

Дослідження серії моно- і триметинціанінових барвників як флуоресцентних зондів для визначення фібрилярного β -лактоглобуліну

К.Д. Волкова¹, В.Б. Ковальська¹, А.О. Баланда¹, Ю.Л. Сломінський²,
О.І. Толмачов², В. Субраманіам³, С.М. Ярмолюк^{1*}

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
вул. Акад. Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

² Інститут органічної хімії НАН України
вул. Мурманська, 5, Київ, 02094, Україна

³ MESA+ Інститут нанотехнологій, Університет Твенте, Нідерланди

Резюме. З метою дослідження ціанінових барвників як флуоресцентних зондів для визначення амілоїдних фібрил вивчено спектрально-люмінесцентні властивості серії моно- і триметинціанінів у вільно-му стані та у присутності нативного і фібрилярного модельного білка β -лактоглобуліну. Досліджено залежність між хімічною будовою барвника та його здатністю специфічно підвищувати інтенсивність флуоресценції у присутності амілоїдних фібрил. Показано, що як для моно-, так і для триметинціанінів присутність аміногрупи в бензотіазольному гетероциклі збільшує інтенсивність флуоресценції барвників у присутності фібрил β -лактоглобуліну. З'ясовано, що введення замісників до поліметинового ланцюга триметинціанінів підвищує «чутливість» барвників до агрегованої форми β -лактоглобуліну. Триметинціаніни L-5, SH-21252 і монометинціанін T-414 у присутності агрегованого β -лактоглобуліну демонструють істотне (до 24 разів) специфічне зростання інтенсивності флуоресценції і можуть бути запропоновані як зонди для визначення фібрилярних білків, зокрема β -лактоглобуліну.

Ключові слова: ціанінові барвники, амілоїдні білки, флуоресцентні зонди.

Вступ. Критичним етапом розвитку нейродегенеративних розладів, до яких належать хвороби Альцгеймера і Паркінсона, є накопичення в мозку людини нерозчинних агрегатів білкової природи, так званих амілоїдних фібрил. У літературі фібрили описані як довгі (~100-1000 нм) нерозгалужені філаменти. Незважаючи на те, що фібрили можуть утворюватися білками різного амінокислотного складу, для них характерна β -складчастість просторової структури [1-4].

Амілоїдні фібрили, як правило, визначають за допомогою флуоресцентних барвників — Тіофлавіну Т [5-6] чи Конго Ред [7-9]. Ці сполуки специфічно підвищують інтенсивність флуоресценції і змінюють положення максимумів збудження та емісії у присутності фібрилярних протеїнів. Окрім Тіофлавіну Т і Конго Ред, на сьогодні існує обмежена кількість барвників, які селективно розпізнають β -складчасті амілоїдні фібрили. Однак відомі на сьогодні флуоресцентні барвники мають певні недоліки, зокрема низьку відтворюваність результатів (Тіофлавін Т), яка ускладнює кількісне визначення агрегованого протеїну, та низьку специфічність зв'язування з фібрилами [10]. До того ж барвник Конго Ред зв'язується не

*Corresponding author.

Tel./fax: +38044-5222458

E-mail address: sergiy@yarmoluk.org.ua

© К.Д. Волкова, В.Б. Ковальська, А.О. Баланда, Ю.Л. Сломінський,
О.І. Толмачов, В. Субраманіам, С.М. Ярмолюк, 2008

лише з амілоїдними утвореннями, а й з деякими мономерними α -спіральними білками [11].

Отже, існує потреба в розробці нових високочутливих флуоресцентних барвників, що специфічно зв'язуються з амілоїдними утвореннями. Такі барвники можуть бути застосовані для вивчення морфології та кінетики фібрилогенезу *in vitro*, а в подальшому — для виявлення потенційних активаторів та інгібіторів процесу агрегатоутворення.

Деякі білки, що не пов'язані з патогенезом нейродегенеративних захворювань, також можуть агрегувати, утворюючи амілоїд-подібні фібрили. До них належить білок сироватки молока β -лактоглобулін (БЛГ), який за певних умов формує β -складчасті філаменти [12]. Фібрили БЛГ за властивостями й морфологією подібні до амілоїдних фібрил, які утворюються при нейродегенеративних захворюваннях, тому агрегований БЛГ є одним із найбільш розповсюджених комерційно доступних модельних білків для дослідження процесу фібрилогенезу [13].

