УДК: 539.12, 535.372

Иммобилизация флуоресцентного зонда в молекулы фермента

В. С. Маряхина^а, В. В. Гуньков

Оренбургский государственный университет.
Россия, 460018, г. Оренбург, пр. Победы, д. 13

E-mail: ^а valemarm@mail.ru

*Получено 6 апреля 2013 г.,
после доработки 20 сентября 2013 г.*

В статье представлены результаты экспериментальных и теоретических исследований кинетики проникновения эритрозина в молекулы коллагеназы. Рассматривается случай с введением вещества — флуоресцентного зонда, молекул, которого способны образовывать димеры, в раствор фермента в случае инъекции. Показано, что в молекулы фермента могут проникать как мономеры, так и димеры зонда, образуя комплексы мономер-фермент и димер-фермент. При этом в каждый момент времени происходит трансформация спектра флуоресценции зонда: наблюдается сдвиг максимума спектра и изменение его формы. В то же время иммобилизованные димеры красителя вносят существенный вклад в формирование итогового спектра флуоресценции. Хорошее соответствие экспериментальных и теоретических результатов подтверждает достоверность полученных данных.

Ключевые слова: диффузия, молекулярный зонд, фермент, коллагеназа, флуоресцентная диагностика

Fluorescent probe immobilization into enzyme molecules

V. S. Maryakhina, V. V. Gunkov

Orenburg State University, Pobedy pr, Orenburg, 460018, Russia

Abstract. — The results of the experimental and theoretical researches of kinetics of erythrosine penetration into collagenase molecules have represented in this paper. The case with introduction of the compound (fluorescent probe) which has dimers to enzyme solution as an injection has been considered. It was shown that monomers and dimers can penetrate into enzyme molecules with formation complexes monomer — enzyme, dimer- enzyme. Moreover, transformation of probe fluorescence spectra is at each time moment. Spectrum maximum shift, and its form change. At a time, the immobilized dye dimers greatly impact to formation of end fluorescence spectrum. Well correlation between experimental and theoretical results confirms reality of the obtained data.

Keywords: diffusion, molecular probe, enzyme, collagenase, fluorescent diagnostics

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2013, vol. 5, no. 5, pp. 835–843 (Russian).

Введение

Флуоресцентная диагностика одна из наиболее динамично развивающихся областей науки. Благодаря развитию оптических методов удается диагностировать раковые опухоли неинвазивно. Во время флуоресцентной диагностики происходит взаимодействие флуоресцентного зонда как с опухолевыми клетками, так и с межклеточной жидкостью. Одно из таких веществ — фермент коллагеназа, который содержится в крови, коже и других биообъектах [Stricklin et al., 1977]. В процессе старения кожи концентрация коллагеназы существенно изменяется [West et al., 1994]. Этот фермент хорошо изучен биохимиками на предмет ферментативной активности и строения молекулы. Однако до сих пор не изучено его влияние на результаты флуоресцентной диагностики, хотя такие виды взаимодействий могут привести к искажению экспериментальных результатов. Более того, используемые фотосенсибилизаторы часто имеют способность образовывать ассоциаты молекул ввиду особенностей их структур. Существующие оптические методы диагностики биотканей не учитывают эти факторы во время интерпретации результатов.

Настоящая работа посвящена изучению особенностей кинетики иммобилизации мономеров и димеров флуоресцентного зонда в молекулы коллагеназы с целью модернизации оптических методов диагностики патологических состояний биотканей.

Экспериментальные исследования

Объектом экспериментальных исследований явился эритрозин ($M = 834.2$ г/моль) — представитель класса ксантеновых красителей, которые часто используются для исследования белковых молекул [Menezes et al., 2007; Добрецов, 1989]. Во время экспериментов был приготовлен раствор коллагеназы в фосфатном буфере с $pH = 7.4$ с концентрацией 0.1 мкг/мл. Выбранная концентрация фермента входит в диапазон физиологических значений. Аликвота эритрозина с исходными концентрациями 10^{-3} М и 10^{-4} М добавлялась к растворам фермента таким образом, чтобы конечная концентрация эритрозина была одинаковой. Спектры флуоресценции зонда были измерены на спектрофлуориметре SOLAR CM-2203. Длина волны возбуждения была 515 нм. Поскольку в работе [Маряхина, Гуньков, 2012] было показано, что состояние диффузного равновесия происходит приблизительно спустя 10 минут, все спектральные измерения проводились по истечении этого времени после добавления эритрозина к суспензии фермента.

