

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ЭЛЕМЕНТООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ им. А.Н. НЕСМЕЯНОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

УСТИМОВА МАРИЯ АЛЕКСЕЕВНА

**РАЗРАБОТКА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ РЕАГЕНТОВ НА ОСНОВЕ
СТИРИЛОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ДЛЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ
ВИЗУАЛИЗАЦИИ**

1.4.3 – органическая химия

1.4.4 – физическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в лаборатории Фотоактивных супрамолекулярных систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (ИНЭОС РАН).

Научные руководители:

Федорова Ольга Анатольевна, доктор химических наук, профессор, заведующая лабораторией Фотоактивных супрамолекулярных систем ИНЭОС РАН.

Федоров Юрий Викторович, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории по разработке хелаторов и их конъюгатов с молекулами-векторами для получения радиофармпрепаратов ИНЭОС РАН.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	5
1. ВВЕДЕНИЕ	8
2. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	13
2.1. Антрахиноновые красители	13
2.2. BODIPY – красители.....	17
2.3. Карбазоловые красители	25
2.4. Кумариновые красители.....	33
2.5. Родаминовые красители	37
2.6. Цианиновые красители	40
2.7. Стириловые красители	46
2.8. Сквареновые красители.....	56
2.9.Тиофеновые красители	61
2.10. Гибридные красители.....	65
Заключение	75
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	76
3.1. Синтез бисстириловых красителей.....	77
3.2. Оптические свойства бисстириловых красителей.....	85
3.3. Фотоиндуцированный безызлучательный перенос энергии в несимметричных бисстириловых красителях 1, 4, 5, 6	88
3.4. Комплексообразование краун-содержащего бисстирилового красителя 1 с катионами металлов в MeCN.....	92
3.5. Комплексообразование краун-содержащего бисстирилового красителя 1 с катионом ртути в воде	100
3.6. Комплексообразование красителей типа «голова к голове» 2, 3, 4 с ДНК тимуса теленка.....	108
3.7. Комплексообразование красителей типа «голова к хвосту» 5, 6 с ДНК тимуса теленка и РНК печени теленка	115
4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	124

4.1. Синтез соединений.....	126
4.2. Расчет квантовых выходов флуоресценции.....	140
4.3. Спектрофотометрическое определение констант устойчивости комплексов бисстирилового красителя 1 с катионами металлов.....	141
4.4. Исследование взаимодействия лигандов 2-6 с ДНК и РНК.....	142
5. ВЫВОДЫ	144
6. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	145
7. СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	160

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТФ – Аденозинтрифосфат или аденозинтрифосфорная кислота

БСА – Бычий сывороточный альбумин

ВЗМО – Высшая занятая молекулярная орбиталь

д – Дублет

ДМСО – Диметилсульфоксид

ДМФА – N,N-Диметилформамид

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота

ДХМ – Дихлорметан

дц – Двухцепочечная

ИК – Инфракрасный

ИКД – Индуцированный круговой дихроизм

ИФА – Иммунофлуоресцентный анализ

ИЭР – Ионизация при электрораспылении

КД – Круговой дихроизм

м – Мультиплет

м.д. – Миллионная доля, единица химического сдвига в спектрах ядерного магнитного резонанса

МД – Молекулярная динамика

МТТ-тест – Колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток

НК – Нуклеиновая кислота

НСМО – Низшая свободная молекулярная орбиталь

пт – Печень телят

РНК - Рибонуклеиновая кислота

с – Синглет

т – Триплет

тт – Тимус телят

ТГФ – Тетрагидрофуран

ТМС – Триметилсилан

ТСХ – Тонкослойная хроматография

УФ – Ультрафиолетовый

ФДТ – Фотодинамическая терапия

ФТТ – Фототермическая терапия

ЧСА – Сывороточный альбумин человека

ЭДТА – Этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭР – Эндоплазматический ретикулум

ЯМР – Ядерный магнитный резонанс

A – Оптическая плотность

BODIPY – *англ.*, «Boron-Dipyrromethene», хромофор, представляющий собой борфторидный комплекс дипиррометена

COSY – *англ.*, Correlation Spectroscopy, двумерная гомоядерная корреляционная спектроскопия

C – Молярная концентрация

DAPI – *англ.*, 4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole, синий флуоресцентный краситель ДНК

DIPEA – Диизопропилэтиламин

FRET – *англ.*, Förster Resonance Energy Transfer, резонансный перенос энергии по механизму Ферстера

HMBC – *англ.*, Heteronuclear Multiple-Bond Correlation spectroscopy, двумерная гетероядерная корреляционная спектроскопия через несколько связей

HSQC – *англ.*, Heteronuclear Single-Quantum Correlation spectroscopy, гетероядерная корреляционная спектроскопия через одну химическую связь

I – Интенсивность

ICT – *англ.*, Intramolecular Charge Transfer, внутримолекулярный перенос заряда

in vitro – *лат.* «в стекле», в искусственных условиях вне организма

in vivo – *лат.* «в (на) живом», в условиях эксперимента на живом организме

J – Константа спин-спинового взаимодействия; Интеграл перекрытия спектра поглощения хромофора-акцептора и спектра флуоресценции хромофора-донора

K – Константа устойчивости комплекса

L – Лиганд; Линкер (спейсер)

M – Катион металла; Единица измерения концентрации (моль/л)

MeGr – *англ.*, Methyl green, метиловый зеленый

m/z – Отношение массы к заряду (в масс-спектрах)

n – Показатель преломления

NOESY – *англ.*, Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy, Ядерная спектроскопия с эффектом Оверхаузера

PET – *англ.*, Photoinduced Electron Transfer, фотоиндуцированный перенос электрона

PBS – *англ.*, Phosphate-buffered saline, натрий-фосфатный буфер

S – Синглетное состояние; Площадь под спектральной кривой

TICT – *англ.* Twisted Intramolecular Charge Transfer, Внутримолекулярный перенос заряда, приводящий к скрученному состоянию с переносом заряда

δ – Химический сдвиг

ε – Диэлектрическая проницаемость; Коэффициент экстинкции

λ – Длина волны

$\lambda_{\text{макс}}^{\text{погл}}$ – Длина волны максимума поглощения

$\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}}$ – Длина волны максимума флуоресценции

$\lambda_{\text{возб}}$ – Длина волны света возбуждения

τ – Время жизни возбужденного состояния

$\varphi^{\text{фл}}$ – Квантовый выход флуоресценции

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

В последние годы в молекулярной и клеточной биологии, в области биомедицины и биофизики особое внимание уделяется развитию новых методов исследования, основанных на использовании флуоресценции. Одной из причин этого является высочайшая чувствительность флуоресцентных методов, которая зачастую превосходит не только чувствительность методов, основанных на поглощении света, но и методов, базирующихся на использовании радиоактивных изотопов. Действительно, современные инструменты и методики позволяют регистрировать флуоресцентный сигнал даже от отдельных молекул, что способствовало появлению и развитию метода одномолекулярной флуоресцентной спектроскопии, широко востребованного для исследования отдельных молекул в их динамике.

Малые флуоресцентные молекулы являются незаменимыми инструментами в биологии, они повсеместно используются в качестве молекулярных зондов, индикаторов окружающей среды и клеточных красителей [1–5]. Выбор подходящего флуорофора для визуализации биохимического или биологического процесса может быть сложной задачей, учитывая огромное количество молекул, доступных либо коммерчески [6], либо в результате разработки и синтеза *de novo*.

Молекула-метка может содержать реакционноспособную функциональную группу для ковалентного присоединения к представляющей интерес биомолекуле. С другой стороны, нефункционализируемая маркерная молекула способна демонстрировать сильное нековалентное взаимодействие с биомолекулой, что делает возможным образование стабильного комплекса. Нековалентное мечение биомолекул может включать ионные, электростатические, гидрофобные взаимодействия и связывание с помощью водородных связей. Хотя взаимодействия при нековалентном мечении значительно менее прочны, чем ковалентные связи, они происходят с большей скоростью и в физиологических условиях. Стадии очистки образовавшихся комплексов обычно не нужны, особенно если нековалентное мечение используется в сочетании с таким методом разделения, как капиллярный электрофорез. Другим недостатком ковалентного мечения является то, что к биомолекуле может быть присоединено различное количество молекул красителей, что может приводить к уширению сигнала на электрофореграмме [7].

Степень разработанности темы исследования

Одними из используемых классов флуорофоров для биологии и медицины служат цианиновые и стироловые красители. Они нашли применение в том числе и в качестве красителей, нековалентно связывающихся с биологическими молекулами. При использовании

данных красителей для нековалентного флуоресцентного мечения применяется эффект увеличения интенсивности флуоресцентного отклика, наблюдаемый в некоторых флуорогенных красителях при иммобилизации. В свободном, неиммобилизованном состоянии такие красители слабо флуоресцируют из-за наличия каналов безызлучательной релаксации возбужденного состояния, таких как образование нефлуоресцирующих «скрученных» ПИСТ-состояний (англ. Twisted Intramolecular Charge Transfer state) в полярных средах или *E-Z*-изомеризация по двойной С=С связи. В обоих случаях усиление флуоресценции может наблюдаться в полостях белков, способных затруднять внутреннее вращение или изомеризацию, как это было показано в ранних работах по получению антител, индуцирующих флуоресценцию флуорогенных молекулярных роторов [8] и *транс*-стильбенов [8–10].

В настоящей диссертационной работе предметом исследования стали моно- и бисстириловые красители. Их характеристики соответствуют требованиям, предъявляемым к флуоресцентным реагентам, используемым для биохимических и медицинских целей. К ним относятся высокий квантовый выход флуоресценции, большой Стоксов сдвиг, высокая фотостабильность и низкая цитотоксичность. Кроме того, стириловые красители отличаются более простыми и доступными методами синтеза и высокой фотостабильностью по сравнению с широко используемыми в настоящее время цианиновыми красителями.

Цели и задачи работы

В ходе диссертационного исследования преследовались следующие цели:

1. Разработка методов получения новых моно- и бисстириловых производных различного состава и строения. Изучение их оптических и фотофизических свойств.
2. Исследование возможности использования фотоиндуцированного переноса энергии в структуре краун-содержащего бисхромофорного стирилового производного для распознавания различных катионов металлов в растворах и клетках.
3. Изучение взаимодействия бисстириловых производных, хромофоры которых соединены между собой через гетероциклические фрагменты (тип «голова к голове»), с ДНК. Анализ влияния структуры бисстириловых красителей на образование ДНК-индуцированных агрегатов.
4. Изучение окрашивания ДНК и РНК бисстириловыми красителями, хромофоры которых соединены через гетероциклический и *O*-фенильный фрагмент (тип «голова к хвосту»), в растворах и клетках.

Научная новизна

Разработаны методы синтеза неописанных ранее моностириловых производных, гомодимерных и гетеродимерных бисстириловых красителей.

Показано влияние комплексообразования краун-содержащего бисстирилового красителя с различными катионами металлов на оптические характеристики и протекание фотоиндуцированного переноса энергии между хромофорными фрагментами молекулы.

При взаимодействии с дц-ДНК симметричных бисстириловых красителей, хромофорные фрагменты которых были соединены через гетероциклический фрагмент, обнаружено образование агрегатов различной хиральности.

В работе впервые изучено взаимодействие бисстириловых красителей типа «голова-к-хвосту» с дц-ДНК тимуса теленка и РНК печени теленка. Обнаружены несимметричные бисстириловые красители, способные демонстрировать флуоресцентный отклик на присутствие ДНК, находящейся в смеси с РНК.

Найден и количественно охарактеризован фотоиндуцированный перенос энергии в несимметричных бисстириловых красителях, протекание которого сохраняется в комплексе с катионами металлов, с биомолекулой, а также во внутриклеточной среде.

На серии соединений одного состава, но с различной организацией стириловых фрагментов, выявлено влияние структурной организации бисстириловых красителей на связывание с ДНК.

Практическая и теоретическая и значимость

Результаты проведенных исследований показали, что полученный краун-содержащий бисстириловый краситель может использоваться для распознавания катионов металлов различной природы и ратиометрического детектирования ионов Hg^{2+} в живых клетках A549.

Синтезированные бисстириловые красители при связывании с ДНК демонстрировали значительное разгорание флуоресценции, что свидетельствует о перспективности предложенных структур в качестве флуоресцентных маркеров для детектирования ДНК.

Бисстириловые красители типа «голова к хвосту» демонстрировали большую селективность при связывании с ДНК, чем с РНК и низкую токсичность, и могут использоваться для визуализации ДНК *in vitro*.

Методология и методы диссертационного исследования

Методология и методы диссертационного исследования основаны на анализе литературных данных, разработке методов синтеза из коммерчески доступных реагентов. Все полученные соединения были охарактеризованы с использованием физико-химических методов анализа, включая 1H , ^{13}C ЯМР спектроскопию, в том числе двумерную, электронную спектроскопию и масс-спектрометрию.. Комплексообразование синтезированных лигандов с катионами металлов и ДНК/РНК изучалось с использованием оптической, КД- и ЯМР- спектроскопии, для расчета констант устойчивости комплексов использовали программу SpecFit-32. Для анализа взаимодействия красителей с ДНК были проведены квантово-химические расчеты с

использованием молекулярной динамики. Синтезированные красители исследовались в биологических экспериментах *in vitro* на клетках A549.

Основные положения, выносимые на защиту

- Условия получения и синтез новых моностириловых производных, гомо- и гетеродимерных бисстириловых красителей различного состава и строения.
- Краун-содержащий бисстириловый краситель как сенсор для распознавания различных катионов металлов в среде ацетонитрила и для количественного определения ионов ртути в водной среде и *in vitro*.
- Использование FRET-процесса между хромофорами для создания красителей с большим Стоксовым сдвигом для биовизуализации.

Бисстириловые красители как эффективные зонды для распознавания биомолекул ДНК/РНК.

Личный вклад автора

Автор диссертации участвовал в анализе литературных данных, обсуждении задач, решаемых в диссертационной работе, подготовке и проведении экспериментов, разработке методик синтеза новых соединений, интерпретации полученных результатов и их обобщении, формулировке основных научных выводов, а также в написании научных публикаций и представлении докладов по теме диссертации на конференциях различного уровня.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 18-33-20111, 19-03-00535, 19-03-00625, 20-33-90307, РФФИ № 16-13-10226, 17-73-30036, 19-73-20187, 21-73-20158.

Автор выражает особую благодарность к.х.н. Панченко П.А., к.х.н. Рулевой А.Ю., к.х.н. Бердниковой Д.В. за участие в постановке экспериментов и обсуждении полученных результатов на разных этапах работы; к.х.н. Цветкову В.Б. за проведение молекулярного моделирования; к.х.н. Павловой М.А., к.х.н. Алиеву Т.М. за помощь в проведении ЯМР-исследований; к.х.н. Токареву С.Д. за проведение электрохимических исследований; Ефременко А.В., д.х.н. Феофанову А.В., Чмелюк Н.С. и к.х.н. Абакумову М.А. за проведение биологических исследований.

Достоверность полученных результатов

Достоверность полученных в работе результатов следует из надежного установления структур полученных в работе соединений совокупностью физико-химических методов анализа; отсутствия противоречий между выводами, сделанными в результате выполнения работы, и известными литературными данными; экспертной оценки рецензентов высокоцитируемых журналов, в которых были опубликованы результаты данной работы.

Апробация работы

По материалам диссертации опубликовано 9 статей (6 – в научных изданиях, рекомендованных ВАК, 3 – в журнале, включенном в РИНЦ) и 12 тезисов докладов. Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях: 2nd International Symposium “Noncovalent Interactions in Synthesis, Catalysis, and Crystal Engineering” (Москва, Россия, 2022); Самоорганизация в «мягких» средах: достижения и современное состояние (Москва, Россия, 2022); XXIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов–2022» (Москва, Россия, 2022); VII Международная конференция «Супрамолекулярные системы на поверхности раздела» (Туапсе, Россия, 2021); The XII International Conference on Chemistry for Young Scientists «MENDELEEV 2021» (Санкт-Петербург, Россия, 2021); International Conference "Chemistry of Organoelement Compounds and Polymers 2019" (Москва, Россия, 2019); XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Санкт-Петербург, Россия, 2019); 1st International Conferences on Noncovalent Interactions (ICNI-2019) (Лиссабон, Португалия, 2019); VIII Молодежная конференция ИОХ РАН (Москва, Россия, 2019); Кластер конференций 2018 "Solvation, Crystallization, Smart materials" (Суздаль, Россия, 2018); IX международная конференция "Инновации в химии: достижения и перспективы" форума студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов - 2018" (Москва, Россия, 2018); 16th International seminar on inclusion compounds (ISIC 16) and 3rd Youth school on supramolecular and coordination chemistry (Казань, Россия, 2017).

Объем и структура работы

Диссертация общим объемом 160 страниц состоит из вводной части, содержащей общую характеристику работы, литературного обзора, обсуждения полученных результатов, экспериментальной части, выводов, списка литературы, списка основных сокращений и обозначений, списка публикаций автора по теме диссертации и содержит 88 схем, 7 таблиц, 40 рисунков. Список литературы включает 211 наименований (с учетом собственных публикаций автора). Нумерация схем, рисунков, уравнений и таблиц в разделах 2 (Литературный обзор), 3 (Обсуждение результатов) и 4 (Экспериментальная часть), а также нумерация соединений в разделах 2 и 3 принята отдельной.

2. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

В настоящем обзоре представлены основные классы органических флуоресцентных красителей, применяемых для нековалентного мечения биомолекул и внутриклеточных органелл, рассмотрены фотофизические свойства красителей и их комплексов.

2.1. Антрахиноновые красители

Антрахиноны (9,10-диоксоантрацены) составляют важный класс природных и синтетических соединений с широким спектром применения. Их структура основана на жесткой плоской трехкольцевой ароматической системе антрацена, которая содержит две кетогруппы в 9-м и 10-м положениях (Схема 1). Структура антрахинонов позволяет им встраиваться между парами азотистых оснований ДНК, поскольку общей чертой почти всех интеркалирующих агентов является плоская структура с полиароматическими системами[11]. Такие структурные элементы, способствующие высокому сродству к ДНК, также наблюдаются у проникающих в клетки антрациклиновых антибиотиков[12].