Основним завданням нашої роботи було дослідження можливості використання низки моно- і триметинціанінових барвників для специфічної флуоресцентної детекції амілоїдних фібрил. З цією метою вивчалися спектрально-люмінесцентні властивості серії моно- і триметинціанінових барвників похідних бензотіазолу у вільному стані та у присутності нативного (мономерного) і фібрилярного модельного білка БЛГ. Також було досліджено залежність між хімічною будовою барвника та його здатністю специфічно підвищувати інтенсивність флуоресценції у присутності амілоїдних фібрил.

Матеріали і методи. Реагенти. HEPES, мономерний β -лактоглобулін, барвники TO, PO і Тіофлавін Т було отримано із «Sigma-Aldrich» (США). Монометинціаніновий барвник L-43 синтезовано згідно з [14], Суан-40 — згідно з [15], SH-21305 — згідно з [16]. Триметинціаніни T-33 і T-364 отримано відповідно до [17]. Триметинціаніни T-248, у ході синтезу якого було використано алкілювання п-толуолсульфамінопохідного етиленхлоргідрином, і T-336 одержано подібно до T-364, а T-165 — подібно до його незаміщеного у хромофор аналога [17] із

застосуванням ортооцтового ефіру замість ортомурашиного. Монометинціанін T-414 одержано подібно до незаміщеного аналога [14] із використанням попереднього захисту аміногрупи тозилуванням із подальшим омиленням тозильного похідного барвника, як описано в [17]. Триметинціанінові барвники L-34, L-16, L-5, L-22 і SH-21252 синтезовано за методиками, наведеними у [18-19].

Спектрально-люмінесцентні дослідження. Для реєстрації спектрів флуоресценції та збудження флуоресценції використовували флуоресцентний спектрофотометр «Сary Eclipse» («Varian», Австралія). Виміри проводились у кварцовій кюветі (10x10 мм). Для збудження флуоресценції використовували випромінювання ксенонової лампи (150 Вт). Довжину хвилі збудження флуоресценції вважали рівною довжині хвилі максимуму смуги збудження флуоресценції барвника у відповідному розчині. Похибка визначення довжини хвилі флуоресценції та збудження флуоресценції становила 1 нм.

Отримання фібрилярного БЛГ. Мономерний β -лактоглобулін розчиняли в деіонізованій воді (концентрація білка 790 мкМ), доводили рН до 2,0, додаючи невеликі об'єми 1 М HCl, та інкубували при 80 °С за постійного перемішування (300 обертів на хвилину) у скляних пробірках на 500 мкл у термоміксері («Eppendorf»). Загальний об'єм реакційної суміші в кожній пробірці становив 500 мкл. Кожну реакцію агрегації здійснювали у трьох повтореннях. Процес фібрилоутворення вважався завершеним, коли зі збільшенням часу інкубації інтенсивність флуоресценції Тіофлавіну Т не збільшувалася (приблизно 3 год). Наявність фібрил підтверджено методом атомної силової мікроскопії.

Приготування стокових розчинів. Стокові розчини барвників (2×10^{-3} М) готували, розчиняючи наважки барвників у диметилсульфоксиді (ДМСО). Стоковий розчин мономерного БЛГ готували, розчиняючи його наважку у 10 мМ Tris-HCl буфері (рН 7,4). Концентрація мономерного і фібрилярного БЛГ у розчині становила 790 мкМ.