На рисунке 1 приведены спектры флуоресценции эритрозина в растворах коллагеназы. Отчетливо заметно смещение максимума флуоресценции на 3 нм при изменении начальной концентрации красителя. Дополнительно для контроля были измерены спектры флуоресценции красителя в буферном растворе ($pH = 7.4$) при используемых двух различных начальных концентрациях эритрозина (без фермента). Нами не наблюдалось каких-либо изменений в спектрах флуоресценции, измеренных в условиях отсутствия фермента, при изменении начальной концентрации красителя. Спектры были полностью идентичны. Наблюдаемый эффект для спектров 1 и 2 (рис. 1) может быть связан с иммобилизацией мономеров и димеров красителя, поскольку в растворе эритрозина с исходной концентрацией 10^{-3} М содержатся порядка $18\text{--}20\%$ димеров [Chambers et al., 1968]. В то же время содержание ассоциатов в растворе эритрозина с исходной концентрацией 10^{-4} М пренебрежимо мало. Для подтверждения этой гипотезы проведены дополнительно серия экспериментов и разработана математическая модель, учитывающая указанные процессы. Далее приводится подробное их описание.

Математическая модель

Рассмотрим систему, в которой есть мгновенный источник исследуемого вещества. Вещество вводится в виде инъекции в объем биологической жидкости, которая состоит как из воды, так и содержащихся в ней биологически активных молекул, например, белков, ферментов.

Рис. 1. Спектры флуоресценции эритрозина в растворе коллагеназы при использовании алиquotы красителя с исходной концентрацией: 1 — 0.1 мМ, 2 — 1 мМ [Maryakhina, 2013]. Для сравнения приведен спектр флуоресценции эритрозина в буферном растворе (рН = 7.4) без фермента (3). Конечная концентрация красителя была во всех растворах $1.5 \cdot 10^{-5}$ М. Концентрация коллагеназы в растворе 0.1 мг/мл

Молекулы рассматриваемого молекулярного зонда могут образовывать ассоциаты. При этом как мономеры, так и димеры зонда могут иммобилизовываться внутри таких структур и флуоресцировать внутри них. Свободно диффундирующие в жидком растворе мономеры зонда тоже флуоресцируют. Флуоресценция свободно диффундирующих димеров до сих пор не отмечалась в научной периодике, поэтому в этой модели ее учитывать не будем. Концентрацию свободно диффундирующих мономеров зонда обозначим $N_1(t)$, а свободно-диффундирующих димеров — $N_2(t)$. В настоящей модели будем учитывать, что между молекулами зонда и биологическими структурами есть только физические взаимодействия и полное отсутствие химических превращений. При этом взаимодействие прочное и не происходит распада образованного комплекса в течение времени, необходимого для измерений спектров флуоресценции и выхода диффузионных процессов на стационарный режим. Поэтому такие биоструктуры для нашего зонда являются «ловушками».

В биологической системе существует большое разнообразие таких поглощающих компонентов, их реакционная способность в основном определяется радиусом и объемной концентрацией. Не смотря на неоднородность поверхности и формы биологических структур, предположим, что они имеют сферическую форму и локализованы равномерно по всему объему. В этой работе будем учитывать один вид поглощающих компонентов, концентрацию которых обозначим $N(t)$. Под молекулами N могут подразумеваться различные вещества белковой природы.

Исходя из описания процессов, происходящих в жидкой среде, можно принять коэффициент диффузии равным 10^{-9} м²/с, что совпадает со средним по порядку величины коэффициентом диффузии для веществ в жидких средах.

В этой работе примем пространство однородным по всему объему и будем рассматривать диффузию в объеме биологической жидкости, поэтому кинетические уравнения были составлены на основе уравнения диффузии. Логично предположить, что оператор Лапласа необходимо записывать в сферических координатах. Однако ввиду однородности пространства задача представляется сферически симметричной и концентрация зонда не зависит от углов θ и φ . Поэтому концентрация исследуемого вещества будет зависеть только от радиуса r и времени t .