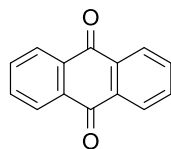


Схема 1

ДНК является важнейшим биополимером для хранения, репликации и передачи генетической информации в биологических системах, в значительной степени контролирующей жизненный процесс. Изучение механизма взаимодействия малых молекул с ДНК важно не только для фундаментальных исследований, но и для практического применения многих лекарств и флуорофоров. Для объяснения механизма взаимодействия между антрахиноновыми лигандами и ДНК в ряде работ проводились исследования их связывания с использованием различных физико-химических методов. В работах [13,14] была синтезирована серия антрахиноновых производных **1 - 6** (Схема 2) и изучено их взаимодействие с ДНК тимуса теленка и синтетическими НК (Poly[dA].Poly[dT]) и (Poly[dG].Poly[dC]). По сдвигам и уширениям сигналов на ЯМР-спектрах комплексов лигандов с биомолекулами было качественно подтверждено их взаимодействие с биомолекулой. Анализ результатов спектрофотометрического титрования показал, что взаимодействие с биомолекулой происходит двумя способами, а именно, краситель может интеркалировать или связываться на поверхности НК, что было также подтверждено методами молекулярного моделирования. Также была продемонстрирована большая селективность лигандов к участкам НК, богатых А-Т парами оснований ($K=4.9 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$).

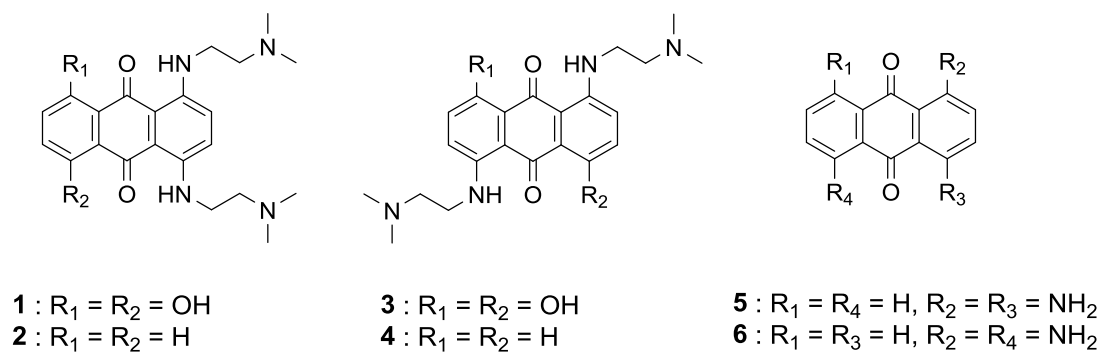


Схема 2

В работе [15] исследовали взаимодействие хинизарина (**7**) и дантрона (**8**) (Схема 3) с двухцепочечной ДНК тимуса телят методами спектрофлуориметрии и циклической вольтамперометрии. По данным спектрофотометрического титрования были рассчитаны константы связывания с ДНК при различных температурах. Кроме того, были исследованы механизмы связывания с ДНК и влияние ионной силы раствора на флуоресцентные свойства системы. Результаты исследований показали, что антрахиноновые производные связываются путем залегания в бороздку ДНК. Эксперименты по цитотоксичности показали, что такие соединения незначительно расщепляют плазмидную ДНК pUC18 и проявляют некоторую противоопухолевую активность в отношении клеточной линии K562 (хронический миелоидный лейкоз человека).

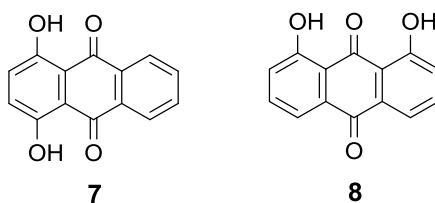


Схема 3

Оптические характеристики антрахинонов способствуют их эффективности в качестве флуоресцентных ДНК-связывающих красителей. Красители на основе антрахинона, такие как DRAQ5 (**3**), отличаются высокой фотостабильностью. Хотя антрахиноновое ядро само по себе не обладает высокой фотостабильностью, введение в структуру красителей различных заместителей может значительно повысить их стабильность.[16] Примерами коммерчески доступных антрахиноновых красителей являются DRAQ5 (**3**), DRAQ7 и CyTRAK Orange.

DRAQ5 представляет собой ДНК-специфичный бисалкиламиноантрахинон, флуоресцирующий в дальней красной области спектра (Схема 4). Он обладает высокой проницаемостью для клеток (проникает как через плазматические, так и через ядерные мембраны) и эффективен при окрашивании живых и фиксированных клеток. DRAQ5 имеет максимум спектра поглощения при 646 нм и максимум эмиссии при 681 нм.[12] При

интеркаляции между парами оснований ДНК максимум эмиссии батохромно сдвигается до 697 нм.

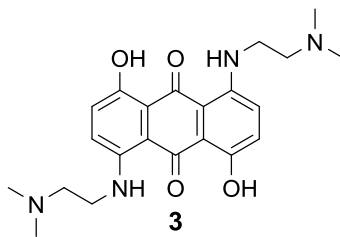


Схема 4

Было обнаружено, что DRAQ5 способен взаимодействовать с ДНК не только путем интеркаляции, но и путем залегания в малую бороздку ДНК, особенно с последовательностями АТ. Было установлено, что взаимодействие с ДНК зависит от концентрации: при низких концентрациях, менее 0,5 μM , DRAQ5 связывается с биомолекулой путем залегания в малую бороздку, а при высоких концентрациях, более 0,5 μM , лиганд интеркалирует между парами оснований ДНК. [17]

Несмотря на то, что флуоресценция DRAQ5 находится в биологическом окне и то, что данный краситель обладает высокой фотостабильностью, его недостатком является низкий квантовый выход флуоресценции, равный в растворе 0.003, который лишь незначительно увеличивается при связывании с ДНК до 0.004, небольшой Стоксов сдвиг (менее 30 нм) а также высокий уровень цитотоксичности.[12,18,19] В работе [20] исследовали механизм цитотоксичности DRAQ5 в живых клетках HeLa (раковая опухоль шейки матки). Проникающий через мембрану DRAQ5 в концентрации 1 μM проявлял ядерную локализацию и вызывал микроскопически обнаруживаемые изменения архитектуры ядра. После интеркаляции DRAQ5 в спираль ДНК наблюдалась агрегация комплексов хроматина. При более высоких концентрациях (3 и 7.5 μM) DRAQ5 мешал связыванию ядерных гистонов H2B с ДНК.

DRAQ7, структура которого является коммерческой тайной, представляет собой производное красителя DRAQ5, обладающее рядом отличительных свойств. Краситель DRAQ7 не проникает в плазматическую мембрану живых клеток, однако, как только целостность мембраны нарушается, он легко связывается с ядерной ДНК и, таким образом, сообщает о гибели клетки.[21] Поскольку DRAQ7 встраивается только в ДНК мертвых или пермеабилizированных клеток, его использование позволяет проводить анализ жизнеспособности клеток в режиме реального времени. Он имеет максимумы поглощения при 599/644 нм и эмиссии при 678/697 нм.[22,23]

CyTRAK Orange был получен Errington et al. в 2006 году химической модификацией DRAQ5.[24] Он имеет значительно большую скорость связывания с цитоплазматической РНК, позволяя визуализировать цитоплазму клетки более ярко, чем DRAQ5. Как и DRAQ5, CyTRAK

Orange обладает высокой проникаемостью в живые и мертвые клетки, но из-за высокого связывания с РНК теряет способность к определению содержания ДНК (за исключением клеток, обработанных РНКазой).[19] Он имеет максимум поглощения при 510 нм и максимум эмиссии при 610 нм.

Помимо использования в качестве красителей, производные антрахинона длительное время применялись в медицине, например, в качестве слабительных, противомикробных и противовоспалительных средств.[25] Производные антрахинона представляют собой исключительно ценный класс соединений при разработке противоопухолевых препаратов. Известные препараты на основе антрахинона митоксантрон (**9**), пиксантрон (**10**) (Схема 5) успешно используются для лечения различных видов рака.

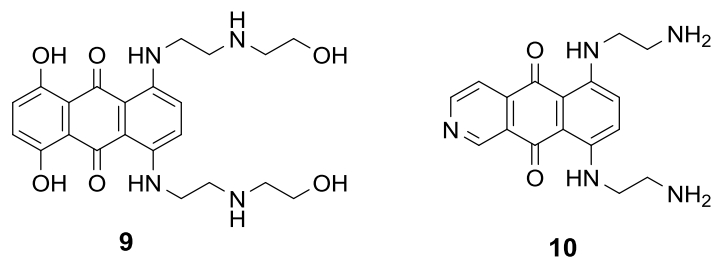
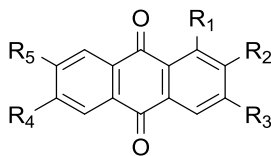


Схема 5

Митоксантрон (**9**) в основном используется для лечения лейкемии, лимфомы, рака молочной железы и рака предстательной железы. В 2000 г. препарат был одобрен FDA для лечения рассеянного склероза из-за его иммуносупрессивного действия.[26] Плоская структура митоксантрона вместе с его функциональными группами в зависимости от концентрации позволяет ему взаимодействовать путем интеркаляции или залегать в бороздку ДНК.[17] Такой механизм связывания не позволяет ферменту ДНК-топоизомеразе II раскручивать двойную спираль ДНК, тем самым ингибируя репликацию ДНК.[27] Также митоксантрон демонстрирует слабую флуоресценцию с максимумом эмиссии при 685 нм.[28] Пиксантрон (**10**) – противораковый препарат, лицензированный в Европе в качестве монотерапевтического средства для рефрактерных агрессивных случаев неходжкинских В-клеточных лимфом.[29]

Некоторые производные антрахинона также продемонстрировали противомикробное действие. Например, молекулы соранджидиола (**11**), рубиадина (**12**), дамнантала (**13**) (Схема 6) были выделены из *Heterophyllaea pustulata*, разновидности кустарника, и проявляли антибактериальную активность против *Staphylococcus aureus*. [30]



- 11** : $R_1 = R_4 = \text{OH}$, $R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = R_5 = \text{H}$
12 : $R_1 = R_3 = \text{OH}$, $R_2 = \text{CH}_3$, $R_4 = R_5 = \text{H}$
13 : $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{CHO}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = R_5 = \text{H}$

Схема 6

Таким образом, можно сделать вывод, что производные антрахинона обладают широким спектром биомедицинского применения не только в качестве флуорофоров для окрашивания ДНК, но и в качестве противораковых агентов.

2.2. BODIPY – красители

Бор-дипиррометен, 4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен (BODIPY) (Схема 7) является одной из самых популярных структур красителей благодаря широкому применению в промышленности и медицине.[31,32] Их отличительные оптические свойства, такие как узкие полосы поглощения и эмиссии, небольшой Стоксов сдвиг, высокий коэффициент экстинкции, большие значения квантового выхода флуоресценции, фотостабильность, объясняют их перспективность и популярность в качестве флуорофоров для визуализации биомолекул.[33] Механизмы взаимодействия BODIPY-производных с биомолекулами и сопровождающие их спектральные изменения представляют большой интерес для фундаментальной науки и практических приложений.

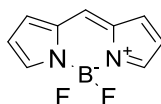
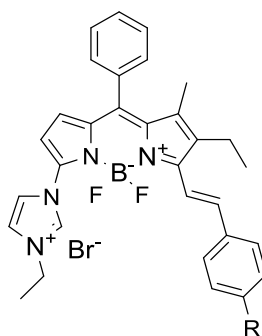


Схема 7

В литературе мало примеров исследования красителей BODIPY в качестве интеркаляторов для ДНК, несмотря на их плоскую структуру и исключительные оптические свойства. Одна из таких работ [34] представлена коллективом авторов из Китая, синтезировавших заряженные производные BODIPY **14** и **15** (Схема 8). Авторы исследовали механизм взаимодействия лигандов с ДНК тимуса теленка с использованием методов оптической спектроскопии. Гипохромный эффект спектров поглощения красителей при добавлении ДНК, а также падение интенсивности положительной полосы КД-спектра ДНК позволили исследователям сделать вывод об интеркаляционном способе взаимодействия с биомолекулой. Интересным фактом является разгорание флуоресценции красителей при взаимодействии с ДНК (квантовый выход флуоресценции увеличился от 0.001 до 0.07 для **14** красителя и от 0.03 до 0.15 для **15** красителя), что не всегда характерно для флуорофоров – интеркаляторов. Хотя полученные

соединения продемонстрировали низкие квантовые выходы флуоресценции, данные исследования могут оказаться полезны для будущих разработок флуоресцентных BODIPY-зондов для ДНК.

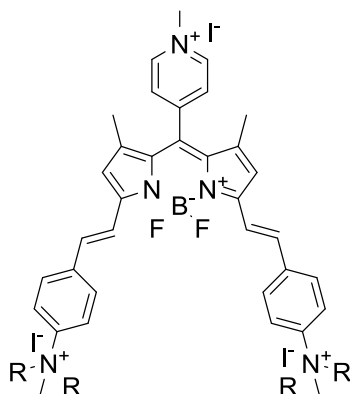


14: R = N(CH₃)₂

15: R = OCH₃

Схема 8

В публикации [35] также представлены исследования взаимодействия водорастворимых BODIPY-производных **16** и **17** (Схема 9) с тт-ДНК. По данным спектрофотометрического титрования были рассчитаны константы устойчивости комплексов, которые составили $1.80 \cdot 10^6$ и $1.79 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ для соединений **16** и **17** соответственно. Интеркаляционный тип взаимодействия с ДНК был подтвержден с помощью экспериментов по вытеснению из комплекса с биомолекулой этидиумбромидом: при добавлении BODIPY-производных наблюдалось заметное тушение флуоресценции комплекса с этидиумбромидом. Эксперименты по определению нуклеазной активности на плазмидной ДНК проводили с использованием электрофореза на агарозном геле. Полученные результаты показали, что соединения почти неактивны как в темноте, так и при световом облучении. Однако, полученные соединения проявили умеренное фототоксическое действие при облучении светом.



16: R = Me

17: R = Et

Схема 9

В литературе представлены исследования, где в качестве биомолекулы использовался бычий сывороточный альбумин (БСА). В работе [36] была разработана серия BODIPY-производных **18-32** (Схема 10) с различными донорными заместителями, флуоресцентный отклик которых зависел от полярности растворителя. Данный эффект объясняется легкостью протекания PET-процесса в высокополярных средах и его низкой эффективностью в неполярных средах. Оптические свойства таких структур сильно зависят от окружающей среды, порог включения/выключения флуоресцентного отклика соответствует разным уровням полярности растворителя. Было показано, что такие производные можно использовать для оценки полярности на поверхности БСА и на внутренних мембранах клеток HeLa. Таким образом, полученные структуры продемонстрировали перспективность использования для обнаружения изменений локальной полярности в самых разных биологических образцах, включая белки, мембраны и рецепторы.

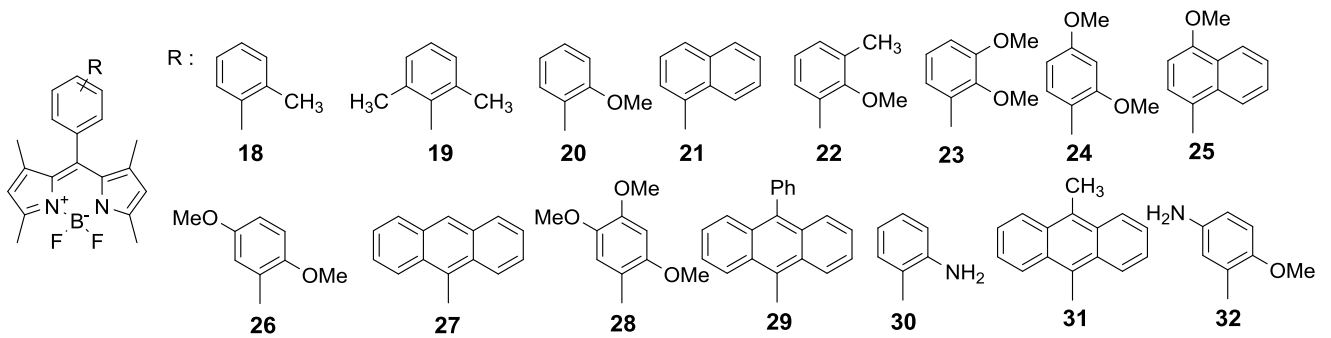


Схема 10

Коллективом российских авторов также было обнаружено, что 8-арильные производные BODIPY **33-39** (Схема 11) обладают сильным флуоресцентным откликом при добавлении белка.[37] Ранее авторами была синтезирована серия BODIPY-производных и изучены их оптические свойства в различных растворителях.[38] Было обнаружено, что интенсивность флуоресценции красителей растет при увеличении полярности растворителя, что может быть объяснено высокой гидрофобностью исследуемых соединений. Далее с использованием методов спектрофотометрии, а также молекулярного докинга проводили исследования взаимодействия серии комплексов BODIPY с БСА. Результаты флуоресцентной спектроскопии показали, что при связывании красителя в гидрофобных полостях БСА интенсивность флуоресценции многократно возрастает. Среди всех зондов 8-фенилзамещенный краситель показал наибольшую чувствительность и количественный флуоресцентный отклик к БСА в водном растворе. Таким образом, BODIPY с 8-фенильным заместителем или аналогами можно использовать в качестве сенсоров полярности поверхности белка, в то же время все исследованные красители с объемными ароматическими группами можно использовать в качестве гидрофобных молекулярных меток и маркеров для задач биовизуализации.

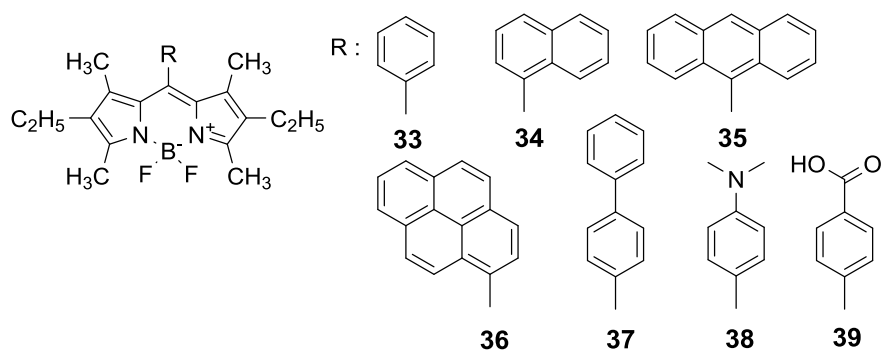


Схема 11

В работе [39] были разработаны и синтезированы три BODIPY-красителя **40-42** (Схема 12), содержащие пиридинтрифениламиновые фрагменты. Для незаряженных красителей в растворе ТГФ максимум спектра флуоресценции располагался в области 643 нм для соединения **40** ($\varphi^{\text{фл}} = 0.05$) и 631 нм для соединения **41** ($\varphi^{\text{фл}} = 0.16$). Спектр флуоресценции красителя **42** в этаноле характеризовался максимумом при 624 нм и квантовым выходом флуоресценции $\varphi^{\text{фл}} = 0.10$. При изучении флуоресцентных свойств в смеси растворителей было обнаружено, что красители способны проявлять агрегат-индуцированную эмиссию. Эта необычная характеристика позволила изучить его применение в качестве сенсора на БСА. В белковой среде красители показали многократное усиление интенсивности флуоресценции. Краситель **40** был исследован в качестве сенсора для визуализации клеток SK-BR-3 (рак молочной железы), где он показал хорошую проникаемость через мембрану клетки.