Приготування робочих розчинів. Робочі розчини барвників готували, розводячи стокові розчини барвників у буфері. Концент-

Спектральні характеристики монометинціанінових барвників у вільному стані та у присутності β -лактоглобуліну

Барвник	Структура	Вільний барвник			БЛГ [М]		БЛГ [Ф]		
		$\lambda_{\text{збф}}, \text{нм}$	$\lambda_{\text{ем}}, \text{нм}$	I_0	$\lambda_{\text{ем}}, \text{нм}$	$I_M, \text{у.о.}$	$\lambda_{\text{ем}}, \text{нм}$	$I_{\text{Ф}}, \text{у.о.}$	$I_{\text{Ф}}/I_M$
L-43		400	478	34,4	475	37	472	139	3,8
T-414		438	520	3,3	525	7,4	532	114	16,4
PO		447	475	1,43	475	2,56	475	32,5	12,7
Цуан 40		440	470	7,24	470	12,2	470	81	6,64
SH-21305		470	558	0,66	560	2,04	554	21,4	9,7
ТО		500	530	1,08	530	5,7	535	40,5	7,1
Тіо-Т		442	480	1,2	479	3,3	479	23,8	7,2

Примітки: $\lambda_{\text{збф}}$ ($\lambda_{\text{ем}}$) — максимум збудження флуоресценції (максимум емісії) барвника; I_0 — інтенсивність флуоресценції барвника в буфері; I_M ($I_{\text{Ф}}$) — інтенсивність флуоресценції барвника у присутності мономерного (фібрилярного) білка; $I_{\text{Ф}}/I_M$ — співвідношення значення інтенсивності емісії барвника у присутності фібрилярного БЛГ до значення інтенсивності емісії у присутності мономерного білка.

рація барвників і БЛГ у робочих розчинах становила відповідно 5×10^{-6} і $7,9 \times 10^{-6}$ М.

Результати й обговорення. Спектрально-люмінесцентні властивості монометинціанінових барвників в індивідуальному стані та у присутності БЛГ. Спектральні характеристики монометинціанінових барвників, що містять бензотіазольне, хінолінове і пиридинове гетероциклічні ядра у вільному стані та у присутності мономерного та фібрилярного БЛГ, представлено в табл. 1. Флуоресцентний барвник Тіофлавін Т (Тіо-Т), що широко застосовується для визначення амілоїдних утворень, використовували для порівняння.

Максимуми спектрів збудження тіа- і тіапиридомонометинціанінів у вільному стані в буфері розташовані між 400 і 447 нм. Для

тіахіномонометинціанінів SH-21305 і ТО максимуми $\lambda_{\text{збф}}$ знаходились у межах 470-500 нм. Для всіх цих барвників максимуми спектрів емісії розміщені між 470-558 нм.

Для більшості барвників у вільному стані спостерігали низькі значення інтенсивності флуоресценції (I_0) — 0,66-7,2 у.о. (табл. 1). Для симетричного бензотіазольного барвника L-43 інтенсивність емісії ($I_0 \sim 34$ у.о.) була дещо вищою, ніж для решти барвників.

Максимуми збудження та флуоресценції монометинціанінів у присутності мономерного БЛГ залишалися незмінними чи зсувалися у довгохвильову область спектра на 2-10 нм відносно відповідних максимумів вільних барвників у буфері.

У присутності мономерного БЛГ інтен-

Спектрально-люмінесцентні властивості триметинціанінових барвників у вільному стані та у присутності β -лактоглобуліну

Барвник	Структура	Вільний барвник			БЛГ [М]		БЛГ [Ф]		
		$\lambda_{абф}$, нм	$\lambda_{ем}$, нм	I_0	$\lambda_{ем}$, нм	I_M , у.о.	$\lambda_{ем}$, нм	$I_{Ф}$, у.о.	$I_{Ф}/I_M$
L-34		554	569	420	569	377	569	320	0,85
T-364		582	629	18	628	9	653	49	5,4
T-248		564	578	54	578	50	578	49	1
T-33		594	654	13	660	19	663	30	2
L-16		586	595	0,5	593	3	593	29	9,7
L-5		554	565	5	574	6,3	574	103	23
T-336		579	623	4	632	10	640	150	15
T-165		581	624	1	634	6,2	636	86	14
L-22		640	653	0,5	659	4,5	665	44	7,9
SH-21252		591	642	4,2	644	6,9	641	168	24,3

сивність флуоресценції більшості монометинціанінів змінювалася незначно чи зростала до 3,1 раза. Для барвника ТО таке підвищення було дещо більшим (до $\sim 5,3$ раза), ніж для інших монометинціанінів.

