с единственным свободным остатком Cys34 в молекуле САЧ с замещением мезо-S1 в молекуле красителя [12].

Интенсивность флуоресценции в пределах линии альбумина для образцов, которые инкубировались при 37 °С в течение 2 часов, приблизительно в 4 раза больше по сравнению с образцами без инкубации. Это подтверждает растянутый во времени процесс образования вторичных комплексов.

Для всех красителей обнаружен интенсивный сигнал флуоресценции на нижнем краю геля. Согласно экстраполяции стандарта, молекулярная масса объектов в этой области, соответствует приблизительно 1,5-6,0 кДа. При этом после окрашивания геля здесь не обнаруживаются визуальное присутствие каких-либо белков. Молекулярная масса исследованных красителей: ПК154 – 740 Да, ПК220 – 1270 Да, ПК222 – 1117 Да. Учитывая точность определения координаты, справедливо утверждать, что в данной области обнаруживаются несвязанные с белками красители.

В пределах полос движения образцов ПК1 и ПК2 в ЧСК также обнаружен сигнал флуоресценции красителя вблизи линии белков с молекулярной массой (25±3) кДа, где располагается полоса Аполипротеина А-I (АроА-1, 24,7 кДа). Данный белок является основным структурным элементом липопротеинов высокой плотности (ЛВП) [13]. В работе [14] показано, что при гель-электрофорезе в полиакриламидном геле данный белок наблюдается для ЛВП всех типов и наблюдаются следовые количества у липопротеинов низкой плотности (ЛНП). Основным структурным элементом ЛНП является Аполипротеин В (АроВ). В человеческой плазме существует в двух основных изоморфных формах АроВ-100 (550 кДа) и АроВ-48 (264 кДа) и в условиях денатурирующего гель-электрофореза аполипротеины В наблюдаются на электрофореграммах в соответствующих белковых полосах [15]. Однако в настоящей работе использовался электрофорез с параметрами разделяющего раствора для диапазона молекулярных масс 10-200 кДа.

Постоянство спектральных параметров ПК3 в растворах с белками сыворотки крови, а также то обстоятельство, что при электрофоретическом разделении окрашенных данным красителем растворов ЧСК и БСА достоверный сигнал флуоресценции обнаружен только в области несвязанного с белками красителя, подтверждают отсутствие связывания ПК3 с белками. Данное обстоятельство позволяет утверждать, что ковалентное связывание трикарбоцианиновых красителей с альбумином и липопротеинами высокой плотности сыворотки крови происходит с участием хлорзамещенного ортофениленового мостика. Полиэтиленгликоли с молекулярной массой 300 Да не влияют на эффективность образования трикарбоцианиновыми красителями ковалентных комплексов альбумином и липопротеинами высокой плотности.

Заключение

Таким образом, на примере исследования с помощью гель-электрофореза окрашенных трикарбоцианиновыми красителями растворов человеческой сыворотки крови и бычьего сывороточного альбумина показана возможность обнаружения и идентификации комплексов красителей с белками сыворотки крови. Установлено, что трикарбоцианиновые красители с хлорзамещенным ортофениленовым мостиком способны образовывать ковалентные комплексы с альбумином и липопротеинами высокой плотности. Показано, что полиэтиленгликоли с молекулярной массой 300 Да на концевых группах не влияют на это свойство.

Список литературы

1. Lugovski A. A., Samtsov M. P., Kaplevsky K. N., et al. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2016;316:31-36.
2. Белько Н. В., Хлудеев И. И., Зорин В. П., и др. Влияние комплексообразования с белками плазмы крови на спектральные характеристики трикарбоцианиновых красителей. *Весці БДПУ. Серыя 3. Фізіка. Матэматыка. Інфарматыка. Біялогія. Геаграфія*. 2018;1:14-20.
3. Editor: Names B. D. *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*. 197. Oxford: OUP; 1998.