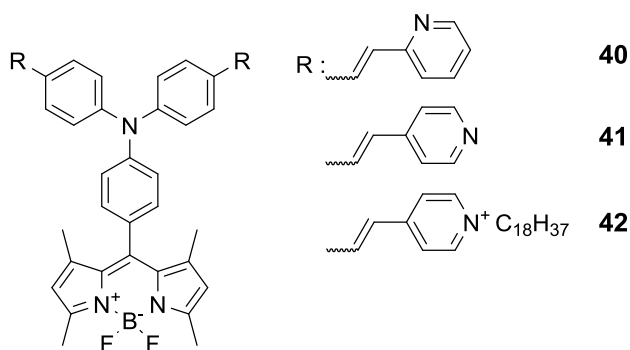


Схема 12

Как показано в работе [39], красители BODIPY способны легко проникать через клеточную мембрану, чему способствует суммарно нейтральный BODIPY-остов. Однако липофильность структуры является причиной накопления BODIPY-производных в субклеточных мембранах.

Недавно синтезированные соединения **43-45** (Схема 13) продемонстрировали низкую цитотоксичность и локализацию в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР).[40] Эксперименты по солокализации со стандартными красителями для внутриклеточных органелл показали, что флуоресцентное окрашивание соединением **46** (Схема 13) также наблюдалось в области ЭР.[41] Бензаннелированные BODIPY-производные **47-52** (Схема 13) проявили локализацию в ЭР

клетки, а, кроме этого, также были обнаружены и в других органеллах, таких как митохондрии, лизосомы и аппарат Гольджи.[42] Структурно-жесткий BODIPY краситель **53** (Схема 13) показал высокую фотостабильность при облучении на длине волны 700 нм и небольшую цитотоксичность по отношению к клеткам НерG2 (гепатоцеллюлярная карцинома человека). Его флуоресцентное окрашивание наблюдалось по всей цитоплазме с несколькими точечными пятнами.[43] Данные примеры показывают, что BODIPY красители без дополнительной функционализации гидрофильными группами проявляют высокую проникаемость через мембраны, но при этом локализуются во внутриклеточных мембранах. Поэтому, для визуализации биомолекул в цитозоле или, в частности, органелл со сниженным неспецифическим фоновым сигналом, красители BODIPY необходимо модифицировать гидрофильными группами, например, карбоксилатной или этиленгликолевой.

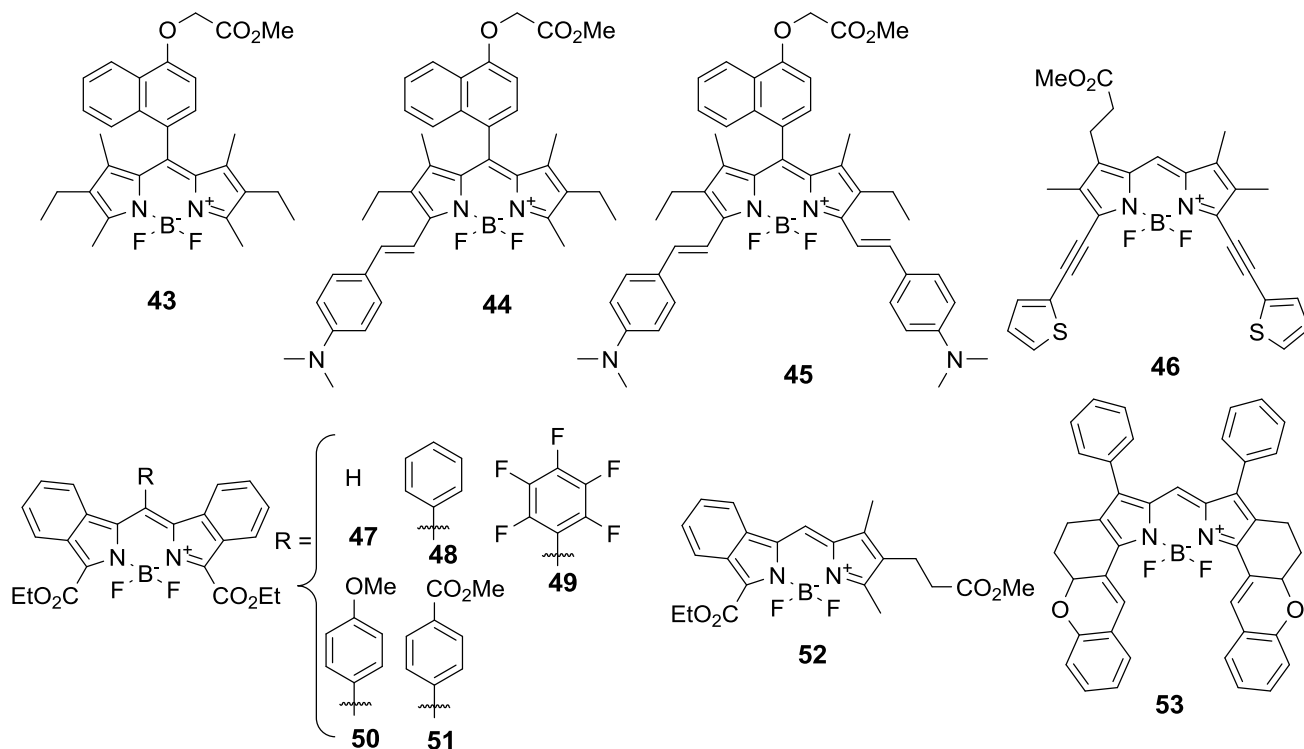


Схема 13

Липофильность структур **43-53** ограничивает их растворимость в воде, что является недостатком для практического применения в биоимиджинге. Для повышения растворимости в воде структуры BODIPY можно модифицировать включением ионного заместителя или объёмного неионногенного фрагмента полиэтиленгликоля, но такие структурные изменения также снижают проникаемость соединений через клеточную мембрану. Для увеличения гидрофильности структуры в работе [44] были разработаны моноалкокси-BODIPY производные **54** и **55** (Схема 14), которые были получены путем селективного замещения одного атома фтора в BODIPY-остове.[45] Соединения **54** и **55** показали достаточную растворимость в воде и в PBS без использования каких-либо сорастворителей или ПАВ. Также примечательно то, что их

флуоресцентные свойства не зависели от изменений pH в растворе. Эксперименты по визуализации живых клеток показали, что моноалкокси BODIPY красители **54** и **55** быстро проникают внутрь клетки и эффективно вымываются.

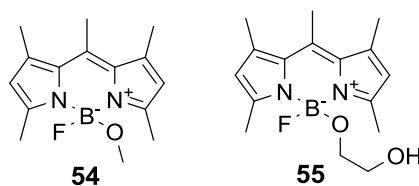


Схема 14

С другой стороны, в работе [46] Ву и его коллеги сообщили об интересной взаимосвязи между липофильностью красителя BODIPY и проницаемостью через клеточную мембрану. Красители BODIPY **56** и **57** (Схема 15) содержат как анионные карбоксилатные, так и тетраэтиленгликолевые группы. Поэтому считалось, что эти красители не могут проникать через клеточные мембраны. Однако соединение **57** показало способность проникать и диффундировать в клетке, в то время как в клетках HeLa, обработанных соединением **56**, сигнала флуоресценции не наблюдалось. Следовательно, замена бензольного фрагмента на нафталин влияет на проницаемость красителей BODIPY внутрь клетки. Эти исследования демонстрируют важность баланса между липофильностью, гидрофильностью и общим зарядом структуры красителя.

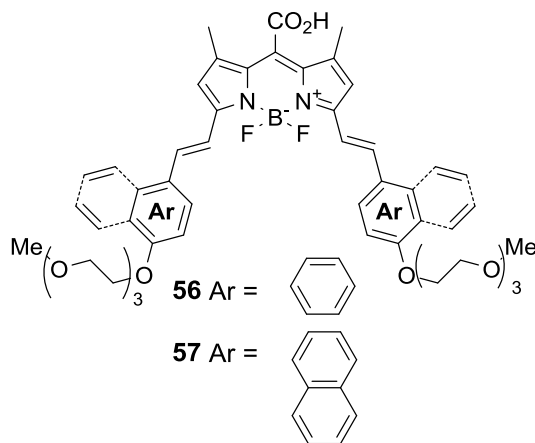


Схема 15

Как правило, положительно заряженные молекулы имеют тенденцию взаимодействовать с митохондриями, чему способствует отрицательный электростатический потенциал мембраны этих органелл. В случае нейтрального красителя BODIPY специфическое окрашивание митохондрий может быть достигнуто путем введения в структуру катионного фрагмента, такого как аммониевая или фосфониевая группа (Схема 16).[47–49] Соединения **58** и **59** содержат кватернизованный пиридиновый фрагмент, который способствует повышенной растворимости в воде, а также селективности взаимодействия с митохондриями. Эти красители

проявляют более высокую фотостабильность по сравнению с коммерчески доступными красителями для митохондрий.[47,48] Фрагмент фосфония и триэтиламония также способствует локализации красителей **60**, **61** (Схема 16) в митохондриях.[49] Эти катионные фрагменты могут быть легко получены прямым синтезом из соответствующих им амина или фосфония. Красители продемонстрировали низкую цитотоксичность и высокую фотостабильность.

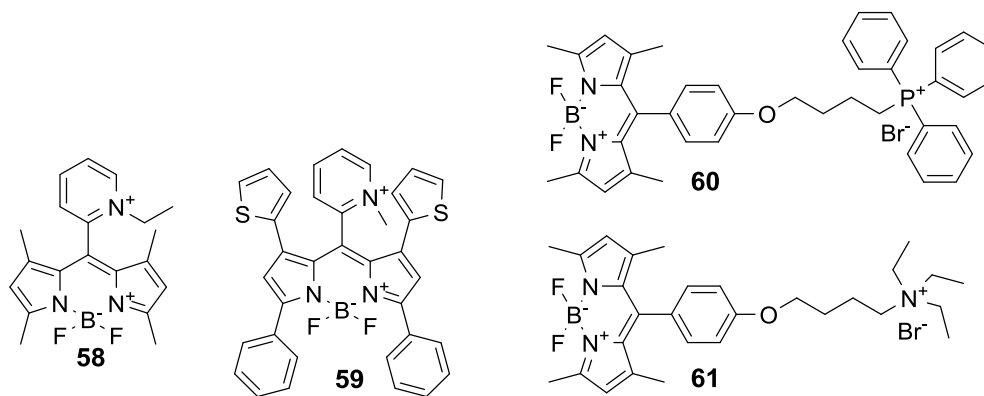


Схема 16

Также в литературе имеются примеры BODIPY-красителей, локализующихся в лизосомах. Так в работе [50] был разработан сенсор лизосомальной вязкости **62** (Схема 17). Для улучшения растворимости в структуру BODIPY-остова был введен гидроксихинолиниевый фрагмент, индолининметеновый фрагмент был введен для смещения спектров поглощения и эмиссии в красную область, а также для создания молекулярного ротора. Модификацию морфолиновым фрагментом проводили для селективной локализации красителя в лизосомах клетки. С использованием спектрофлуориметрии было показано, что интенсивность флуоресценции красителя **62** линейно зависит от значений вязкости растворителей. Кроме того, **62** продемонстрировал стабильный флуоресцентный отклик в растворах с различным pH при заданной вязкости смесей, что позволяет предположить, что полученный краситель пригоден для применения при физиологическом диапазоне pH. Биологические эксперименты на клетках Bel-7402 показали, что BODIPY-производное **62** может визуализировать изменения вязкости лизосом в режиме реального времени без помех со стороны макромолекул, белков, биотиола, катионов и анионов. Примечательно, что время жизни флуоресценции соединения **62** положительно коррелирует с вязкостью высоковязких смесей. Полученные результаты показывают, что BODIPY-производное **62** является многообещающим инструментом для обнаружения изменений вязкости *in vitro* и живых клеток.

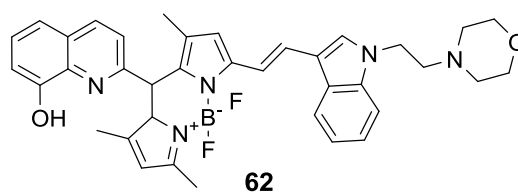


Схема 17

На рынке представлены несколько BODIPY-производных для мечения лизосом: Lyso-Tracker Green DND-26 (**63**) и Lyso-Tracker Red DND-99 (**64**) (Схема 18).[51,52] Красители локализуются в кислых компартаментах (лизосомах) живых клеток. Как правило, зонды Lyso-Tracker состоят из флуорофора, связанного со слабым основанием, которое может частично протонироваться при нейтральном pH. Это позволяет зондам Lyso-Tracker свободно проникать через клеточные мембраны. Lyso-Tracker Green имеет максимум поглощения при 504 нм и максимум эмиссии при 511 нм, LysoTracker Red имеет соответствующие максимумы при 577нм и 590нм.

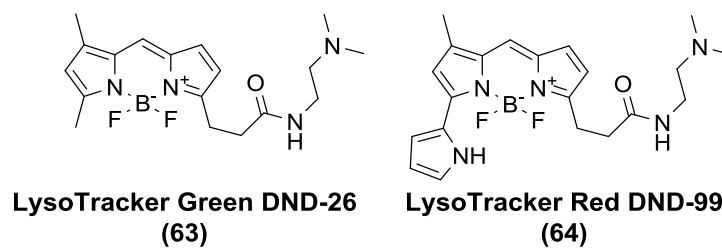


Схема 18

ER-Tracker Green (**65**) и ER-Tracker Red (**66**) (Схема 19) также являются коммерчески доступными BODIPY-красителями для эндоплазматического ретикула (ЭР).[53,54] Структуры данных красителей содержат фрагмент сульфонилмочевины – глибенкламид, который связывается с соответствующими АТФ-чувствительными калиевыми каналами, расположенными в ЭР. Фармакологическая активность глибенкламида потенциально может влиять на функцию ЭР. Недостаток данных красителей заключается в том, что переменная экспрессия рецепторов сульфонилмочевины в некоторых специализированных типах клеток может привести к мечению не-ЭР. ER-Tracker Green имеет максимум поглощения при 504 нм и максимум эмиссии при 511 нм, ER-Tracker Red имеет соответствующие максимумы при 587нм и 615нм.

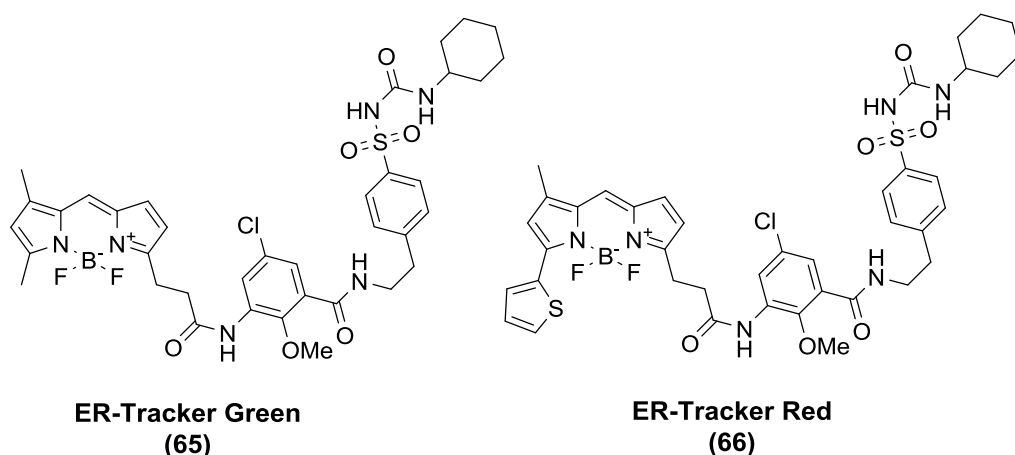


Схема 19

Использование BODIPY-производных в биологии не ограничивается нековалентным мечением внутриклеточных органелл. Конъюгация BODIPY-остова с различными рецепторными фрагментами дает возможность получения сенсоров для различных внутриклеточных катионов и анионов, активных форм кислорода, азота. Примеры таких конъюгатов представлены в нескольких обзорах.[33,55]

2.3. Карбазоловые красители

Исходная структура карбазола характеризуется жестким кольцевым каркасом, хорошей планарностью, наличием электронодонорного гетероатома (Схема 20), что определяет его интересные оптические характеристики и биосовместимость. Несмотря на свои преимущества, его применение в биовизуализации ограничено ввиду нескольких недостатков. Например, длина волны возбуждения карбазола при 237 нм может вызывать серьезные повреждения биологических образцов. Более того, эмиссия карбазола при 368 нм пересекается с автофлуоресценцией биологических тканей, снижая отношение сигнал/шум, и ограничивает глубину проникновения сигнала в ткани. Вторым недостатком карбазола является его плохая растворимость, он неплохо растворяется в органических растворителях, но использование таких растворов в биологических экспериментах также вызывает дополнительные повреждения биологических образцов. Таким образом, недостатки оптических характеристик, а также плохая растворимость в воде сильно ограничивают его широкое применение, особенно в биологических системах. Поэтому дизайн, синтез и исследование свойств производных карбазола, лишенных этих недостатков, вызывают большой интерес у химиков и биологов.

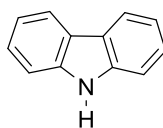
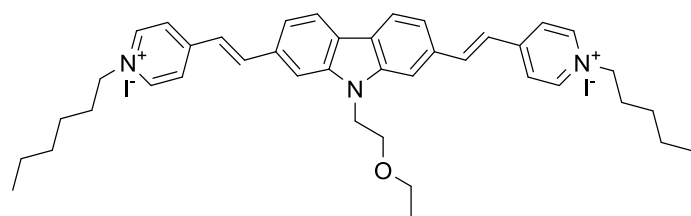


Схема 20

РНК, так же как и ДНК, служит носителем генетической информации, а мутации в структуре РНК могут приводить к различным заболеваниям, поэтому поиск лигандов, взаимодействующих с данной биомолекулой, является чрезвычайно актуальной задачей. Ввиду своей структурной специфичности и гидрофобности РНК способна взаимодействовать с карбазолом. В литературе представлены несколько таких примеров, где карбазоловые производные взаимодействуют с РНК путем интеркаляции, при этом демонстрируя увеличение интенсивности флуоресцентного отклика.