У процесі додавання агрегованого у фібрили БЛГ положення $\lambda_{абф}$ і $\lambda_{ем}$ залишалися незмінними чи зсувалися у довгохвильову об-

ласть спектра до 16 нм, відносно до максимумів у присутності мономерного білка. Для бензотіазольного барвника L-43 положення максимуму збудження флуоресценції батохромно зсувалося на 29 нм у порівнянні з мономерним білком. Виняток становив монометинціанін SH-21305, для якого спостерігали зсув максимумів збудження і флуоресценції в

короткохвильовий регіон на 9 і 6 нм відповідно у присутності фібрил БЛГ.

При додаванні фібрилярного БЛГ відмічено підвищення інтенсивності флуоресценції майже всіх монометинцианінових барвників у 11-38 разів. Лише для симетричного бензотіазольного барвника L-43 значення $I_{\text{ф}}/I_0 \sim 4$. Найбільше збільшення інтенсивності емісії у присутності фібрилярного білка ($I_{\text{ф}}/I_0 \sim 32-38$) продемонстрували тіахіномометинціаніни ТО і SH-21305, а особливо барвник — похідний бензотіазолу Т-414, що містить аміногрупу в 6-му положенні гетероциклу. Майже для всіх ціанінів у присутності фібрил інтенсивність флуоресценції була вищою ($\sim 32,5-139$ у.о.), ніж для Тіо-Т (~ 24 у.о.).

У більшості *in vitro* досліджень процесу фібрилоутворення, наприклад, у процесі моніторингу кінетики агрегації амілоїдних білків, важливим є кількісне визначення утворених фібрил по відношенню до білка, що залишився у мономерній формі. Саме завдяки цьому зонди, що також флуоресціюють у присутності неагрегованого білка, є непридатними для специфічного визначення фібрил. Тому для оцінювання потенційної можливості використання барвника для специфічного визначення фібрилярного БЛГ *in vitro* нами використано співвідношення $I_{\text{ф}}/I_{\text{м}}$, що є показником збільшення інтенсивності емісії барвника у присутності фібрил по відношенню до неагрегованого білка.

Для бензотіазольного монометинціаніну L-43 співвідношення $I_{\text{ф}}/I_{\text{м}}$ було вдвічі нижчим, ніж для Тіо-Т (відповідно $\sim 3,8$ і $\sim 7,2$). Уведення в молекулу барвника аміногрупи в 6-те положення гетероциклу (Т-414) збільшує «чутливість» барвника до фібрилярного білка у порівнянні з незаміщеним L-43 ($I_{\text{ф}}/I_{\text{м}}$ — відповідно $\sim 16,4$ і $\sim 3,8$).

Несиметричні тіамонометинціаніни, що містили піридинове (РО, Суан 40) чи хінолінове (SH-21305, ТО) ядра, демонстрували значення $I_{\text{ф}}/I_{\text{м}}$ (від ~ 7 до $\sim 12,7$) вищі, ніж симетричний бензотіазольний барвник L-43.

Для тіапіридометинціаніну РО спостерігали досить високе значення $I_{\text{ф}}/I_{\text{м}}$ — 12,7, тоді як присутність у піридиновому ядрі метильних замісників (Суан 40) призводила до зниження величини $I_{\text{ф}}/I_{\text{м}}$ майже вдвічі (до 6,6 раза). Для несиметричних барвників, які, окрім

бензотіазольного, містили хіноліновий-2 (SH-21305) чи хіноліновий-4 залишки (ТО), значення $I_{\text{ф}}/I_{\text{м}}$ були близькими (у межах 7-9,7).

Спектрально-люмінесцентні характеристики триметинціанінових барвників в індивідуальному стані та у присутності БЛГ. Спектральні характеристики триметинціанінових барвників в індивідуальному стані та у присутності мономерного і фібрилярного БЛГ представлено в табл. 2.

Для більшості триметинціанінів у вільному стані максимумами збудження емісії спостерігали в діапазоні від 554 до 640 нм. Максимумами флуоресценції для них були розташовані між 569 і 654 нм. Для більшості триметинціанінових барвників інтенсивність флуоресценції у вільному стані була низькою ($I_0 \sim 0,5-5$ у.о.) чи помірною ($I_0 \sim 13-54$ у.о. для Т-33, Т-364 і Т-248). Найбільш високе значення інтенсивності випромінювання спостерігалось для незаміщеного триметинціаніну L-34 ($I_0 \sim 420$ у.о.).