4. Hamada A., Sharma R., S. S. Du Plessis, et al. Two-dimensional differential in-gel electrophoresis–based proteomics of male gametes in relation to oxidative stress. *Fertility and sterility*. 2013;99(5):1216-1226.
5. Tillement J. P., Houin G., Zini R., et al. The binding of drugs to blood plasma macromolecules: Recent advances and therapeutic significance. *Adv. Drug Res.* 1984;13:59–94.
6. Quinlan G. J., Martin G. S., Evans T. W. Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology*. 2005; 41(6):1211-1219.
7. Ермалицкий Ф. А., Радько А. Е., Каплевский К. Н., и др. Спектрометрический комплекс для фотохимиотерапии с мощным светодиодом. *Лазерная и оптико-электронная техника*. 2008:254-263.
8. Белько Н. В., Самцов М. П., Луговский А. П. Управление H^{*}- и J-агрегацией индотрикарбocyанинового красителя в водных растворах неорганических солей. *Журнал Белорусского государственного университета. Физика*. 2020;2:19-27.
9. Тарасов Д. С., Каплевский К. Н., Самцов М. П., и др. Анализ спектральных свойств многокомпонентных растворов нового индотрикарбocyанинового красителя. *Вестник БГУ. Сер.1*. 2015;2:8-12.
10. Кузьмин В. А., Дурандин Н. А., Лисицына Е. С., и др. Спектрально-кинетические характеристики комплексообразования между индотрикарбocyанином и альбумином. *Докл. РАН*. 2015;462(2):182-184.
11. Awasthi K., Nishimura G. Modification of near-infrared cyanine dyes by serum albumin protein. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2011;10(4):461-463.
12. Usama S.M., Lin C-M., Burgess K. On the Mechanisms of Uptake of Tumor-Seeking Cyanine Dyes. *Bioconjugate Chem.* 2018;29 (11):3886-3895.
13. van der Vorst E. P. C. High-density Lipoproteins and Apolipoprotein A1. Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins. *Springer, Cham*. 2020;94:399-420.
14. Cameron S. J., Morrell C. N., Bao C., A novel anti-inflammatory effect for high density lipoprotein. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144372.
15. Kim J. Y., Kim S. M., Kim S. J., et al. Consumption of policosanol enhances HDL functionality via CETP inhibition and reduces blood pressure and visceral fat in young and middle-aged subjects. *International journal of molecular medicine*. 2017;39(4):889-899.

References

1. Lugovski A. A., Samtsov M. P., Kaplevsky K. N., et al. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2016;316:31-36.
2. Bel'ko N. V., Khludeyev I. I., Zorin V. P., et al. Influence of complexation with blood plasma proteins on the spectral characteristics of tricarbocyanine dyes. *Vesci BDPU. Seryya 3. Fizika. Matematyka. Infarmatyka. Biyalogiya. Geagrafiya*. 2018;1:14-20. (In Russ.)
3. Editor: Hames B. D. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. 197. Oxford: OUP; 1998.
4. Hamada A., Sharma R., S. S. Du Plessis, et al. Two-dimensional differential in-gel electrophoresis–based proteomics of male gametes in relation to oxidative stress. *Fertility and sterility*. 2013;99(5):1216-1226.
5. Tillement J. P., Houin G., Zini R., et al. The binding of drugs to blood plasma macromolecules: Recent advances and therapeutic significance. *Adv. Drug Res.* 1984;13:59–94.
6. Quinlan G. J., Martin G. S., Evans T. W. Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology*. 2005; 41(6):1211-1219.
7. Ermalickij F. A., Rad'ko A. E., Kaplevskij K. N., et al. Spectrometric complex for photochemotherapy with a powerful LED. *Lazernaya i optiko-elektronnaya tekhnika*. 2008:254-263. (In Russ.)
8. Bel'ko N. V., Samcov M. P., Lugovskij A. P. Management of H^{*}- and J-aggregation of indotricarbocyanine dye in aqueous solutions of inorganic salts. *Journal of the Belarusian State University. Physics*. 2020;2:19-27. (In Russ.)
9. Tarasov D. S., Kaplevskij K. N., Samcov M. P., et al. Analysis of spectral properties of multicomponent solutions of the new indotricarbocyanine dye. *Vestnik BGU. Ser.1*. 2015;2:8-12. (In Russ.)
10. Kuz'min V. A., Durandin N. A., Lisicyna E. S., et al. Spectral and kinetic characteristics of complexation between indotricarbocyanine and albumin. *Dokl. RAN*. 2015;462(2):182-184. (In Russ.)
11. Awasthi K., Nishimura G. Modification of near-infrared cyanine dyes by serum albumin protein. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2011;10(4):461-463.
12. Usama S.M., Lin C-M., Burgess K. On the Mechanisms of Uptake of Tumor-Seeking Cyanine Dyes. *Bioconjugate Chem.* 2018;29 (11):3886-3895.
13. van der Vorst E. P. C. High-density Lipoproteins and Apolipoprotein A1. Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins. *Springer, Cham*. 2020;94:399-420.