В 2016 г. группой под руководством Liu был разработан уникальный зонд **67** (Схема 21) для детектирования РНК.[56] Интенсивность флуоресценции такого красителя в комплексе с РНК многократно возрастала, поскольку агрегация, свойственная таким структурам в водной среде, при связывании с биомолекулой разрушалась. В водном растворе зонд **67** агрегировал, что сопровождалось слабой флуоресценцией. При добавлении РНК наблюдался гипсохромный сдвиг максимума флуоресценции с 25-кратным увеличением интенсивности при 550 нм. Такие спектральные изменения авторы объясняли интеркаляцией соединения **67** в структуру РНК, поскольку при этом снижается агрегация красителя, сдвигающая спектр эмиссии в синюю область. Интересно отметить, что производное **67** продемонстрировало лучшие оптические характеристики по сравнению с коммерческим зондом SYTO RNA-Select, а именно, более низкий предел обнаружения и более высокую фотостабильность. Эксперименты по биовизуализации показали, что зонд обладает высокой чувствительностью, низкой токсичностью и преимущественно локализуется в цитоплазме и ядрышках клетки. По сравнению с самим карбазолом, производное **67** демонстрирует существенный сдвиг эмиссии в красную область. Для исследования селективности связывания красителя проводили эксперимент по расщеплению РНКазой комплекса с биомолекулой. Результаты показали, что **67** может детектировать эндогенную РНК, при этом не связываясь с ДНК. Кроме того, с использованием зонда **67** впервые удалось визуализировать биомолекулы РНК в ткани печени мыши.



67

Схема 21

В 2018 году данной группой также был разработан зонд **68** (Схема 22) несимметричного строения для одновременного детектирования РНК и H₂S.[57] В свободном виде в водной среде

краситель демонстрировал низкий квантовый выход ($\varphi^{fl} = 0.077$), что может объясняться образованием скрученных ТИСТ-состояний. Однако в присутствии РНК интенсивность флуоресценции многократно возрастала с небольшим гипсохромным смещением до 625 нм, что может быть связано с интеркаляционным взаимодействием красителя **68** с РНК. Примечательно, что несмотря на схожесть структур биомолекул ДНК и РНК, добавление к раствору красителя ДНК не вызывало заметного усиления флуоресцентного отклика. Добавление к раствору красителя H_2S приводило к увеличению интенсивности флуоресценции при 550 нм, при этом на спектрах поглощения наблюдалось смещение полосы индолинииевого хромофора, что может объясняться нуклеофильным присоединением HS^- к индолинию, нарушающее сопряжение в системе двойных связей. В биологических экспериментах производное **68** показало низкую токсичность. Таким образом, в данной работе представлен первый пример дитопного лиганда, способного одновременно детектировать эндогенную РНК и H_2S как в клетках HeLa, так и у рыбок данио. Эксперименты на мышах показали, что зонд **68** проявлял более сильную флуоресценцию у мышей с опухолью, чем у здоровых мышей, что в перспективе может использоваться для диагностики рака.

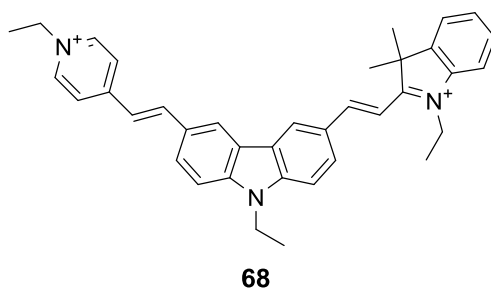


Схема 22

В последнее время работы многих исследователей были посвящены разработке производных карбазола с преимущественной аффинностью связывания с ДНК. В 2019 г. группа Wei сообщила о двух новых хемосенсорах **69**, **70** (Схема 23) для детектирования ДНК.[58] Оба соединения **69** и **70** содержали в структуре карбазоловый фрагмент, поскольку ранее было подтверждено, что производные карбазола стабилизируют теломерную G-квадруплексную ДНК за счет π - π -стэкинг взаимодействий, ограничивающих вращение соединений **69** и **70**. [59,60] Кроме того, включение заместителей также могло оказаться полезной стратегией, поскольку они могут участвовать во взаимодействии с петлями НК или залегать в бороздках G - квадруплекса.[61] Интенсивность флуоресценции зондов **69** и **70** значительно увеличивалась в присутствии различных типов ДНК, что, как утверждают авторы, подтверждает интеркаляцию между парами оснований ДНК. При связывании с ДНК вращение молекул красителей **69** и **70** в возбужденном состоянии становится ограниченным, что также приводит к увеличению времени жизни флуоресценции. Эксперименты по солюкализации красителей в клетке показали, что зонд

69 в основном концентрируется в ядре, а зонд **70** преимущественно окрашивает цитоплазму. Примечательно, что эксперименты по расщеплению комплексов флуорофоров с НК ДНКазой и РНКазой показали, что краситель **69** проявляет большую селективность к ДНК, тогда как краситель **70** может одновременно связываться как с ДНК, так и с РНК.

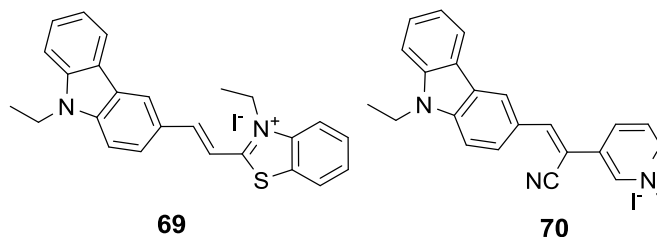


Схема 23

Изменения в структуре митохондриальной ДНК (мтДНК) могут вызывать многие заболевания, связанные с митохондриями, и мониторинг его динамики в клетках важен и необходим для понимания роли мтДНК. В связи с этим Gao et al. разработали новый зонд **71** (Схема 24) для визуализации динамики мтДНК в живых клетках, содержащий в структуре карбазоловый фрагмент.[62] Для увеличения делокализации электронов в 3 и 6 положение карбазола вводили 4-пиридинметеновый и 2-хинолинметеновый фрагменты. Путем кватернизации хинолинииевого фрагмента получали положительно заряженный азот, наличие которого в структуре важно для таргетирования лиганда на митохондрии. Методом спектрофлуориметрического титрования удалось установить факт взаимодействия с мт-ДНК, при этом была получена хорошая линейная зависимость между интенсивностью флуоресценции **71** и концентрацией мтДНК в диапазоне 0.42–2.50 $\mu\text{г}/\text{мл}$. В биологических экспериментах для исследования возможности применения в визуализации динамики мт-ДНК использовали доксорубицин, который является известным противораковым препаратом.[63,64] Этот интеркалятор может стимулировать повреждение ядерной ДНК, но также может эффективно встраиваться в мтДНК живых клеток, приводя к агрегации нуклеотидов и изменяя распределения нуклеотидных белков. После обработки доксорубицином с помощью **71** визуализировали морфологические изменения мтДНК в режиме реального времени. Эксперименты по визуализации показали, что после инкубации с доксорубицином митохондрии имели неправильную форму в виде точек, а затем постепенно агрегировали. Таким образом, предложенный в данной работе карбазоловый краситель может использоваться для мониторинга динамических изменений при повреждении мтДНК, что представляет большой интерес при исследовании заболеваний, связанных с мтДНК.

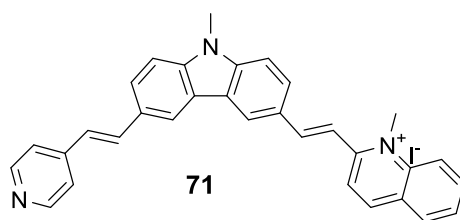


Схема 24

Поскольку карбазол содержит электронодонорный гетероатом азота, его конъюгация с электроноакцепторным фрагментом дает возможность получения ПИСТ-хромофоров. Как и в представленных выше примерах, хромофоры, образующие скрученные состояния с переносом заряда (ПИСТ), часто находят применение для исследований вязкости. В работе [65] были разработаны флуоресцентные зонды **72**, **73** (Схема 25) для определения вязкости в митохондриях. В структуре лигандов в качестве электроноакцепторных групп были выбраны индолиниевые фрагменты. Для улучшения проникаемости в клетку и преимущественной локализации данных флуорофоров в митохондриях атом азота индолина кватернизовали бромэтаном. Изучение оптических свойств красителей в смеси растворителей этанол-глицерин подтвердило выдвинутую при дизайне структуры гипотезу: увеличение вязкости смеси растворителей приводило к увеличению интенсивности флуоресцентного отклика. Также исследовалось влияние внутриклеточных катионов и анионов на флуоресцентный отклик. Было показано, что наличие таких частиц в среде не приводило к тушению сигнала. Наконец, биологические эксперименты по визуализации клеток подтвердили, что зонды локализуются в митохондриях и их можно использовать для мониторинга изменений вязкости.

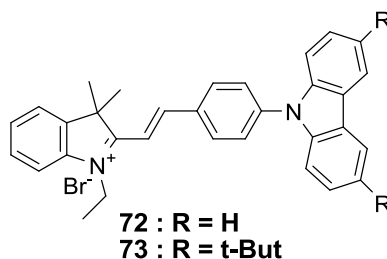


Схема 25

G-квадруплексные ДНК широко распространены в геноме человека и участвуют во многих важных биологических процессах. Однако многие аспекты механизма их влияния на ключевые биологические процессы еще нуждаются в изучении. Поэтому разработка флуоресцентных зондов для обнаружения G-квадруплексов важна для фундаментальных исследований. С целью создания красителей для распознавания G-квадруплексов в работе [66] были синтезированы и изучены два карбазоловых производных **74**, **75** (Схема 26), структуры которых были модифицированы метилпиридинметеновым и метилхинолинметеновым фрагментом по 9-положению. Результаты исследований показали, что различные, но схожие по структуре

гетероциклы, проявляют разную селективность связывания с различным типам ДНК. Краситель **74** с пиридиновой боковой группой может отличить G-квадруплекс от дуплексной и одноцепочечной ДНК, поскольку в присутствии G-квадруплексов наблюдается значительное усиление его флуоресценции, в то время как краситель **75** с хинолиниевой группой показал низкую селективность к этим типам ДНК. Для подтверждения селективности, чувствительности и механизма связывания с G-квадруплексными ДНК были дополнительно исследованы свойства **74** с помощью УФ-видимой спектрофотометрии, спектрофлуориметрии, кругового дихроизма и молекулярного докинга. Эксперименты КД показали, что **74** способен взаимодействовать с G-квадруплексами, не изменяя их топологию. Было установлено, что **74** залегает в область борозды структуры G-квадруплекса и проявляет более высокую аффинность связывания с антипараллельными структурами G-квадруплекса. В результате исследований исследователям удалось выделить некоторые важные факторы для разработки эффективных зондов для распознавания G-квадруплексной ДНК.

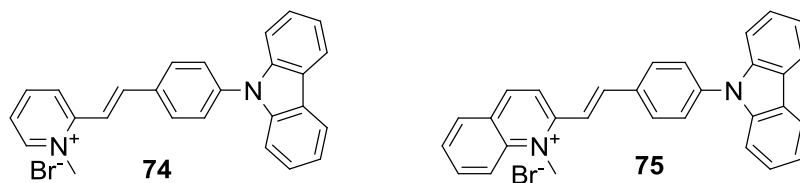


Схема 26

Коллективом китайских авторов был разработан карбазоловый лиганд **76** (Схема 27), в структуре которого карбазоловый остов был модифицирован по 3-му положению хинолинметеновым фрагментом.[67] Структура лиганда была также модифицирована фрагментом фенилбороновой кислоты, который может улучшать эффективность связывания с ДНК за счет образования водородных связей и π - π -стэкинга. Аффинность связывания и селективность в отношении теломерной G-квадруплексной ДНК определяли с помощью флуоресцентной спектроскопии, спектрофотометрического титрования, КД-спектроскопии и молекулярного докинга. Было обнаружено, что краситель **76** проявляет большой гипохромизм и батохромизм спектров поглощения и значительное усиление флуоресценции при связывании с G-квадруплексной ДНК, в то время как при взаимодействии с дуплексной ДНК показывает незначительные изменения. Исследования КД показали, что **76** проявляет способность в некоторой степени стабилизировать структуру ДНК G-квадруплекса. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что лиганд **76** обладает более высокой аффинностью и селективностью в отношении теломерного G-квадруплекса по сравнению с дуплексной ДНК. Исследования механизма взаимодействия показали, что краситель **76** взаимодействует с G-квадруплексом ДНК в основном путем концевое стэкирования. С использованием

конфокальной флуоресцентной микроскопии была определена локализация красителя в цитоплазме живых клеток.

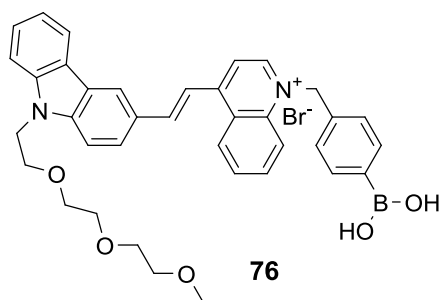


Схема 27

В литературе также имеются примеры зондов на основе карбазола для распознавания белков БСА. В работе [68] были синтезированы 3-бензотиазол-9-этилкарбазол (**77**) и 3,6-ди-2-бензотиазол-9-этилкарбазол (**78**) (Схема 28). В ходе исследований красители проявили высокую фото-и термостабильность, также они стабильны в нормальных условиях и могут найти применение в биологии. Авторы исследовали влияние различных растворителей и pH на оптические свойства этих соединений. Результаты показали, что синтезированные соединения чувствительны как к влиянию растворителя, так и к значению pH. При сравнении квантовых выходов оказалось, что лиганд **78** имеет более высокий квантовый выход, равный 0.68. Результаты исследования взаимодействия лиганда **78** с БСА показали, что интенсивность флуоресценции соединения заметно увеличивается после взаимодействия с белком. Эти результаты позволяют предположить, что это соединение может быть применено для мечения белков.

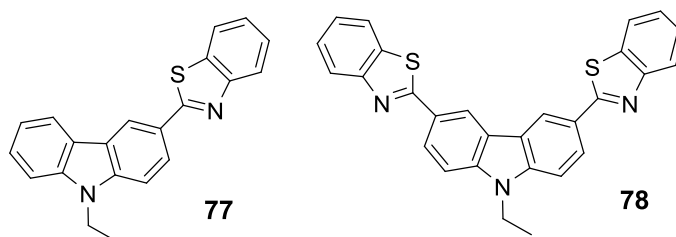


Схема 28

Для определения вязкости в митохондриях в 2019 году тем же ученым удалось разработать мощный двухфотонный зонд **79** (Схема 29).[69] Структурно он схож с описанным выше соединением **77**, однако существенным различием является положение карбазолового фрагмента: краситель **79** представляет собой производное карбазола по 6-положению, что смещает в красную область максимумы поглощения и флуоресценции и позволяет использовать двухфотонное возбуждение. Аналогично предыдущему примеру, увеличение вязкости среды красителя приводило к значительному увеличению флуоресценции. С помощью нового зонда **79** изменение вязкости митохондрий в живых системах, вызванное монензином

или нистатином, контролировалось с высокой чувствительностью в режиме реального времени. Кроме того, зонд способен визуализировать митохондриальную вязкость в моделях воспаления на уровне клеток и организма рыбок данио и мышей. Важно отметить, что визуализация митохондриальной вязкости была достигнута как у мышей с жировым гепатозом, так и у мышей с опухолями. Эта работа не только способствует изучению взаимосвязи между болезнью и митохондриальной вязкостью, но также открывает эффективный способ диагностики заболеваний, связанных с изменением вязкости в митохондриях.

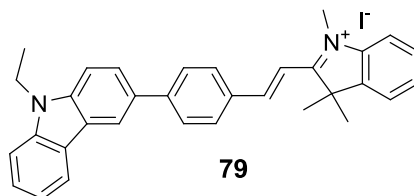


Схема 29

Лизосомы представляют собой внутриклеточные органеллы, ответственные за расщепление биологических веществ, характерной чертой которых является кислый pH. Поскольку aberrantный лизосомальный pH проявляется во множестве заболеваний, возможность осуществлять визуализацию и мониторинг pH лизосом в режиме реального времени имеет решающее значение для понимания и исследования патологических и физиологических процессов. В работе [70] разработан новый двухфотонный ратиометрический флуоресцентный зонд на основе карбазол-бензимидазола **80** для быстрого детектирования лизосомального pH (Схема 30). Флуоресцентный зонд **80** включал электронодонорный метилкарбитол-замещенный карбазольный фрагмент, конъюгированный с электронодефицитной бензимидазольной группой, при этом бензимидазольный фрагмент был выбран в качестве сайта протонирования, а метилкарбитоловый фрагмент – для таргетирования на лизосомы.[71] Соединение **80** имеет значение pKa 4,46, которое оказалось подходящим для количественного обнаружения и визуализации изменения pH лизосом в диапазоне 3.8–5.0. Производное **80** также проявило хорошую фотостабильность и низкую цитотоксичность. Исследования двухфотонной ратиометрической визуализации показали, что зонд **80** может избирательно мониторить изменения pH лизосом в живых клетках и дифференцировать здоровые ткани от раковых. Все эти результаты показывают, что соединение **80** является перспективным двухфотонным флуоресцентным зондом для практического использования в исследовании патологических и физиологических процессов, связанных с лизосомами.

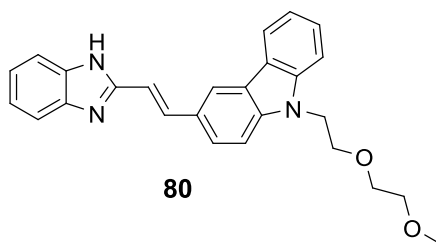


Схема 30

С примерами исследования карбозоловых красителей в качестве хемосенсоров в биологии для ионных частиц, активных форм кислорода и серы, а также внутриклеточного микроокружения можно ознакомиться в недавнем обзоре [72].

2.4. Кумариновые красители.