При додаванні мономерного БЛГ максимуми збудження та флуоресценції барвників залишалися незмінними чи зсувалися до 5 нм відносно відповідних максимумів у буфері. Виняток становив триметинціанін Т-165, для якого положення $\lambda_{\text{збф}}$ було зсунутим на 24 нм. Значення $I_{\text{м}}$ для більшості триметинціанінів були близькими до інтенсивності їх флуоресценції у вільному стані. Для барвників, що містили метильні замісники в поліметиновому ланцюзі (Т-336, Т-165 і L-22), у присутності мономерного БЛГ інтенсивність зростала у 2,5-4,5 раза.

У присутності фібрилярного БЛГ положення максимумів спектрів збудження та флуоресценції для триметинціанінів L-34, Т-284, L-16 і SH-21252 незначно змінювалися у порівнянні з мономерним білком. Для барвників із метиламінними замісниками в гетерозалишках (Т-364 і Т-336) під час додавання агрегованого білка положення $\lambda_{\text{збф}}$ зсувалися на 45 і 34 нм, $\lambda_{\text{ем}}$ — відповідно на 24 і 17 нм. Для інших барвників максимумами збудження та флуоресценції зсунуті в довгохвильовий регіон до 15 нм.

У присутності фібрилярного БЛГ інтенсивність флуоресценції триметинціанінів без замісників у поліметиновому ланцюзі зростала незначно (до 2,7 раза) або навіть знижува-

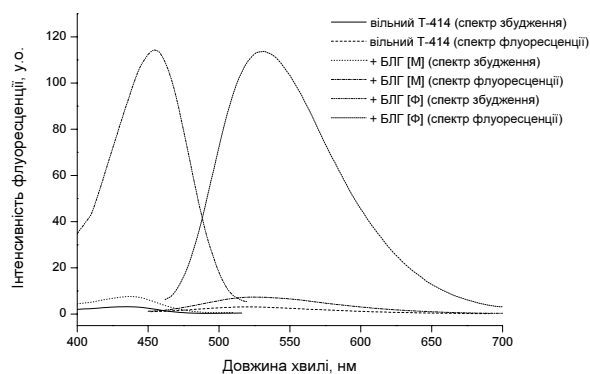


Рис. 1. Спектри флуоресценції барвника T-414 у вільному стані та у присутності мономерного і фібрилярного БЛГ.

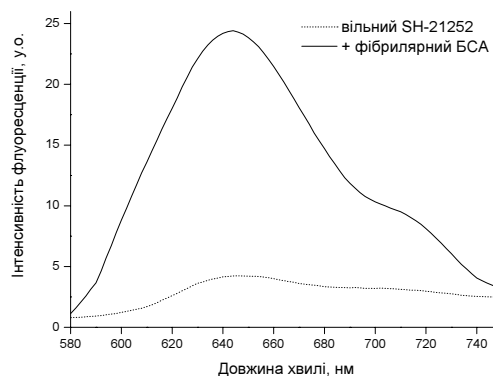


Рис. 2. Спектри флуоресценції барвника SH-21252 у вільному стані та у присутності фібрилярного БЛГ.

лася (L-34). Окрім того, значення $I_{\text{ф}}/I_{\text{м}}$ для цих барвників були низькими (у межах від ~ 1 до $\sim 2,7$), що свідчить про неефективність використання цих сполук для специфічного визначення агрегованого у фібрили БЛГ.

Для всіх мезо-заміщених барвників у присутності агрегованого білка спостерігалось зростання інтенсивності флуоресценції у 20-88 разів по відношенню до вільних барвників, а значення $I_{\text{ф}}$ були вищими ($\sim 29-168$ у.о.), ніж для Тіо-Т (~ 24 у.о.).