С учетом этого предположения кинетические уравнения выглядят следующим образом:

$$\begin{cases} \frac{\partial N_1(r,t)}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 N_1(r,t)}{\partial r^2} - \frac{2}{r} \frac{\partial N_1(r,t)}{\partial r} \right) - k_1 N_1(t) N(r,t), \\ \frac{\partial N_2(r,t)}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 N_2(r,t)}{\partial r^2} - \frac{2}{r} \frac{\partial N_2(r,t)}{\partial r} \right) - k_2 N_2(t) N(r,t), \\ \frac{dN(t)}{dt} = -k_2 N_2(r,t) N(t) - k_1 N_1(r,t) N(t). \end{cases}$$

После замены переменных

$$W_i(r,t) = r N_i(r,t)$$

система уравнений принимает вид

$$\begin{cases} \frac{\partial W_1(r,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 W_1(r,t)}{\partial r^2} - k_1 N(t) \frac{W_1(r,t)}{r}, \\ \frac{\partial W_2(r,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 W_2(r,t)}{\partial r^2} - k_2 N(t) \frac{W_2(r,t)}{r}, \\ \frac{dN(t)}{dt} = -k_2 N(t) \frac{W_2(r,t)}{r} - k_1 N(t) \frac{W_1(r,t)}{r}. \end{cases} \quad (3.1)$$

Предполагая, что лимитирующим процессом взаимодействия зонда с биологической жидкостью является диффузия, запишем уравнение для констант скоростей [Эммануэль, Кнорре, 1984] как

$$k_i = \frac{2kT}{3\eta} \cdot \frac{r_i + r}{r_i \cdot r}, \quad (3.2)$$

где r_i — радиусы молекул мономеров/димеров красителя, взаимодействующих с ферментом, нм; r — радиус молекулы фермента, нм; k — постоянная Больцмана; T — температура, К; η — вязкость, Пз. Измерения проводились при температуре 298 К. Вязкость раствора фермента была рассчитана по формуле [Freifelder, 1976], предложенной для расчета, и составила 0.2 сПз.

Начальные условия

Для решения системы (3.1) необходимо знать начальные условия. Однако количество молекул коллагеназы и зонда в суспензии очень различно. Поэтому для удобства будем пользоваться величиной объемной концентрации веществ в растворе (произведение количества молекул N на объем одной молекулы V^1).

Так, для эритрозина количество молекул в начальный момент времени определяется выражением $N(0) = C \cdot V \cdot N_A$. Учитывая, что рассматриваемый объем исследуемой жидкости равен 1 см^3 , количество молекул зонда равно $9 \cdot 10^{15} \text{ см}^{-3}$. Величину объема одной молекулы эритрозина можно вычислить по формуле

$$V^1 = \frac{4}{3} \pi \cdot R^3, \quad (4.1)$$

где $R = \sqrt[3]{\frac{3 \cdot M}{4 \cdot \rho \cdot \pi \cdot N_A}}$ — радиус молекулы, м.

Плотность сухого эритрозина — 0.98 г/л, следовательно, $V^1 = 1.4 \cdot 10^{-24} \text{ см}^3$. Принимая, что при использовании эритрозина с исходной концентрацией 10^{-3} М , содержание димеров составляет 18 % [Chambers et al., 1968], величина объемной концентрации мономеров эритрозина может быть получена согласно выражению

$$N_1^1 V_1^1 = 9 \cdot 10^{15} \cdot 1.4 \cdot 10^{-24} \cdot 0.82 = 10.3 \cdot 10^{-9} \text{ м}^3,$$

при этом объемная концентрация димеров в растворе равна

$$N_2^1 V_2^1 = 9 \cdot 10^{15} \cdot 2.8 \cdot 10^{-24} \cdot 0.18 = 4.5 \cdot 10^{-9} \text{ м}^3.$$

Количество молекул фермента можно вычислить по формуле $N = C \cdot N_A / M$. Таким образом, в случае использования раствора коллагеназы с концентрацией 0.1 мкг/мл $N(0) = 2.8 \cdot 10^{12} \text{ см}^{-3}$. Размер молекулы фермента примем равным 40 нм, т. к. это средняя величина для такого класса веществ [Metsler, 1977]. Поэтому объемная концентрация коллагеназы в исследуемой системе составит

$$N^1 V^1 = 5.7 \cdot 10^{11} \cdot 2.0 \cdot 10^{-22} = 11.4 \cdot 10^{-11} \text{ м}^3.$$

Отметим, что физический смысл произведения NV — это объем каждого типа молекул в 1 см^3 суспензии. Если эти величины разделить на объемную концентрацию эритрозина, то получим относительные объемные концентрации компонентов с размерностью см^{-3} . Поэтому начальные условия для системы уравнений (3.1) составили $N_1(0) = 0.82 \cdot \delta(r) \text{ см}^{-3}$, $N_2(0) = 0.35 \cdot \delta(r) \text{ см}^{-3}$, $N(0) = 0.009 \text{ см}^{-3}$, где $\delta(r)$ — дельта-функция, учитывающая наличие мгновенного точечного источника в исследуемой системе. Для раствора коллагеназы с концентрацией 0.5 мкг/мл начальное условие для N будет $N(0) = 0.045 \text{ см}^{-3}$.