Кумарин (1,2-бензопирон) (**81**) - исходная молекула производных кумарина (Схема 31), является простейшим соединением большого класса встречающихся в природе полифенольных веществ, состоящих из конденсированных бензольных и α -пирановых колец.[73] Кумарин присутствует в большом количестве растений, включая чернику, морошку, лаванду, желтый донник, бобы тонка, зеленый чай, ясменник и др. В последнее время кумарины привлекают большое внимание благодаря своим фармакологическим свойствам. Сообщалось, что кумарин проявляет антиоксидантные, противовоспалительные, антимуtagenные и противораковые свойства.[74–76] Несмотря на разнообразные фармакологические свойства кумарина, в литературе мало работ по исследованию его взаимодействия с ДНК.

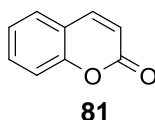


Схема 31

В работе [77] связывание кумарина с ДНК изучалось с помощью оптической спектроскопии и спектрофлуориметрии, спектроскопии кругового дихроизма (КД), измерения вязкости и исследования плавления ДНК. Результаты спектрофотометрического титрования подтвердили факт взаимодействия кумарина с ДНК, рассчитанная константа связывания составила $1,69 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$. Конкурентное спектрофотометрическое титрование со стандартными лигандами для ДНК показало, что кумарин не интеркалирует между парами оснований, а залегает в бороздку. Это было дополнительно подтверждено анализом спектров КД, измерением вязкости и исследованиями плавления ДНК. Однако нельзя исключать возможность электростатического взаимодействия между кумарином и ДНК. Молекулярный докинг *in silico* дополнительно подтвердил, что кумарин связывается с малой бороздкой ДНК с относительной энергией связи - 2.94 ккал/моль. Полученные в данной работе результаты предоставляют полезную информацию

о взаимодействиях кумарин-ДНК, которые важны для рационального конструирования лекарств с повышенной или более избирательной активностью и большей клинической эффективностью.

Группа турецких ученых исследовала взаимодействие кумаринового производного **82** (Схема 32) с БСА и ДНК с помощью методов оптической спектроскопии.[78] На спектрах эмиссии раствора **82** при добавлении БСА наблюдалось гипсохромное смещение максимума (44 нм) и увеличение интенсивности флуоресценции в 30 раз. При добавлении к раствору красителя **82** ДНК интенсивность флуоресценции лиганда увеличивалась в 8.5 раза. Рост интенсивности флуоресценции и сдвиг в синюю область спектра свидетельствовали о взаимодействии между соединениями, что может быть обусловлено увеличением жесткости структуры **82** в связанном с белком и ДНК виде. При взаимодействии **82** с БСА и ДНК кратность увеличения квантового выхода флуоресценции составила 6 раз для БСА и 1.3 раза для ДНК. Стоит отметить, что константы связывания уменьшаются с повышением температуры для обеих систем, что подтверждает ослабление межмолекулярного взаимодействия. Далее в работе исследовали влияние катионов металлов (KCl, LiCl, NH₄Cl, CaCl₂, BaCl₂, MgCl₂, SrCl₂, MnCl₂, FeCl₂, NiCl₂, AlCl₃, FeCl₃, SnCl₄) на системы **82**-БСА и **82**-ДНК. Используя данные спектрофотометрического титрования, были рассчитаны константы связывания катионов с системой **82**-БСА, где самое высокое значение получено для иона Sn⁴⁺, самое низкое – для иона Ni²⁺. Такие результаты могут быть объяснены тем фактом, что при pH = 7.4 белок БСА заряжен отрицательно, поэтому катион, имеющий более высокий заряд, взаимодействует с большей эффективностью. Самая высокая константа связывания с системой **82**-ДНК была получена при титровании с катионом Al³⁺, тогда как самая низкая константа связывания наблюдалась для катиона Ba²⁺. Высокая константа устойчивости комплекса с катионом Al³⁺ по сравнению с ионами других металлов предполагает возможность использования системы **82**-ДНК для распознавания катиона Al³⁺.

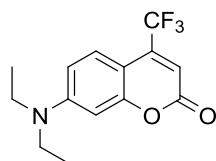
**82**

Схема 32

В статье [79] представлена серия хемосенсоров на основе кумарина **83-89** (Схема 33), способных детектировать одноцепочечные, двухцепочечные, а также параллельные, антипараллельные и гибридные структуры G-квадруплекса ДНК. Также данные структуры исследовались в качестве сенсоров для распознавания анионов F⁻, CN⁻, AcO⁻ и H₂PO₄⁻. Варьирование заместителей в различных положениях относительно ОН-группы повлияло на способность распознавания анионов, а также на кислотность ОН-группы при связывании

анионов. Механизмы взаимодействия лигандов с анионами и ДНК исследовали с помощью методов УФ-видимого, флуориметрического и ЯМР-титрования. Среди анионов добавление CN^- приводило к наибольшим изменениям в спектрах флуоресценции, для соединения **83** наблюдалось уменьшение интенсивности исходной полосы при 414 нм и появление нового максимума при 531 нм. Подобные спектральные изменения также продемонстрировали остальные лиганды. Связывание лигандов с ДНК приводило к усилению флуоресцентного отклика, 5.5-кратное для G-квадруплекса, и 1,3-кратное в присутствии дуплексной ДНК. Расчёты молекулярного докинга показали, что селективность является результатом увеличения количества Н-связей между ДНК и **84** из-за модифицированного заместителя. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что все синтезированные флуорофоры **83-89** могут использоваться для определения CN^- , а соединения **83**, **84**, **87** и **88** показывают высокую селективность в отношении параллельных G-квадруплексов по сравнению с другими топологиями ДНК. Термические исследования соединений показали, что соединения обладают термостабильностью, достаточной для применения в качестве оптических красителей.

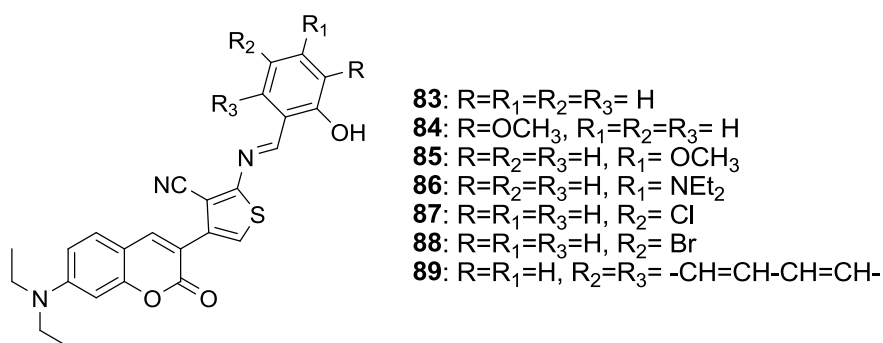


Схема 33

Еще одной работой турецких ученых является исследование взаимодействия двух замещенных производных гидроксикумарина **90**, **91** (Схема 34) с БСА.[80] Методами флуоресцентной и УФ-видимой абсорбционной спектроскопии было подтверждено взаимодействие кумариновых производных с биомолекулой. При образовании комплекса наблюдалось тушение флуоресценции БСА. По данным титрования были рассчитаны константы устойчивости комплексов, число центров связывания и основные термодинамические параметры при различных температурах. Результаты показали, что преобладающими межмолекулярными силами в стабилизации каждого комплекса являются взаимодействия Ван-дер-Ваальса и водородные связи. Пределы обнаружения соединений **90** и **91** в присутствии БСА составляют $5,08 \cdot 10^{-7}$ и $1,11 \cdot 10^{-7}$ М соответственно.

2.5. Родаминовые красители

Родаминовые красители являются одними из наиболее фотостабильных флуоресцентных реагентов для маркировки; на флуоресцентный отклик большинства из них не влияют изменения в диапазоне рН 4–10. Родаминовые красители также используются в медицине для визуализации живых клеток и организмов в доклинических исследованиях.[85] В настоящее время ряд родаминовых красителей являются коммерчески доступными. Например, родамин 123 составляет основу красителя Mito-Tracker, который в зависимости от митохондриального мембранного потенциала (ММП) метит митохондрии. Такие особенности как умеренная гидрофильность, высокий коэффициент молярной экстинкции и квантовый выход флуоресценции, превосходная фотостабильность [86] и эмиссия в видимой области спектра позволили использовать родаминовые красители для разработки как простых реагентов для флуоресцентной маркировки, так и сложных флуоресцентных зондов [87]. В дополнение к их превосходным фотофизическим свойствам стоит отметить, что родаминовые красители способны существовать в виде двух форм, спироциклической и открытой (Схема 36), что также отражается на их флуоресцентных свойствах. В неполярных растворителях родаминовые красители существуют в форме спиролактона, поэтому их молярный коэффициент экстинкции (а также квантовый выход и время жизни флуоресценции) очень низки ввиду нарушения π -сопряжения ксантенового ядра. Однако в полярных растворах в лактонной форме происходит разделение зарядов с образованием цвиттериона. Открытое кольцо спиролактама в дальнейшем после протонирования может образовывать катионы. В формах с открытым кольцом родаминовые красители существуют в виде катионов аммония, которые могут локализоваться в митохондриях, что привело к коммерциализации некоторых родаминовых красителей в серии флуорофоров Mito-Tracker. Благодаря данным преимуществам неудивительно, что родаминовые красители вызывают значительный интерес химиков. Исследователи использовали стратегии раскрытия кольца родамина на основе хелатирования и реакции со спиролактонами для разработки чувствительных к мишени флуоресцентных зондов. Способность аналитов индуцировать открытие спиролактама использовалась для разработки зондов на основе родамина, которые могут детектировать катионы металлов и различные биомолекулы.[88–90]

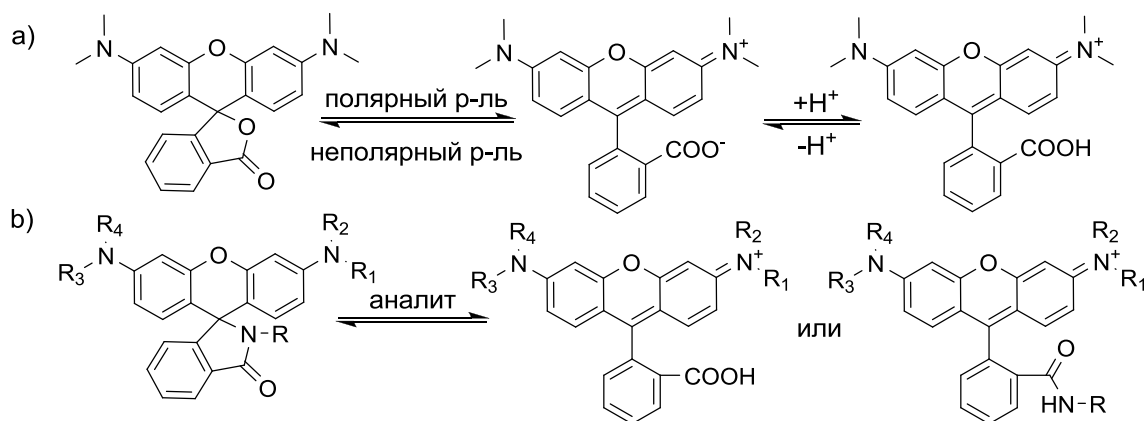


Схема 36

Группой индийских исследователей изучалось взаимодействие родаминовых красителей с ДНК.[91–93] Один из них, это родамин Б (93) - ксантеновый краситель (Схема 37), широко используемый в люминесцентном анализе для обнаружения ионов металлов и в биотехнологии для флуоресцентной микроскопии, проточной цитометрии, флуоресцентной корреляционной спектроскопии и ИФА.[94,95] Родамин Б обладает важными биохимическими и фармакологическими свойствами, проявляет антибактериальную активность при конъюгации с пептидами.[96] Исследования мутагенности показывают, что коммерческий краситель родамин Б является мутагенным после активации в системах *in vitro*. На основании имеющихся в настоящее время данных уместно считать, что родамин Б потенциально генотоксичен. Понимание взаимодействия родамина Б с ДНК на молекулярном уровне важно для характеристики механизма лиганд-рецепторных взаимодействий. В работе [91] связывание родамина Б с ДНК тимуса теленка изучали с использованием различных оптических методов анализа и расчётов молекулярного докинга. На спектрах поглощения и флуоресценции при добавлении к раствору красителя ДНК тимуса теленка наблюдался гипохромный сдвиг максимумов при 555 нм и 578 нм соответственно. Спектроскопия кругового дихроизма показала, что при связывании с родамином Б конформация ДНК умеренно изменилась и двойная спираль раскрутилась. Связывание носило кооперативный характер, а константа связывания, оцененная по графику Бенези-Хайдебранда, находилась в диапазоне 10^3 M^{-1} . Из результатов термодинамических исследований был сделан вывод, что процессу связывания благоприятствуют как отрицательное изменение энтальпии, так и положительное изменение энтропии. Расчеты молекулярного докинга и эксперимент по тушению флуоресценции подтвердили, что краситель связывается с малой бороздкой ДНК. Таким образом, исследователи обнаружили, что родамин Б прочно связывается с ДНК и может быть опасен для здоровья человека. Сродство родамина Б к ДНК побудило авторов к дальнейшему изучению биологической активности других производных родамина.

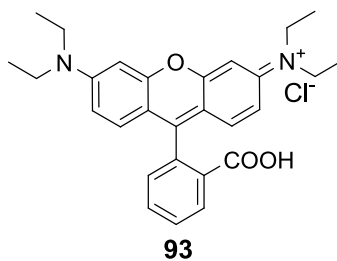


Схема 37

Родамин 123 - распространенный краситель (**94**) (Схема 38) из семейства родаминов, широко используется ввиду его биологической важности, поскольку он является ингибитором для некоторых функций митохондрий,[97] используется для визуализации мембранного транспорта,[98] а также проявляет антибактериальную активность.[99] Исследования *in vitro* показали, что родамин 123 токсичен в отношении различных клеточных линий[100], что может быть обусловлено его сродством к ДНК. Поэтому в работе [92] с использованием различных физико-химических методов анализа, а также расчётов молекулярного докинга был подробно изучен механизм и термодинамические свойства связывания родамина123 с ДНК. Гипохромные эффекты на спектрах поглощения и эмиссии подтвердили взаимодействие красителя с биомолекулой. Эксперименты по тушению флуоресценции, расчёты докинга и спектроскопия кругового дихроизма показали, что родамин 123 не интеркалирует в спираль ДНК. Исследование термической денатурации комплекса красителя с ДНК показало, что спираль ДНК стабилизируется за счет связывания красителя **94**, а температура плавления ДНК повышается примерно на 5.0°C. Небольшое изменение температуры плавления также свидетельствует о неинтеркаляционном режиме связывания. Расчёты молекулярного докинга показали, что связыванию лиганда благоприятствовала как отрицательная гидрофобная свободная энергия, так и отрицательная молекулярная свободная энергия.

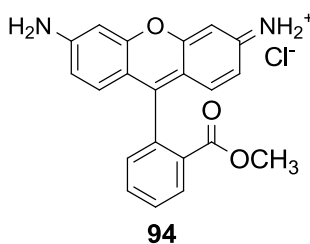


Схема 38

Взаимодействие ДНК с Родамином 6G (**95**) (Схема 39) исследовали методами молекулярного докинга, электрохимическими, спектроскопическими и термодинамическими методами.[93] Исследование показало, что родамин 6G связывается с малой бороздкой ДНК. Связывание носило кооперативный характер и значение константы связывания достигало 10^6 М⁻¹. Спектры кругового дихроизма продемонстрировали значительное конформационное

изменение при связывании и раскручивание спирали ДНК. Термодинамическое исследование показало, что связыванию благоприятствуют отрицательная энтальпия и положительное изменение энтропии. Экспериментальные результаты были дополнительно подтверждены с помощью исследования молекулярного докинга и теоретических расчётов. Согласно расчётам, существенную роль в комплексообразовании лиганда с биомолекулой играют гидрофобное взаимодействие и водородные связи. Результаты исследований на конфокальном микроскопе показали, что краситель обладает хорошей проникаемостью внутрь клетки. Исследования по цитотоксичности показали, что краситель активен в отношении клеток рака молочной железы человека MDA-MB 468, что обусловлено генерацией синглетного кислорода.

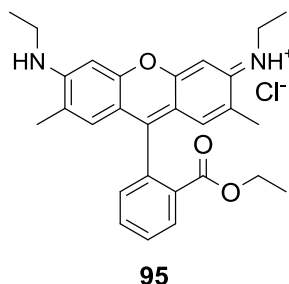


Схема 39

2.6. Цианиновые красители

Структура цианиновых красителей представляет собой моно- или полиметиновую цепь с присоединенными гетероциклическими/негетероциклическими фрагментами. Гетероароматические молекулы, такие как пиррол, имидазол, триазол, пиридин, хинолин, индол, бензотиазол и т. д., обычно находятся в виде концевых групп (Схема 40). Особенности молекулярной структуры цианиновых красителей дают им ряд преимуществ. Во-первых, для данных красителей характерно длинноволновое возбуждение (650 ~ 750 нм) и испускание (700 нм ~ 800 нм), что делает их применимыми для визуализации в клетках и тканях в экспериментах *in vivo*. Модификация структуры цианина может привести к смещению спектра испускания в область 1000-1700 нм. Таким образом, оптические свойства цианиновых красителей делают их перспективным классом для разработки реагентов для биовизуализации. Во-вторых, цианиновый каркас имеет 6 участков (Схема 40), которые легко модифицируются, что важно для разработки переключаемых флуоресцентных систем, для распознавания различных аналитов, для обеспечения возможности варьирования оптических свойств, обеспечения доставки лекарств. Кроме того, из основного каркаса могут быть получены как симметричные, так и асимметричные структуры. Такие структурные преимущества позволяют легко разрабатывать флуоресцентные реагенты на основе цианина в соответствии с требованиями к дизайну. В-третьих, при поглощении света цианиновые красители могут

генерировать синглетный кислород или преобразовывать энергию поглощенного света в тепло. Таким образом, цианиновый каркас можно использовать для фотодинамической терапии (ФДТ) и фототермической терапии (ФТТ). Благодаря этим многочисленным структурным преимуществам цианины используются для создания молекулярных агентов или композиционных материалов как для диагностики, так и для лечения *in vivo*.