Барвник T-336 із 6,6'-метиламіно замісниками демонстрував високе значення $I_{\text{ф}}/I_{\text{м}}$ — ~ 15 . Для барвника T-165 із 5,5'-диметиламіно замісниками підвищення інтенсивності флуоресценції у присутності фібрил БЛГ було близьким до T-336 ($I_{\text{ф}}/I_{\text{м}} \sim 14$).

Обидва барвники з об'ємними замісниками в поліметиновому ланцюзі демонстрували високі значення $I_{\text{ф}}/I_{\text{м}}$: $\sim 9,7$ (мезо-трифторметилзаміщений L-16) і ~ 23 (феноксиметилзаміщений L-5). Значне підвищення інтенсивності флуоресценції барвника L-5 у присутності агрегованого білка дає змогу припустити, що наявність феноксиметильного замісника в поліметиновому ланцюзі сприяє специфічній взаємодії барвник/фібрила БЛГ.

Для тіахінокарбоціаніну L-22 підвищення інтенсивності емісії в присутності фібрилярного БЛГ було близьким до Тіо-Т ($\sim 7,9$). Для іншого несиметричного барвника SH-21252, що містить залишки бензотіазолу і 4,5-бензо-

бензотіазолу (нафтотіазолу), значення $I_{\text{ф}}/I_{\text{м}}$ було найбільшим серед усіх триметинціанінів і в кілька разів перевищувало відповідний показник для Тіо-Т ($\sim 24,3$).

Висновки. Досліджено спектрально-люмінесцентні властивості серії моно- і триметинціанінових барвників у присутності нативного та фібрилярного β -лактоглобуліну.

Як для моно-, так і для триметинціанінів показано, що присутність аміногрупи у 5- чи 6-му положенні бензотіазольного гетероциклу збільшує інтенсивність флуоресценції барвників у присутності фібрил β -лактоглобуліну.

Уведення до поліметинового ланцюга триметинціанінів метильних, трифторметильних і феноксиметильних мезо-замісників збільшує «чутливість» барвників до агрегованої форми β -лактоглобуліну.

Триметинціаніни L-5, SH-21252 і монометинціанін T-414 у присутності агрегованого БЛГ демонструють істотне (до 24 разів) специфічне зростання інтенсивності флуоресценції. Інтенсивність випромінювання цих барвників у комплексах із фібрилярним БЛГ є значно вищою, ніж для Тіо-Т. Таким чином, ці барвники можуть бути запропоновані як високочутливі зонди для визначення фібрилярних білків, зокрема β -лактоглобуліну.

Робота виконана за підтримки Міжнародного наукового фонду УНТЦ (грант № 4936).

Надійшла в редакцію 19.09.2008 р.

Studies of mono- and trimethine cyanine dyes
as specific fluorescent probes for fibrillar β -lactoglobulin detection

K.D. Volkova¹, V.B. Kovalska¹, A.O. Balanda¹, Yu.L. Slominski², O.I. Tolmachev²,
V. Subramaniam³ and S.M. Yarmoluk¹

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150 Zabolotnogo Str., Kyiv, 03143, Ukraine

² Institute of Organic Chemistry, NAS of Ukraine
5 Murmanska Str., Kyiv, 02660, Ukraine

³ MESA+ Institute for Nanotechnology, Biophysical Engineering Group, University of Twente, The Netherlands

Summary. We ascertained the ability to detect fibrillar β -lactoglobulin (BLG) of a series of mono- and trimethinecyanines containing on benzothiazole heterocycles. Fluorescent properties of these dyes were studied in the unbound state and in the presence of monomeric and fibrillar BLG. The correlation between the chemical nature of the dye molecules and the ability of dyes to bind aggregated proteins was established. We found that cyanines with amino substituents in heterocycle in contrast to the corresponding unsubstituted dyes have a binding preference to fibrillar BLG and give noticeable fluorescence response in the presence of the aggregated protein. Also it was shown, that incorporation of substituents into polymethine chain of trimethinecyanines leads to the increasing of the dye/fibrillar BLG complex fluorescence intensity. The trimethinecyanines L-5, SH-21252 and monomethinecyanine T-414 specifically increase emission (up to 24 times) in the presence of fibrillar BLG and could be proposed as probes for fluorescent detection of aggregated proteins.