Неоднородное распределение красителя по радиусу позволяет сделать граничное условие второго рода $N_{1r}'(r=0, t) = 0$, $N_{2r}'(r=0, t) = 0$.

Результаты и их обсуждение

В результате диффузии вещества происходит его перераспределение по всему объему жидкости. Интегрирование функции $W(r, t)$ позволяет получить значение приведенной концентрации в каждый момент времени:

$$N_i(t) = \int_0^{+\infty} \frac{W_i(r, t)}{r} dr. \quad (5.1)$$

Рассчитанные концентрации $N_i(t)$ по уравнению (5.1) позволяют связать количество иммобилизованных мономеров и димеров зонда с изменением его спектров флуоресценции во времени. Для этого брали экспериментально полученные спектры флуоресценции зонда в фосфатном буферном растворе (рН = 7.4) (рис. 1), и твердых растворов эритрозина в коллагеназе, измеренных после добавления аликвоты красителя с исходными концентрациями 10^{-3} М и 10^{-4} М к порошку коллагеназы [Maryakhina, 2013]. Для исключения перепоглощения образцы были приготовлены с оптической плотностью не более 0.7. Спектры флуоресценции твердых растворов эритрозина измерялись при длинах волн возбуждения 515 и 480 нм исходя из особенностей спектров поглощения эритрозина (см, например [Maryakhina, 2013]). Наибольший вклад в спектр поглощения на длине волны 515 нм имеют мономеры эритрозина, в то время как на 480 нм поглощают преимущественно димеры. Идентичное предположение было описано в работе [Rodríguez et al., 2004]. Поэтому в этой работе сделаем допущение следующего характера: спектр флуоресценции, измеренный при длине волны возбуждения 515 нм, примем за

спектр флуоресценции мономеров эритрозина, а спектр флуоресценции, измеренный на длине волны возбуждения 480 нм, — за спектр флуоресценции димеров эритрозина.

В процессе диффузии зонда происходит его иммобилизация в молекулы фермента, что приводит к смещению его спектров флуоресценции. Расчет динамики спектров производили по формуле

$$S(\lambda, t) = S_1(\lambda)N'_1(t) + S_2(\lambda)N'_2(t) + S_3(\lambda)N_1(t), \quad (5.2)$$

где λ — длина волны, нм; $S(\lambda, t)$ — итоговый спектр флуоресценции зонда в исследуемой биологической системе; $S_1(\lambda)$, $S_2(\lambda)$, $S_3(\lambda)$ — спектры флуоресценции мономеров и димеров зонда в твердых растворах и его мономеров в буферном растворе соответственно; $N'_i(t)$ — концентрации иммобилизованных мономеров и димеров в молекулы фермента, полученные согласно формуле

$$N'_i(t) = N_i(0) - N_i(t).$$

Для расчета использовались спектры флуоресценции с истинным значением интенсивности. Как видно из рисунка 2, происходят изменения спектров флуоресценции со временем. Изменяется как интенсивность спектра флуоресценции, так и максимум спектра. Наиболее значительные отличия происходят в течение первых 6–8 минут. Затем изменения в спектре флуоресценции менее значительны. Поскольку лимитирующей стадией рассматриваемых процессов является диффузия, в первые 5 минут реагируют наиболее близко расположенные молекулы мономеров и димеров зонда. Затем концентрация свободных молекул зонда уменьшается и все меньшая доля молекул реагирует с ферментом, образуя комплексы. Поэтому в последующие несколько минут метаморфозы спектров флуоресценции менее выражены. Аналогичная динамика была получена для раствора с концентрацией фермента 0.5 мкг/мл.

Рис. 2. Динамика спектров флуоресценции эритрозина в зависимости от времени его диффузии. Концентрация коллагеназы 0.1 мкг/мл

В жидком растворе флуоресцируют как свободные мономеры красителя, так и комплексы мономер-фермент, димер-фермент. Экспериментальный спектр (рис.1) является суммарным спектром от описанных трех составляющих. Поэтому расчетный спектр $S(\lambda)$ для момента времени $t = 10$ мин будем сравнивать с экспериментально полученным спектром, изображенным на рисунке 1.