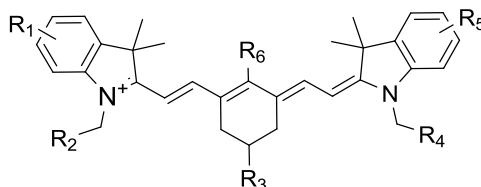


Схема 40

В последнее время большое внимание исследователей уделяется семейству асимметричных цианиновых красителей для использования во флуоресцентной визуализации нуклеиновых кислот. Эти красители при связывании с двухцепочечной ДНК демонстрируют значительное увеличение интенсивности флуоресценции (в 100–1000 раз) по сравнению с раствором свободного красителя. В свободном виде цианиновые флуорофоры обладают низким квантовым выходом флуоресценции, что дает им преимущества по сравнению с коммерчески доступными красителями для ДНК – этидиум бромидом и хехстом, которые обладают высоким квантовым выходом флуоресценции в свободном виде и малой кратностью разгорания флуоресценции при связывании с биомолекулой.[101]

Асимметричные цианины состоят из двух различных ароматических кольцевых систем, соединенных моно- или полиметиновой связью, которая является частью сопряженной системы. В последние десятилетия ряд красителей такого типа был синтезирован и изучен в качестве комплексонов для одноцепочечной и двухцепочечной ДНК.[101–103] Было обнаружено, что цианиновые красители проявляют три основных способа связывания, включая интеркаляцию, связывание в бороздках и электростатические взаимодействия с фосфатным остовом.[104,105] Интеркалирующие цианины демонстрируют константы связывания, которые обычно не превышают 10^7 M^{-1} . [104] Комплексы красителей, связывающихся с бороздками, стабилизируются за счет водородных связей с фосфатным остовом и демонстрируют значения констант, которые могут достигать 10^8 – 10^9 M^{-1} . [104] Однако не все цианиновые красители пригодны для нековалентного мечения. Двумя наиболее распространенными цианиновыми красителями, используемыми для исследований нуклеиновых кислот, являются Су3 (96) и Су5 (97) (Схема 41), которые представляют собой триметиновые и пентаметиновые цианиновые красители соответственно. Конъюгаты этих флуорофоров с олигонуклеотидной последовательностью служат в качестве высокоэффективных меток, указывающих на присутствие определенной последовательности нуклеотидов в НК.[106]

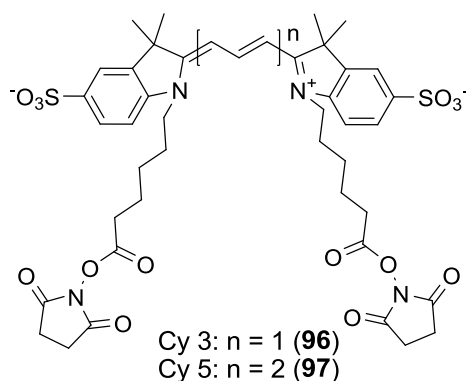


Схема 41

Ярмолюк и др. [107] синтезировали краситель **98** (Схема 42), производное триметинового красителя с метильным заместителем у β -углерода полиметиновой цепи. Введение алкильного заместителя снижало интенсивность флуоресценции свободного красителя в растворе без уменьшения интенсивности флуоресценции красителя в комплексе с двухцепочечной ДНК. Было определено, что значение константы комплексообразования составляет $3,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, что указывает на образование стабильного комплекса с двухцепочечной ДНК и интеркаляционный способ связывания.[104]

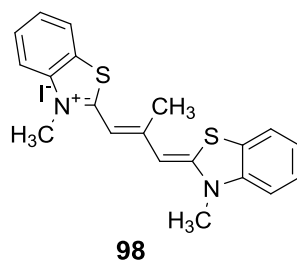


Схема 42

Коллективом китайских авторов был разработан флуоресцентный краситель **99** (Схема 43) с длинноволновым поглощением и испусканием ($\lambda_{\text{макс}}^{\text{погл}} = 626 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}} = 649 \text{ нм}$ в присутствии ДНК).[108] Как и в предыдущих примерах, краситель в свободном виде проявлял низкий квантовый выход флуоресценции ($\varphi^{\text{фл}} = 0.0037$), однако при связывании с ДНК интенсивность флуоресценции возрастала ($\varphi^{\text{фл}} = 0.36$), кратность увеличения квантового выхода флуоресценции составляла 97.3 раза, что больше 13.5-кратного увеличения для этидиумбромиды. Такие оптические свойства имеют первостепенное значение для флуоресцентного зонда ДНК. Результаты спектроскопии кругового дихроизма показали, что краситель связывается с ДНК путем агрегации в малой бороздке. Для подтверждения селективности связывания красителя с ДНК также изучались оптические свойства красителя в комплексе с РНК и БСА. Оказалось, что при 45.5 кратном разгорании флуоресценции красителя в комплексе с ДНК, то же количество красителя в комплексе с РНК показало восьмикратное увеличение, при этом с БСА разгорание флуоресценции было совсем незначительным. При

обработке окрашенных клеток РНКазой интенсивность флуоресценции ядер почти не изменилась, что также подтверждает селективность красителя к ДНК. Хотя зонд **99** не является ДНК-селективным на 100 %, он доказал свое превосходство над некоторыми коммерческими ДНК-зондами. Таким образом, краситель **99** проявил себя перспективным ДНК-связывающим реагентом, проникающим в живые клетки, и может использоваться для высокочувствительного обнаружения ДНК *in vitro* и визуализации ядра, а также для количественного определения ДНК *in vivo*.

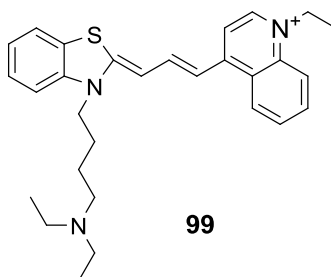


Схема 43

Однако недостатком описанного выше красителя **99** является его низкая фотостабильность. В работе [109] для улучшения фотостабильности, а также спектральных свойств цианинового производного в структуру триметиновой цепи вводили сильную электроноакцепторную группу CN. Раствор красителя **100** (Схема 44) в водном буфере имел максимум поглощения при 543 нм, эмиссии при 611 нм, большой Стоксов сдвиг (более 60 нм), низкий квантовый выход флуоресценции 0.017, а также показывал превосходную светостойкость по сравнению с цианиновым производным без CN-группы. При взаимодействии с нуклеиновыми кислотами (тг- ДНК и РНК) в водном растворе **100** демонстрировал значительное усиление эмиссии: квантовые выходы флуоресценции увеличились до 0.7 (0.73 для ДНК и 0.72 для РНК), что также выше значений квантового выхода красителя без CN-группы, связанного с биомолекулой. При добавлении к раствору красителя БСА разгорания флуоресценции не наблюдалось, что подтверждает селективность распознавания красителем нуклеиновых кислот. Эксперимент по расщеплению ДНКазой и РНКазой показал гашение флуоресцентного отклика в обоих случаях. Биологические исследования локализации красителей в клетках показали совпадение областей окрашивания с красителем SYTO 9, который накапливается в ядрах и хромосомах клетки. Также краситель проявлял низкую цитотоксичность по отношению к линии клеток MCF7.

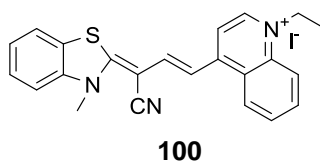


Схема 44

Красители, интеркалированные в нити ДНК или связанные с бороздками, демонстрируют изменение интенсивности флуоресценции и образование агрегатов в зависимости от окружающих условий. Чтобы установить некоторые эмпирические правила, касающиеся интеркаляции красителей, в работе [110] были проведены спектроскопические исследования влияния ДНК на несколько серий цианиновых красителей **101**, **102**, **103** (Схема 45) с различными ароматическими кольцами, длиной сопряженной цепи и алкильными заместителями. Спектры поглощения, интенсивность флуоресценции и спектры кругового дихроизма показали сильную зависимость от видов красителей. Полученные результаты указывают на то, что цианиновые красители имеют тенденцию интеркалировать в цепь ДНК, если их полиметиновый мостик состоит только из одного атома углерода. Для молекул с более длинными цепями небольшие количества ДНК образовывали неправильные агрегаты, которые превращались в комплексы, состоящие из нескольких нитей красителя и ДНК. Эти результаты могут послужить полезным ориентиром для разработки оптических функциональных материалов и устройств, использующих ДНК-комплекс.

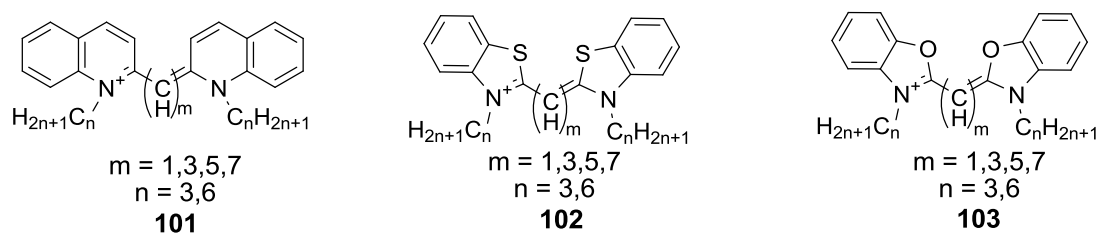


Схема 45

Группой украинских и болгарских авторов были синтезированы 16 новых асимметричных монометинцианиновых красителей **104-119** (Схема 46) и исследованы их спектральные характеристики и взаимодействие с двухцепочечной ДНК.[111] Синтезированные красители поглощали в области 453–519 нм и имели молярный коэффициент экстинкции в диапазоне 37900–93100 л·М⁻¹ см⁻¹. В свободном виде красители обладают низким квантовым выходом флуоресценции, но в присутствии двухцепочечной ДНК они демонстрируют значительное усиление флуоресцентного отклика. Наибольшую кратность разгорания флуоресценции показали красители **112**, **113**, **115** и **119**, что позволяет рассматривать данные красители в качестве перспективных ДНК-маркеров.

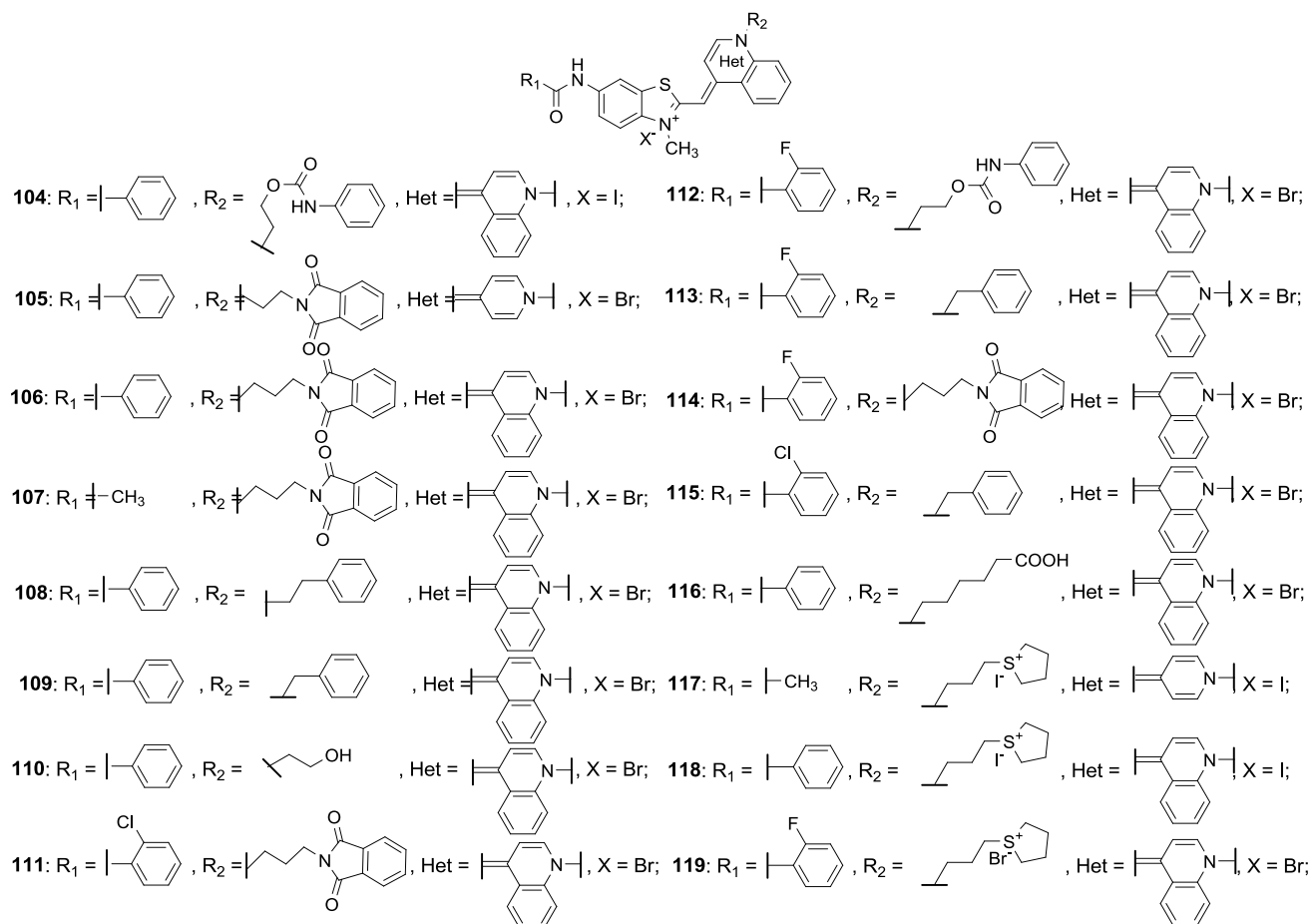


Схема 46

В работе [112] представлена серия несимметричных цианиновых красителей с различными заместителями **120-127** (Схема 47). Сравнение связывания **120-127** с двухцепочечной ДНК и двухцепочечной РНК выявило значительное влияние заместителя R, присоединенного к более длинной оси ароматического ядра (красители **120-125**), при этом возможно, что увеличенная длина структуры и возможность образования множественных водородных связей приводит к исключительному связыванию **120-125** в малой бороздке дц-ДНК, в то время как только **126**, **127** (размер более длинной оси которых не превышает размера длинной оси пары оснований) могут встраиваться в структуру как дц-ДНК, так и дц-РНК. Наблюдаемая для красителей **126** и **127** селективность к дц-РНК по сравнению с дц-ДНК является наиболее интересным и довольно редким свойством среди малых молекул. Кроме того, взаимодействие с дц-РНК индуцировало более сильное увеличение флуоресценции большинства исследованных соединений по сравнению с титрованием дц-ДНК, при этом увеличение флуоресценции для красителей **120** и **123** при добавлении дц-РНК было исключительно сильным. Поскольку соединения **120-125** фактически не стабилизируют дц-РНК термически, такое сильное увеличение флуоресценции, скорее всего, является результатом агрегации соединений и самоукладки в гидрофобных бороздках дц-РНК.

Взаимодействие соединений **120–127** с оц-РНК сильно зависело как от структуры соединения, так и от основного состава РНК. Наиболее интересным наблюдением было то, что среди исследованных соединений только **127** образовывало устойчивый комплекс с поли-А-нуклеотидом в биологически релевантных условиях, при этом рассчитанная константа связывания оказалась неожиданно высокой. Более того, **120–125**, **127** продемонстрировали эффективное взаимодействие с поли-Г-нуклеотидом даже при концентрациях 1 М, сопровождающееся исключительно сильным усилением флуоресценции. Таким образом, соединения **120–125**, **127** можно рассматривать как многообещающие соединения-лидеры флуориметрических зондов для одноцепочечных последовательностей богатых G-основаниями.

Соединения **120–122** являются очень активными, а **123–125** довольно хорошими ингибиторами роста клеток лейкемии и лимфомы, а также опухолевых клеток, происходящих из солидных опухолей. В отличие от опухолевых клеток, нормальные эндотелиальные клетки оказались значительно устойчивее к тестируемым соединениям. Клетки K562, полученные из тяжелых гематологических злокачественных новообразований, хронического миелоидного лейкоза при бластном кризе, были особенно чувствительны ко всем испытанным монометинцианиновым производным, что убедительно свидетельствует в пользу необходимости дополнительных исследований механизма их действия на лейкозные клетки и лимфомы разных линий. Кроме того, изучение поглощения и внутриклеточного распределения **120** и **121** в живых клетках показало эффективное проникновение соединений в клетки и связывание с макромолекулами цитоплазмы клетки.

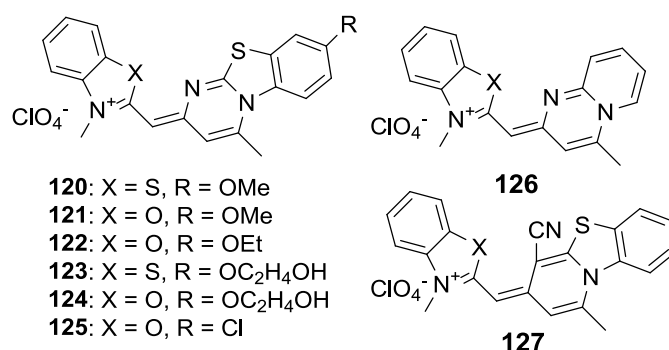


Схема 47

2.7. Стириловые красители

Стириловые красители являются важными функциональными полиметиновыми производными цианиновых красителей, относящимися к подклассу гемицианиновых. Структурной единицей стириловых красителей является арилвиниловый или гетарилвиниловый фрагмент, который принимает участие в образовании сопряженной хромофорной системы (Схема 48). В отличие от классических цианиновых красителей, стириловые производные

обладают большим Стоксовым сдвигом и лучшей фотостабильностью. Такие красители используются в качестве оптических записывающих сред, лазерных красителей, оптических сенсibilizаторов и флуоресцентных зондов для биомедицинского применения.[113]

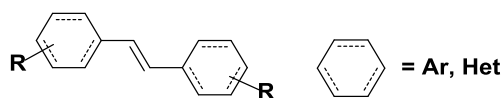


Схема 48

В работе [114] группой ученых под руководством Федоровой был синтезирован ряд новых моно- и бисстириловых красителей, содержащих алкилоксизаместитель и различной длины линкер (Схема 49), и исследовано их взаимодействие с двухцепочечной ДНК. В спектрах поглощения моно- и бисстириловых производных **128a–c** и **129a–c** наблюдались практически идентичные интенсивные длинноволновые полосы поглощения в области 300–450 нм, которые являются результатом внутримолекулярного переноса заряда с электронодонорных алкоксифенильных остатков на положительно заряженные пиридиновые кольца. Примечательно, что оптическая плотность водного раствора бисстирилового красителя **129c** ниже, чем растворов производных бисстирила **129a** и **129b** той же концентрации. Авторы интерпретировали это наблюдение как агрегацию соединения **129c** в водном растворе, приводящую к уменьшению основной полосы поглощения свободного красителя и появлению длинноволновой компоненты в области 430–500 нм, что обычно наблюдается для агрегатов таких красителей. По данным спектрофотометрического, спектрофлуориметрического и КД-титрования с ДНК было установлено, что все красители связываются с тт-ДНК, однако их тип взаимодействия существенно зависит от длины алкильной цепи. Для производных моностирила удлинение алкилбромидного заместителя последовательно переключает режим связывания с интеркаляции (**128a**) на связывание с малой бороздкой (**128b**) и связывание с большой бороздкой (**128c**). Введение второго хромофора приводит к связыванию бисстириловых красителей **129a** и **129b** в малой бороздке ДНК. В то же время присутствие линкера с десятичленной углеродной цепочкой, как и в случае моностирилового красителя **128c**, приводит к связыванию бисстирилового производного **129c** в большой бороздке. Следовательно, соединения **128c** и **129c** представляют собой новые примеры малых молекул, которые избирательно связываются с большой бороздкой ДНК. Эта особенность делает красители **128c** и **129c** перспективными маркерами для исследований связывания ДНК с белком, где необходимо отслеживать взаимодействие с большой бороздкой. Кроме того, с помощью спектроскопии кругового дихроизма было показано, что все полученные соединения, за исключением моностирилового красителя **128a**, образуют хиральные агрегаты в присутствии

дц-ДНК. Полученные результаты могут служить отправной точкой для разработки подхода к предсказанию способа связывания, а также рационального дизайна флуоресцентных лигандов, демонстрирующих желаемые типы взаимодействия ДНК-лиганд.