Keywords: cyanine dyes, amyloid proteins, fluorescent detection.

Перелік літератури

1. Chiti F., Webster P., Taddei N., Clark A., Stefani M., Ramponi G. Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1999. — Vol. 96. — P. 3590-3594.
2. West M.W., Wang W., Patterson J., Mancias J.D., Beasley J.R., Hecht M.H. De novo amyloid proteins from designed combinatorial libraries // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1999. — Vol. 96. — P. 11211-11216.
3. Prusiner S.B. Prion diseases and the BSE crisis // Science. — 1997. — Vol. 278. — P. 245-251.
4. Kelly J.F. Amyloid fibril formation and protein misassembly: a structural quest for insights into amyloid and prion diseases // Structure. — 1997. — Vol. 5. — P. 595-600.
5. Naiki H., Higuchi K., Hosokawa M. and Takeda T. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1 // Anal. Biochem. — 1989. — Vol. 177. — P. 244-249.
6. LeVine H. 3rd. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution // Protein Sci. — 1993. — Vol. 2. — P. 404-410.
7. Klunk W.E., Pettegrew J.W., Abraham D.J. Quantitative evaluation of Congo Red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation // J. Histochem. Cytochem. — 1989. — Vol. 37. — P. 1273-1281.
8. Westermark G.T., Johnson K.H., Westermark P. Staining methods for identification of amyloid in tissue // Methods Enzymol. — 1999. — Vol. 309. — P. 3-25.
9. Glenner G.G., Page D.L. and Eanes E.D. The relation of the properties of congo red-stained amyloid fibrils to the β -conformation // J. Histochem. Cytochem. — 1972. — Vol. 20. — P. 821-826.
10. Murakami K., Irie K., Morimoto A., Ohigashi H., Shindo M., Nagao M., Shimizu T. and Shirasawa T. Neurotoxicity and physicochemical properties of Abeta mutant peptides from cerebral amyloid angiopathy: implication for the pathogenesis of cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278. — P. 46179-46187.
11. Khurana R., Uversky V.N., Nielsen L., Fink A.L. Is Congo red an amyloid-specific dye? // J. Biol. Chem. — 2001. — Vol. 276. — P. 22715-22721.
12. Arnaudov L.N., de Vries R., Ippel H., van Mierlo C.P. Multiple steps during the formation of beta-lactoglobulin fibrils // Biomacromolecules. — 2003. — Vol. 4. — P. 1614-1622.
13. Bromley E.H.C., Krebs M.R.H. and Donald A.M. Aggregation across the length-scales in beta-lactoglobulin // Faraday Discuss. — 2005. — Vol. 128. — P. 13-27.
14. Киприанов А.И., Ушенко И.К. Цвет органических красителей и планарность их молекулы. I // ЖОХ. — 1950. — Т. 20. — С. 134-144.
15. Kelemen J., Wizinger R. Ueber alkylsubstituirte pyrylo- und pyridino-cyanine. I. 2,6-dimethylpyrylo- und 2,6-dimethylpyridino-cyanine aus 2,6-dimethylpyron // Helv. Chim. Acta. — 1962. — Vol. 45. — P. 1908-1917.
16. Hamer F.M. XXXI. The ψ cyanine condensation // J. Chem. Soc. — 1928. — P. 206-215.
17. Киприанов А.И., Сич К.Д. Будова і зафарблення ціанінових барвників. Амінотіаціаніни // Записки Інституту хімії Академії наук УРСР. — 1946. — Т. 8. — С. 104-128.
18. Лукашов С.С., Качковський Г.О., Лосицький М.Ю., Ярмолюк С.М. Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 22. Карбоціанінові барвники, заміщені в поліметиновому ланцюзі, як можливі зонди для флуоресцентної детекції нуклеїнових кислот // Біополімери і клітина. — 2001. — Т. 17. — С. 242-248.
19. Лукашов С.С., Маковенко І.Є., Сломінський Ю.Л., Ярмолюк С.М. Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. Мезо-метилзаміщені триметинціанінові барвники як можливі зонди для флуоресцентної детекції нуклеїнових кислот // Біополімери і клітина. — 2001. — Т. 17. — С. 448-454.