В случае расчета эритрозина с исходной концентрацией 10^{-4} М концентрация димеров равна нулю, а значит $W_2(t) = 0$, и система уравнений (3.1) сводится к решению первого и третьего уравнений.

Как видно из следующей иллюстрации, наблюдается удовлетворительное совпадение экспериментальных и теоретических данных. Как эксперимент, так и теоретические расчеты доказывают смещение максимума спектра флуоресценции эритрозина при его использовании с двумя разными исходными концентрациями. Одновременно на двух типах спектров отчетливо заметно их пересечение в районе 575 нм. Отметим, что теоретически полученные спектры отличаются от экспериментальных на 4 нм по ширине, однако все вышеописанные закономерности сохраняются. Наблюдаемые незначительные отличия теории от эксперимента могут быть следствием математической обработки спектров (сглаживание, нормирование) и сделанных допущений. Отметим, что полученные на рисунке 3 данные позволяют сделать вывод об адекватности допущения о спектрах флуоресценции мономеров и димеров зонда, измеренных с длиной волны возбуждения 515 нм/480 нм.

Рис. 3. Нормированные экспериментальные (1, 2) и теоретические (3, 4) спектры флуоресценции эритрозина в растворе коллагеназы 0.1 мкг/мл после использования аликвоты красителя с исходной концентрацией: 1, 3 — 0.1 mM; 2, 4 — 1 mM

Описанное явление иммобилизации мономеров и димеров ксантеновых красителей было описано и другими авторами [Rodríguez et al., 2004; Xu, Neckers, 1984; Pandya, Machwe, 1977; Schlein et al., 2011; Pelloso et al., 2012; Slyusareva et al., 2009] на примере системы бенгальский розовый-целлюлоза, еозин-САЧ и др. Наши результаты согласуются с приведенными данными.

В биологических исследованиях иногда используют параметр изменения интенсивности флуоресценции вещества на одной длине волны. Следующий рисунок (рис. 4) показывает нелинейную зависимость интенсивности флуоресценции от времени. Дополнительные расчеты были сделаны для концентрации коллагеназы 0.5 мг/мл, которая также входит в диапазон физиологических значений и используется в экспериментах *in vitro*. Для этого начальное условие для концентрации фермента было изменено на $N(0) = 0.045 \text{ см}^{-3}$. Можно заметить, что различия между выбранными концентрациями зонда не существенны, но при концентрации фермен-

та 0.5 мг/мл эти изменения более значительны. Это связано с тем, что большее количество молекул красителя иммобилизуется в молекулы фермента из-за увеличения их количества в растворе, что приводит к изменению интенсивности и формы спектра. Различия в кинетике интенсивности флуоресценции при двух длинах волн: 545 и 560 нм более значительны, особенно тушение флуоресценции на длине волны 560 нм. Предположительно, это связано с меньшим вкладом димеров в общий спектр флуоресценции.

Рис. 4. Изменение интенсивности флуоресценции эритрозина на длине волны 560 нм (1, 2) и 545 нм (3, 4). Концентрация коллагеназы в растворе составляла 0.1 мкг/мл (1,3) и 0.5 мкг/мл (2, 4). Для расчета использовались теоретически полученные спектры

Заключение

Во время флуоресцентной диагностики часто используются фотосенсибилизаторы и зонды, молекулы которых могут образовывать ассоциаты. Такими примерами могут служить диметиламинохалкон [Гуларян и др., 2005], Аласенс [Вакуловская и др., 2003], эозин, бенгальский розовый [Maryakhina, Letuta, 2013] и другие. В этой работе на примере флуоресцентного зонда эритрозина, который также используется во флуоресцентной диагностике, показано, что процессы иммобилизации ассоциатов зонда могут вносить существенный вклад в суммарный спектр флуоресценции. Смещение его максимума и изменение ширины из-за иммобилизации димеров зонда могут оказать влияние на результаты флуоресцентной диагностики. Заметим, что нами ранее было показано [Маряхина, 2012], что с увеличением концентрации эритрозина от 10^{-4} М до 10^{-3} М изменяется как время жизни локализованных в опухолевых клетках триплетных состояний эритрозина, так и константа скорости его взаимодействия с синглетным кислородом. Одной из причин может быть описанная в этой работе иммобилизация димеров красителя в молекулы белковой природы.