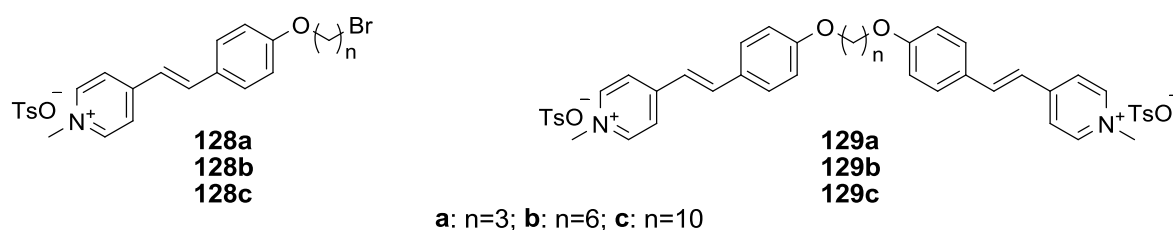


Схема 49

В работе [115] был синтезирован и исследован ряд моно- и бисстириловых красителей, различающихся по длине сопряженных π -связей, объемности заместителей, суммарному положительному заряду и пространственному расположению (Схема 50). Соединения исследовали на взаимодействие с различными по составу дц-ДНК или дц-РНК. Все флуорофоры показали хорошие оптические характеристики в водной среде. В спектрах поглощения и флуоресценции не было обнаружено изменений, индуцированных агрегацией, при концентрациях до 20 μM . Также красители проявили превосходную стабильность как при комнатной температуре, так и в течение быстрого нагрева до 95 $^{\circ}\text{C}$. Красители показали большие значения Стоксовых сдвигов до $\Delta\lambda = 150$ нм. Более того, двухзарядные флуорофоры обладали высоким квантовым выходом флуоресценции и длительным временем жизни в возбужденном состоянии в водном растворе, что делает их перспективными флуорофорами для биовизуализации. Результаты экспериментов по термической денатурации, флуориметрического и КД-титрования показали, что длина сопряженных ароматических связей и величина суммарного положительного заряда влияют на аффинность связывания малых молекул с двухцепочечной ДНК/РНК ($\log K_s$ варьируется в диапазоне 3–7). Детальный анализ данных флуориметрического титрования показал, что производные моностирилхинолина **131** и **132** показали увеличение интенсивности флуоресценции при взаимодействии со всеми дц-полинуклеотидами, однако с выраженной селективностью к дц-ДНК по сравнению с дц-РНК. Стоит отметить, что более объемное дифенилпроизводное **132** давало самую сильную эмиссию при взаимодействии с АТ-содержащими ДНК и почти не демонстрировало разгорание флуоресценции с GC-ДНК, тогда как гораздо меньшее диметилпроизводное **131** давало противоположный результат, где самое сильное увеличение эмиссии наблюдалось с GC-ДНК. Кроме того, влияние объема заместителей выражалось в гораздо более медленной кинетике связывания **132** по сравнению с **131**. Такое поведение соответствовало результатам КД-титрования, поскольку **131** эффективно связывался с биомолекулой путем интеркаляции в GC-

ДНК (соответствуя сильному увеличению эмиссии), тогда как большой объем красителя **132** препятствовал интеркаляционному взаимодействию и способствовал агрегации вдоль GC-ДНК, вызывая очень небольшие изменения в спектрах флуоресценции. В случае AT-ДНК оба красителя **131**, **132** были связаны в малой бороздке из-за ее благоприятных размеров для малых молекул, для AU-РНК доминирующим сайтом связывания являлась большая бороздка.

В отличие от **131** и **132**, бисстириловые производные **133** и **134** (несущие двойной положительный заряд) при добавлении дц-полинуклеотида в основном проявляли сильное тушение эмиссии, за одним исключением: краситель **133** проявил сильное и специфическое увеличение эмиссии при взаимодействии с AT-ДНК. КД-титрование показало, что оба красителя **133** и **134** встраиваются во все двухцепочечные ДНК. При взаимодействии с AU-РНК лиганды **133**, **134** связываются, вероятно, в большой бороздке, но опять же, только краситель **133** давал интенсивные полосы ИКД дальше 300 нм, типичные для хорошо ориентированной агрегации в пределах большой бороздки РНК. Таким образом, различия в эмиссионном отклике и отклике ИКД между **133** и **134** ясно подчеркивают важность стерического взаимодействия между сайтом связывания полинуклеотида и малой молекулой лиганда, которое можно обнаружить только путем систематических структурных вариаций и экспериментальных исследований. Биологические эксперименты показали эффективное проникновение внутрь клетки всех исследованных соединений в сочетании с неожиданно отличающимся антипролиферативным действием на линии опухолевых клеток человека. Интенсивный флуоресцентный отклик красителей во внутриклеточной среде в сочетании с биологической активностью делает лиганды **131** и **132** перспективными соединениями для терапевтических применений. Описанные соединения являются многообещающими красителями для биологических и биохимических нетоксичных применений. А именно, из-за специфического увеличения эмиссии лиганда **133** при взаимодействии с AT-ДНК его можно наносить на выделенный и фрагментированный материал ДНК, чтобы отметить присутствие фрагментов AT-последовательности, и тот же краситель **133** дает специфический ИКД-сигнал на возможно присутствующие фрагменты AU-РНК.

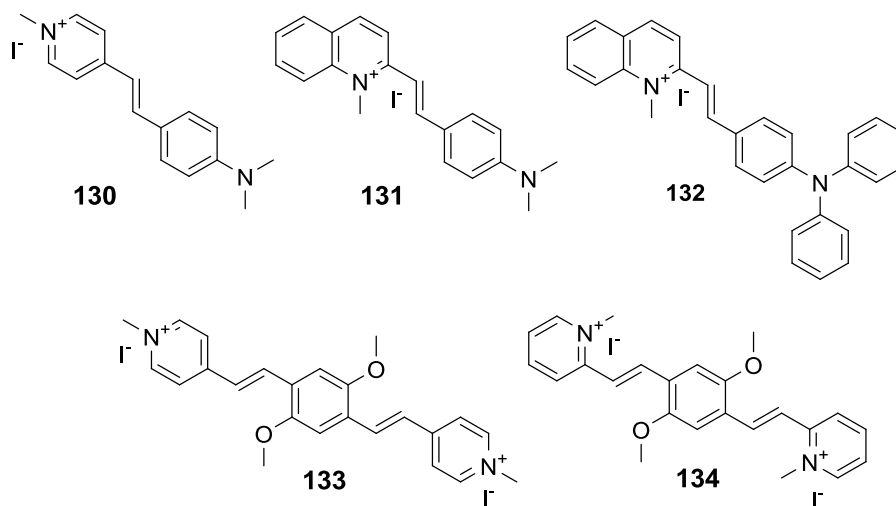
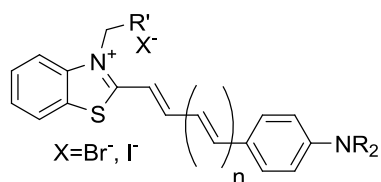


Схема 50

Группой американских ученых была разработана серия стириловых красителей на основе бензотиазола. Как правило, бензотиазоловые красители обладают такими преимуществами как высокая биосовместимость, быстрое проникновение во внутриклеточную среду, высокая фотостабильность и стабильность в растворе. В работе [116] для улучшения ИСТ-процесса в структуры красителей включали сильные электронодонорные группы ($-\text{NEt}_2$, $-\text{NMe}_2$) (Схема 51). Зонды **135-140** демонстрировали отличные фотофизические характеристики для практических применений, в том числе эмиссия в БИК-области, большой Стоксов сдвиг, отсутствие молекулярной агрегации и сольватохромизм. При использовании этих зондов для окрашивания олигодендроцитов они продемонстрировали локализацию в митохондриях живых клеток даже при низких концентрациях, таких как $0.2 \mu\text{M}$, демонстрируя высокую чувствительность. Кроме того, эти зонды можно использовать без проведения стадии отмывки после окрашивания для удаления избытка флуоресцентных красителей. Такое преимущество связано со значительной разницей квантового выхода флуоресценции, проявляемого в среде водного растворителя по сравнению со средой органического растворителя, что минимизирует фоновую флуоресценцию в водной среде. Это позволяет проводить визуализацию без промывки, которая часто требуется для многих коммерческих маркеров. Среди исследованных зондов особый интерес представляет краситель **139** ($\lambda_{\text{макс}}^{\text{погл}} \approx 620 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}} \approx 702 \text{ нм}$) из-за его большого Стоксова сдвига, яркой флуоресценции при связывании с митохондриями, высокой биосовместимости и быстрого окрашивания. По-видимому, положительно заряженный тиазолиевый фрагмент играет важную роль в селективности к митохондриям. Однако это исследование показывает, что митохондриальная селективность не зависит от заместителя у атома азота зондов. Хотя оптические характеристики полученных соединений сравнимы с существующими коммерческими Mito-Trackers, структурное усовершенствование этого класса зондов может привести к дальнейшему улучшению свойств красителей.



135: NR₂=NMe₂, n=0, R'=Me

136: NR₂=NEt₂, n=0, R'=Me

137: NR₂=NMe₂, n=0, R'=Me

138: NR₂=NEt₂, n=0, R'=Ph

139: NR₂=NMe₂, n=1, R'=Me

140: NR₂=NMe₂, n=1, R'=Ph

Схема 51

Одной из важных проблем для красителей **135-140** является относительно низкий квантовый выход флуоресценции ($\varphi^{\text{фл}} \sim 0.01-0.07$ в ДХМ) из-за большой степени безызлучательной релаксации. Чтобы преодолеть это ограничение, авторами [117] было синтезировано соединение **141** (Схема 52), содержащее в структуре фурановую группу для увеличения π -сопряжения и обеспечения частичной жесткости хромофора. Как и ожидали авторы, частичное усиление каркаса π -сопряжения привело к значительному увеличению квантового выхода флуоресценции красителя **141** ($\varphi^{\text{фл}} \sim 0.47$ в ДХМ) по сравнению с **139** ($\varphi^{\text{фл}} \sim 0.077$ в ДХМ). Это указывает на важность наличия структурной жесткости в системах типа D- π -A для улучшения их фотофизических характеристик за счет уменьшения степени безызлучательной релаксации. Также важно отметить, что несмотря на удлинение π -сопряжения хромофора на 3 олефиновые связи, краситель **141** демонстрировал лишь умеренный батохромный сдвиг в оптических спектрах ($\lambda_{\text{макс}}^{\text{погл}} \approx 641$ нм; $\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}} \approx 750$ нм в ДХМ), по сравнению с красителем **139** ($\lambda_{\text{макс}}^{\text{погл}} \approx 620$ нм; $\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}} \approx 702$ нм в ДХМ), содержащим в π -сопряжении две олефиновые связи. Увеличение на одну олефиновую связь в сопряженной системе может приводить к батохромному смещению максимума на $\sim 80-100$ нм в спектрах поглощения, однако включение в структуру фуранового фрагмента не привело к значительному сдвигу в спектрах поглощения ввиду цис-конфигурации пятичленного кольца, которая ограничивает π -сопряжение полиметиновой системы. Как и другие производные, зонд **141** демонстрировал большой Стоксов сдвиг $\Delta\lambda \approx 109$ нм в ДХМ. Различие квантового выхода флуоресценции в водной и органической средах также дало возможность проведения экспериментов по окрашиванию живых клеток с красителем **141** «без отмывки». Как и описанные выше производные, зонд **141** демонстрировал высокую биосовместимость, возможность продолжительной по времени визуализации, а также возбуждение эмиссии коммерчески доступными лазерами. Также краситель **141** удалось успешно использовать для визуальной идентификации митохондриальной дисфункции из-за нарушения мембранного потенциала в живых клетках. Изображения флуоресцентной конфокальной микроскопии,

полученные для клеток NHLF, окрашенных зондом **141** в присутствии хорошо известного ингибитора, влияющего на мембранный потенциал митохондрий (например, карбонилцианид 4-(трифторметокси)фенилгидразона: FCCP), показали способность красителя **141** визуально идентифицировать клетки с дисфункцией митохондриального мембранного потенциала. Таким образом, описанные красители с архитектурой D-π-A (где D = -NMe₂ или -NEt₂) **135-141** являются перспективными кандидатами для разработки важных флуоресцентных маркеров для изучения митохондрий. Специфичность связывания с митохондриями и характер визуализации таких флуоресцентных красителей типа D-π-A строго зависят от состояния здоровья митохондрий (т. е. мембранного потенциала митохондрий).

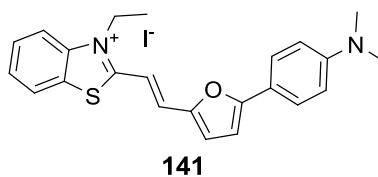
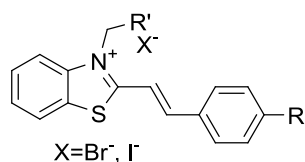


Схема 52

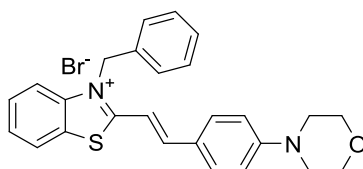
Дальнейшие исследования флуорофоров типа D-π-A показали, что специфичность зонда к органеллам сильно зависит от природы донорной группы. Например, замена донорной группы алкиламина (-NR₂ = -NMe₂ или -NEt₂) в структуре красителя **135** на умеренно-слабую донорную группу, такую как -OH или -OCH₃ (красители **142-145**, Схема 53), привела к неожиданному переключению специфичности зонда к органеллам с митохондрий на лизосомы.[118] Кроме того, присоединение умеренно-слабых донорных групп также привело к значительным изменениям оптических свойств зондов. В целом зонды **142-145** продемонстрировали значительный гипсохромный сдвиг в спектрах излучения на $\Delta\lambda \approx 100$ нм по сравнению с зондами **135-141**. Например, замена донорной группы амина (-NMe₂) в красителе **135** ($\lambda_{\text{погл макс}}^{\text{погл}} \approx 513$ нм; $\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}} \approx 598$ нм в ДХМ) на гидроксильную (-OH) группу ($\lambda_{\text{погл макс}}^{\text{погл}} \approx 452$ нм; $\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}} \approx 532$ нм в ДХМ) привела к значительным сдвигам спектров в синюю область. Спектроскопические исследования ясно показали, что донорная сила заместителей -OH или -OCH₃ значительно слабее, чем донорная амино-группа (-NR₂). Интересно, что зонды **142-145** по сравнению с **135-140** показали несколько больший Стоксов сдвиг в неполярных растворителях, таких как ДХМ. Рассчитанные значения квантового выхода флуоресценции зондов **143** и **145** также зависели от группы доноров. Например, краситель **143** (донор -OH; $\varphi^{\text{фл}} \approx 0.0051$ в ДХМ) продемонстрировал заметно более высокий квантовый выход флуоресценции по сравнению с зондом **145** (донор -OCH₃; $\varphi^{\text{фл}} \approx 0.0021$ в ДХМ).



- 142:** R=H, R'=Me
143: R=OH, R'=Me
144: R=OH, R'=Ph
145: R=OCH₃, R'=Me

Схема 53

Используя полученные данные экспериментов, подтвердивших лизосомальную селективность красителей **142-145**, авторы попытались обосновать, как архитектура зонда может способствовать специфичности органелл в зависимости от природы прикрепленной донорной группы (D). Как правило, бензотиазолий, содержащий сопряженную систему D-π-A с включением сильной донорной группы алкиламина (-NR₂ = -NMe₂ или -NEt₂), будет явно направлять селективность зонда в сторону клеточных митохондрий, в то время как доноры слабой или умеренной силы (D = -OH, -OMe или -H) переключат селективность системы D-π-A в сторону клеточных лизосом. Понимание механизма такого переключения селективности в системах флуорофоров типа D-π-A, содержащих бензотиазолиевый гетероцикл, на молекулярном уровне было бы очень полезно для биовизуализации в ближайшем будущем. Для дальнейшего изучения явления переключения селективности, зависящего от донорного фрагмента, исследователи ввели в систему D-π-A хорошо известную направляющую группу для лизосом на основе амина - морфолин, синтезировав зонд **146** (Схема 54).[119] Включение морфолиновой группы в качестве таргетной группы для лизосом является широко используемой стратегией для разработки флуоресцентных зондов, нацеленных на лизосомы.[120] Интересно, что флуоресцентная конфокальная микроскопия красителя **146** в клетках MO3.13 и NHLF показала, что краситель одновременно окрашивает как клеточные лизосомы, так и митохондрии. Наблюдаемая лизосомальная селективность зонда **146** может быть объяснена хорошо установленной способностью морфолинового фрагмента направлять к лизосомам [120], но митохондриальная селективность оказалась неожиданной. Таким образом, двойная селективность зонда **146** по отношению к лизосомам и митохондриям дает убедительные доказательства важности роли донорной группы в архитектуре зонда D-π-A на основе бензотиазола в избирательности органелл.