14. Cameron S. J., Morrell C. N., Bao C., A novel anti-inflammatory effect for high density lipoprotein. PLoS One. 2015;10(12):e0144372.

15. Kim J. Y., Kim S. M., Kim S. J., et al. Consumption of policosanol enhances HDL functionality via CETP inhibition and reduces blood pressure and visceral fat in young and middle-aged subjects. International journal of molecular medicine. 2017;39(4):889-899.

Вклад авторов

Самцов М.П. и Тарасов Д.С. осуществили подготовку и проведение экспериментов, выполнили анализ полученных результатов, оформили рукопись статьи. Луговский А. А. осуществлял синтез исследованных трикарбоцининовых красителей. Хлудеев И.И. участвовал в проведении отдельных экспериментов *in vitro* по установлению свойств трикарбоцианиновых красителей в присутствии белков. Малюшкова Е.В. и Семак И.В. участвовали в организации и проведении исследований растворов красителей с белками плазмы крови с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

Authors contribution

Samtsov M.P. and Tarasov D.S. carried out the preparation and conduct of experiments, performed an analysis of the results obtained, and drafted the manuscript of the article. Lugovski A.A. carried out the synthesis of the investigated tricarbocinin dyes. Khludeyev I.I. participated in conducting several *in vitro* experiments to establish the properties of tricarbocyanine dyes in the presence of proteins. Maliushkova E.V. and Semak I.V. participated in organizing and conducting research on solutions of dyes with blood plasma proteins using polyacrylamide gel electrophoresis.

Сведения об авторах

М. П. Самцов, доктор физико-математических наук, доцент, заведующий лабораторией спектроскопии НИИ ПФП им. А. Н. Севченко БГУ;

Д. С. Тарасов, кандидат физико-математических наук, научный сотрудник лаборатории спектроскопии НИИ ПФП им. А. Н. Севченко БГУ;

Е. В. Малюшкова, научный сотрудник кафедры биохимии БГУ;

И. И. Хлудеев, кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры инженерной психологии и эргономики Белорусского государственного университета информатики и радиоэлектроники; А. А. Луговский, кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории спектроскопии НИИ ПФП им. А. Н. Севченко БГУ;

И. В. Семак, кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой биохимии БГУ.

Information about the authors

M. P. Samtsov, Doctor of Physics and Mathematics, associate professor, Head of the Spectroscopy Laboratory of A.N Sevchenko Institute of Applied Physical Problems of BSU;

D. S. Tarasov, PhD (Physics and Mathematics), Researcher of the Spectroscopy Laboratory of A.N Sevchenko Institute of Applied Physical Problems of BSU;

E. V. Maliushkova, Researcher of the Department of Biochemistry BSU;

I. I. Khludeyev, PhD (Biology), associate professor, associate professor of Belarusian State University of Informatics and Radioelectronics;

A. A. Lugovski, PhD (Chemistry), associate professor, Researcher of the Spectroscopy Laboratory of A.N Sevchenko Institute of Applied Physical Problems of BSU;

I. V. Semak, PhD (Biology), associate professor, Head of the Department of Biochemistry BSU.

Адрес для корреспонденции

220045, Беларусь, Минск, Курчатова, 7, НИУ «Институт прикладных физических проблем имени А.Н. Севченко» БГУ

тел. номер: 8-017-212-41-44, 8-029-879-25-04

e-mail: dmitrij-tarasov@list.ru

Тарасов Дмитрий Сергеевич

Address for correspondence

220045 Minsk, Belarus, Kyrchatov Str. 7, A.N Sevchenko Institute for Applied Physical Problems of BSU

tel. number: 8-017-212-41-44, 8-029-879-25-04

e-mail: dmitrij-tarasov@list.ru

Tarasov Dmitrij Sergeevich