В результате моделирования было также получено, что время, необходимое для завершения диффузионных процессов, составляет приблизительно 8÷10 минут. В течение этого промежутка времени происходит значительная деформация спектров флуоресценции. Следовательно, по истечении этого времени, после установления стационарного режима, целесообразно выполнять экспериментальные исследования.

Полученные результаты могут быть полезны как во флуоресцентной диагностике, так и при исследовании доставки лекарственных препаратов.

Список литературы

- Вакуловская Е. Г., Летагин В. П., Погодина В. М. Фотодинамическая терапия и флуоресцентная диагностика у больных раком молочной железы // Российский биотерапевтический журнал. — 2003. — Т. 2, № 4. — С. 57–60.
- Гуларян С. К., Добрецов Г. Е., Саркисов О. М., Гостев Ф. Е., Светличный В. Ю. Липофильный флуоресцентный зонд 4- диметиламинохалкон: факторы, определяющие выход флуоресценции // Биофизика. — 2005. — Т. 50, вып. 3. — С. 780–786.
- Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. — М.: Наука, 1989.
- Маряхина В. С. Длительная люминесценция органических красителей в клетках биологических тканей // Автореферат дис. к.ф.-м.н., 2012.
- Маряхина В. С., Гуньков В. В. Флуоресценция молекулярного зонда и его диффузия в биологической жидкости // Компьютерные исследования и моделирование. — 2012. — Т. 4, № 1. — С. 201–208.
- Эммануэль Н. М., Кнорре Д. Г. Курс химической кинетики. — М.: Высшая школа, 1984.
- Chambers R. W., Kearns D. R. Effect of dimer formation on the triplet states of organic dyes // The Journal of Physical Chemistry. — 1968. — V. 72. — P. 4718.
- Freifelder D. Physical biochemistry. Application to biochemistry and molecular biology. Freeman: Can Francisco, 1976.
- Maryakhina V. S. Fluorescent probe immobilization kinetics into collagenase molecules // Proc. of SPIE. — 2013. — V. 8699. — 8699L. doi: 10.1117/12.2016638.
- Maryakhina V. S., Letuta S. N. Pathology development stage and its influence on the delayed fluorescence kinetics of molecular probes // Laser physics. — 2013. — V. 23. — P. 025604 doi:10.1088/1054-660X/23/2/025604.
- Menezes P. F. C., Bernal C., Imasato H., Bagnato V. S., Perussi J. R. Photodynamic activity of different dyes // Laser physics. — 2007. — V. 17, № 4. — P. 468–471.
- Metsler D. E. Biochemistry. Chemical reaction of living cells. Academic press, New York, 1977.
- Pandya M. L., Machwe M. K. Effect of aggregation of molecules on the polarization of fluorescence spectrum of erythrosine // Acta Physica Academiae Scientiarum Hungaricae. — 1977. — V. 42. — P. 179–184.
- Pellosi D. S., Estevão B. M., Semensato J., Severino D., Baptista M. S., Politi M. J., Hioka N., Caetano W. Photophysical properties and interactions of xanthene dyes in aqueous micelles // J photochem. photobiol., A. — 2012. — V. 247. — P. 8–15.
- Rodríguez H. B., Lagorio M. G., Román E. S. Rose Bengal adsorbed on microgranular cellulose: evidence on fluorescent dimers // Photochem. Photobiol. Sci. — 2004. — V. 3. — P. 674.
- Schlein M., Ludvigsen S., Olsen H. B., Andersen A. S., Danielsen G. M., Kaarsholm N. C. Properties of Small Molecules Affecting Insulin Receptor Function // Biochemistry. — 2001. — V. 40. — P. 13520–13528.
- Slyusareva E., Szykh A., Tyagi A., Penzkofer A. Spectral and photophysical properties of fluorone dyes in bio-related films and methanol // J Photochem Photobiol A. — 2009. — V. 208. — P. 131–140.
- Stricklin G. P., Bauer E. A., Jeffrey J. J., Eisen A. Z. Human skin collagenase: isolation of precursor and active forms from both fibroblast and organ cultures // Biochemistry. — 1977. — V. 16, № 8. — P. 1607–1615.
- West M. D. The cellular and molecular biology of skin aging // Arch Dermatol. — 1994. — V. 130, № 1. — P. 8795.
- Xu D., Neckers D. S. Aggregation of rose bengal molecules in solution // J. photochem. photobiol., A. — 1987. — V. 40. — P. 361–370.