146

Схема 54

При изучении данной серии красителей у исследовательской группы возник вопрос, почему зонды с донорными группами основного алкиламина ($-NR_2 = NMe_2$, $pK_a \approx 5.15$; и $-NR_2 = NEt_2$, $pK_a \approx 6.61$) направляются к клеточным митохондриям, а не к кислым клеточным органеллам, таким как лизосомы ($pH \approx 4.6$). Красители **135-141** с донорными группами алкиламинов не проявляли какой-либо специфичности по отношению к клеточным лизосомам.[116,117] Тем не менее, многие хорошо известные флуоресцентные зонды с основными функциональными группами (например, коммерческие красители Lyso-Tracker™) были успешно использованы для нацеливания на кислые клеточные органеллы, такие как лизосомы.[121] Основываясь на полученных экспериментальных данных, авторы выдвинули два важных постулата: 1) наблюдаемая лизосомальная селективность зонда **146**, возможно, возникла из-за сайт-специфического связывания морфолиновой группы, но вряд ли из-за ее «основности»; 2) основность донорной группы алкиламина (NR_2) в системе D-π-A хромофора не обязательно действует как ацидотропная таргентная группа.[122] Чтобы понять влияние донорного фрагмента в системе D-π-A хромофора на специфичность связывания с органеллами, авторы синтезировали красители **147-148** (Схема 55), содержащие в качестве донорной группы неосновный ароматический амин ($-NR_2 = -NPh_2$; $pK_a \approx 0.79$).[123] В отличие от описанных выше красителей, для соединений **147-148** наблюдались значительно отличающиеся фотофизические свойства и селективность в отношении органелл. Зонды **147** и **148** почти не флуоресцировали во многих полярных и неполярных растворителях, но проявляли ярко-красную флуоресценцию ($\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}} \approx 630\text{--}640$ нм) в окрашенных клетках MO3.13 и NHLF при очень низких концентрациях зонда (~ 200 нМ). Исследования по солокализации на основе флуоресцентной конфокальной микроскопии показали превосходную лизосомальную селективность зондов **147**, **148**. Было обнаружено, что фотостабильность красителей зависит от заместителя (R') у четвертичного атома азота, производное с бензиловым заместителем (**148**) показало большую фотостабильность, по сравнению с метиловым (**147**). Однако описанные красители проявляли сильное разгорание флуоресценции при взаимодействии с такими белками, как альбумин.[124] Авторы предположили, что механизм включения флуоресценции соединений **147-148** при локализации в клеточных лизосомах связан с его белковыми

взаимодействиями. Таким образом, наблюдаемое явление переключения селективности в зависимости от донорного фрагмента может быть очень полезно при разработке новых флуоресцентных зондов, нацеленных на органеллы для биовизуализации живых клеток.

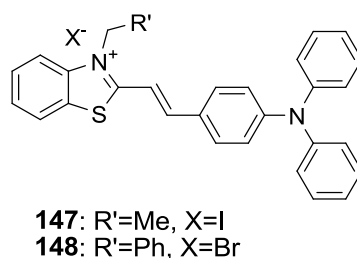


Схема 55

В работе [125] коллективом авторов из Хорватии, Болгарии и Дании была разработана серия из девяти стироловых красителей **149-157**, содержащих различные N-четвертичные гетероциклы (Схема 56). При дизайне структур в качестве гетероциклических фрагментов были выбраны *o*- и *n*- хинолины, *o*- и *n*- пиридины а также серия из пяти близкородственных гетероароматических конденсированных систем, содержащих сопряженные шестичленные и пятичленные кольца. С помощью таких модификаций авторы исследовали значение стерических свойств и влияние электронных свойств гетероциклов. Полученные результаты показали, что максимум поглощения красителей батохромно смещается в следующем порядке: **157 < 156 < 153 = 151 < 152 < 150 < 149 < 154 < 155**. Также было обнаружено, что Стоксов сдвиг (94–203 нм) и квантовый выход флуоресценции ($0.18\text{--}2.38 \cdot 10^{-2}$) сильно зависят от N-четвертичного гетероцикла. Красители **152-153**, **156-157**, содержащие фрагменты пиридиния или хинолиния, демонстрируют большой Стоксов сдвиг по сравнению с красителями, содержащими дополнительные гетероатомы, такие как кислород, сера и селен. Было обнаружено, что смена заместителей из *орто*- в *пара*-положение пиридиновых и хинолиновых гетероциклов значительно увеличивает квантовый выход флуоресценции. Чрезвычайно большой Стоксов сдвиг (до 203 нм) выгоден для практического применения таких красителей, поскольку это уменьшает процесс самотушения, следовательно, чувствительность флуорофоров повышается.

Спектрофотометрические исследования взаимодействия красителей с ДНК/РНК показали, что при связывании с биомолекулой все флуорофоры проявляли умеренный батохромный и гипохромный сдвиг в спектрах поглощения, сильное увеличение интенсивности флуоресценции, малые изменения в спектрах КД ДНК/РНК и незначительную стабилизацию дц- полинуклеотидов в экспериментах по термической денатурации. Сравнение констант связывания для разных красителей выявило несколько большее сродство **155** по сравнению с **154**, а также более высокое сродство **150**, **149** и хинолиниевых красителей **152**, **153** по

коэффициентом экстинкции, а иногда и высоким квантовым выходом флуоресценции. Однако между электронной структурой цианиновых и сквареновых красителей имеется важное различие. Цианиновый краситель является катионным (Схема 57), его два концевых атома азота связаны нечетным числом метеновых атомов углерода. Один из атомов азота представляет собой положительно заряженный иминий, а другой - амин. Сквареновый краситель также имеет полиметиновую структуру с аминными и иминиевыми фрагментами на концах (Схема 57), и по этой причине иногда их относят к цианинам. Однако сквареновый краситель имеет оксоциклобутенолатное ядро, обеспечивающее нейтральную цвиттер-ионную структуру, которая часто представлена резонансной структурой с циклобутендиилидиолатным ядром. Поскольку центральное четырехчленное кольцо интенсивно притягивает электроны, скварилии имеют донорно-акцепторно-донорную структуру с переносом заряда. Поэтому сквареновые красители следует отнести к соединениям, отличным от классических цианиновых красителей.

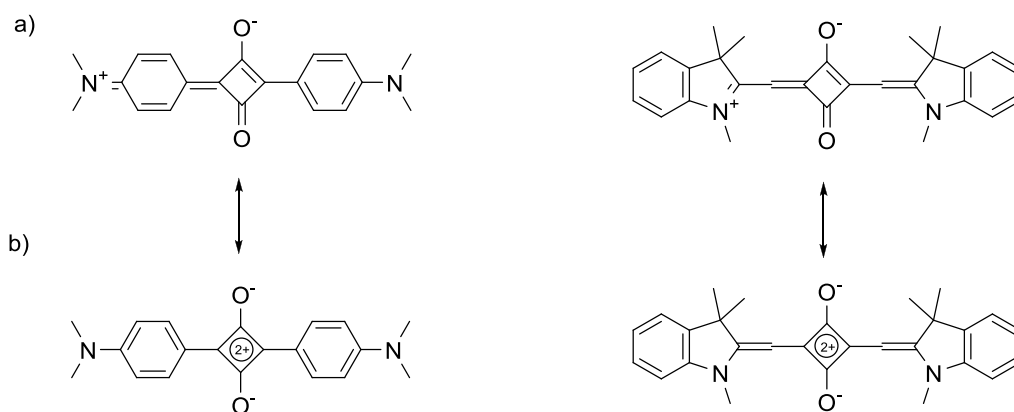
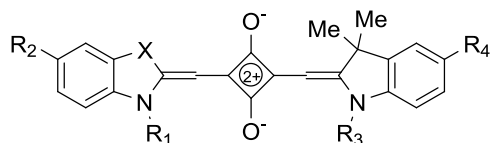


Схема 57

Сквареновые красители, как правило, стабильны, а их оптические свойства зависят от концевых гетероциклических или ароматических фрагментов. В последнее время этому классу красителей уделяется повышенное внимание как с научной, так и с технологической точек зрения.

На основе скварилия были разработаны красители для нековалентной маркировки белка БСА.[126] Поскольку производные скварилия флуоресцируют во всей области ИК-диапазона, они являются перспективным классом для разработки реагентов биоимиджинга. Группой исследователей под руководством Лаковича изучалась возможность применения симметричных и несимметричных скварилиевых красителей **158-162** (Схема 58) для флуорометрического анализа бычьего сывороточного альбумина. Спектры поглощения и флуоресценции красителей в метаноле характеризовались максимумом в области 628–635 нм и 644–662 нм соответственно (квантовый выход флуоресценции $\varphi^{\text{фл}} = 0.07\text{--}0.10$). При добавлении к раствору красителей БСА на спектрах наблюдались небольшие батохромные сдвиги максимумов, а также увеличение квантового выхода флуоресценции ($\varphi^{\text{фл}} = 0.34\text{--}0.78$) и времени жизни флуоресценции

красителей, что могло быть вызвано специфическим комплексообразованием красителей с гидрофобным сайтом связывания БСА. Симметричные красители на основе индолинина **158** и **159** в присутствии БСА продемонстрировали значительное усиление флуоресцентного отклика до $\varphi^{\text{фл}} = 0.7$ и высокую фотостабильность при воздействии окружающего света (обесцвечивание <10% в БСА-Н₂O через 120 ч). Несимметричный индолининсодержащий краситель **160** при комплексообразовании с БСА также показал высокую фотостабильность, но флуоресцентный отклик оказался менее эффективен ($\varphi^{\text{фл}} = 0.34$). С другой стороны, несимметричный краситель **161**, включающий индолининовый и бензотиазолиевый гетероциклы, проявлял меньшую фотостабильность (обесцвечивание 55% в БСА-Н₂O, через 120 ч), хотя кратность увеличения интенсивности флуоресценции была наибольшей. Другой спектроскопической особенностью скварилиевых красителей **158-162** является увеличение времени жизни флуоресценции при связывании с БСА. Время жизни этих красителей в присутствии водного раствора БСА было на порядок больше, чем в растворе метанола. Таким образом, оптические свойства описанных сквареновых красителей позволяют посредством флуориметрического анализа с временным разрешением их использование для распознавания БСА.



- 158:** X = CMe₂, R₁ = R₃ = Et, R₂ = R₄ = H,
159: X = CMe₂, R₁ = R₃ = Me, R₂ = R₄ = Cl,
160: X = CMe₂, R₁ = R₃ = Me, R₂ = Cl, R₄ = H,
161: X = S, R₁ = Me, R₃ = Et, R₂ = R₄ = H,
162: X = S, R₁ = Me, R₃ = Et, R₂ = H, R₄ = Cl,

Схема 58

Для увеличения растворимости красителей в воде Накадзуми и Яги ввели в скварилиевый остов карбоксильный фрагмент.[127] Представленные в данной работе несимметричные красители **163-167** (Схема 59) обладают высокой растворимостью в полярных растворителях, что позволяло приготовить буферный раствор Tris-HCl из раствора метанола без образования осадка. Для всех красителей, кроме **166**, при связывании с сывороточным альбумином человека (ЧСА) наблюдалось усиление флуоресценции. Так, квантовый выход красителя **165** достигал 0.92, что давало предел обнаружения 2 нМ ЧСА при отношении сигнал/шум=15. Анализ Джоба, основанный на изменении флуоресцентного отклика, показал стехиометрию комплексообразования 1:1, а константа связывания, рассчитанная по данным флуориметрического титрования, находится в диапазоне от $1.7 \cdot 10^5$ до $5.8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Для ЧСА возможно взаимодействие по трем сайтам связывания, а именно сайты дигитоксина, варфарина

и диазепам. Результаты конкурентного титрования показали, что сквареновые красители связываются с варфариновым сайтом. У красителя **163** усиление эмиссии также наблюдалось и в присутствии БСА. Таким образом, используя водорастворимые скварилиевые красители, исследователям удалось проанализировать белки методом капиллярного электрофореза с лазерно-индуцированной флуоресценцией.[128,129]

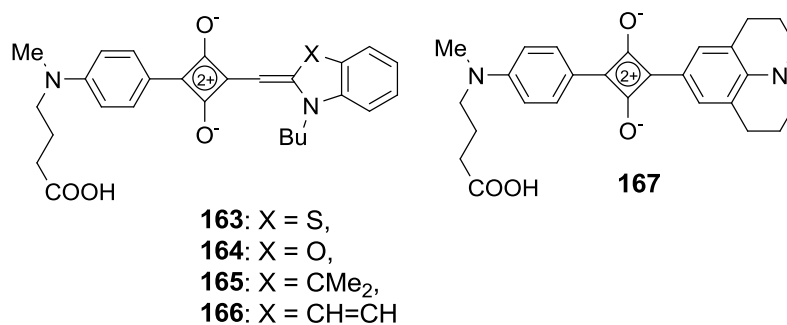


Схема 59

На основе скварилия в работе [130] был разработан новый водорастворимый многофункциональный краситель **168** (Схема 60), содержащий четыре первичные аминогруппы. Аминогруппы вводили для улучшения растворимости в воде и создания активных центров для дальнейшего взаимодействия с биомолекулами. Спектры поглощения и эмиссии красителя смещены в красную область и характеризуются соответствующими максимумами при 638 нм и 647 нм. Квантовый выход флуоресценции был равен 0.3. Авторы предположили, что вследствие протонирования аминогрупп в водном растворе, четыре первичные аминогруппы могут обеспечивать положительный заряд и взаимодействовать с отрицательно заряженными фосфатными группами в ДНК/РНК в ядрах клеток или других биомолекулах и органеллах, таких как бислой фосфолипидов клетки. Для проверки данного предположения с помощью спектрального анализа было выявлено прямое взаимодействие **168** с ДНК. Интенсивность эмиссии комплекса **168** с ДНК увеличивалась по сравнению с красителем **168** в свободном виде. Кроме того, зонд **168** в комплексе с ДНК демонстрирует батохромный сдвиг максимума флуоресценции на 2 нм. Интересно, что при добавлении избытков ДНК на спектрах поглощения наблюдалось уменьшение максимума при 638 нм и увеличение при 607 нм, что можно объяснить агрегацией красителя при взаимодействии с ДНК.[131] На спектрах КД после связывания **168** с ДНК наблюдались два новых индуцированных пика при 592 и 655 нм, соответствующих агрегации **168** в малой бороздке. Биологические эксперименты показали, что краситель **168** нецитотоксичен для клеток дрозофилы и мышей, обладает хорошей биосовместимостью и локализуется в мембранах живых клеток, но не ядер, что указывает на то, что при нанесении на живую ткань зонд **168** не способен проникать в ядра клеток. Однако эксперименты по солокализации с ядерным красителем DAPI на фиксированных клетках

показали совпадение в области окрашивания. Флуоресцентная визуализация ядер в основном связана с взаимодействием производного **168** с ДНК в ядре клетки посредством электростатических сил и водородных связей. Исключительно ядерное окрашивание фиксированных клеток предполагает, что взаимодействие **168** с ДНК намного эффективнее, чем **168** с мембраной. Окрашивая разные области в живых и мертвых клетках, такой краситель может найти применение в качестве специфического маркера для обнаружения апоптотических клеток среди живых клеток/тканей.

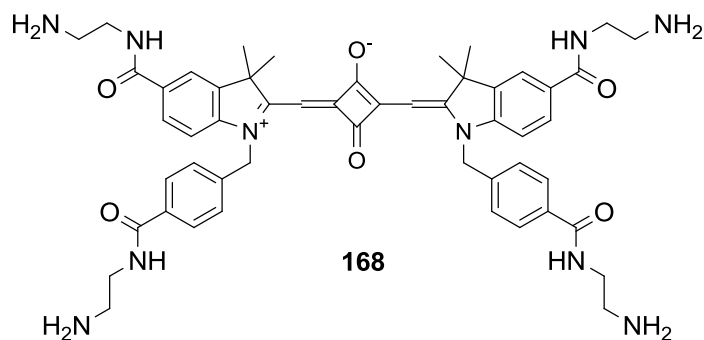


Схема 60

В статье [132] был синтезирован новый амфифильный лизосомный трекер **169** (Схема 61), содержащий два атома брома и два первичных амина. Как и в предыдущем примере, за счет протонирования в водной среде амино группы обеспечивали растворимость в воде, а также электростатическое связывание с мембранами лизосом. С другой стороны, индольный фрагмент **169** встраивается и связывается с мембраной лизосом благодаря гидрофобным взаимодействиям. Биологические эксперименты по солюкализации с зондом Lyso-Tracker показали перекрывающиеся области окрашивания, что свидетельствует о хорошей специфичности **169** для мечения лизосом. При этом интенсивность флуоресценции **169** оказалась выше, чем у Lyso-Tracker, что указывает на то, что краситель **169** более эффективен для визуализации и мониторинга лизосом. Эксперименты по цитотоксичности показали 80%-ную выживаемость клеток при всех протестированных концентрациях, что свидетельствует о хорошей биосовместимости соединения **169**.

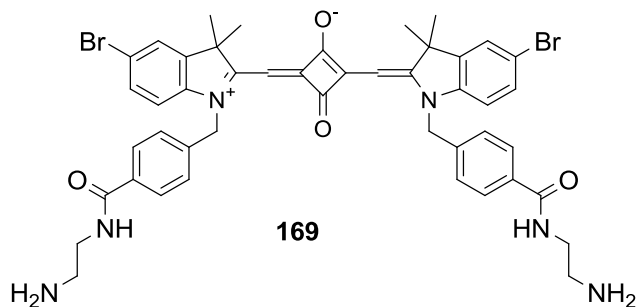


Схема 61

2.9.Тиофеновые красители

Тиофен является одним из наиболее изученных пятичленных гетероциклических соединений. В процессе изучения оптических свойств пятичленных гетероциклических соединений было замечено, что они часто проявляют сильные фотолюминесцентные свойства, такие как длинноволновое излучение и поглощение, большой коэффициент молярной экстинкции и высокие значения квантового выхода флуоресценции, и они широко используются в светоизлучающих материалах.[133] К преимуществам тиофеновых производных относится широкая вариабельность структурных изменений, а также высокая поляризуемость атомов серы в кольце, которая приводит к стабилизации сопряженной цепи, что определяет хорошие свойства переноса электрона и заряда.[134] Олиго- и политиофены имеют частоты флуоресценции, настраиваемые в широком диапазоне видимой области, обладают большой поглощающей способностью и высокой эффективностью флуоресценции [135], и поэтому они могут использоваться в качестве флуорометрических и колориметрических хемосенсоров в биологии. Кроме того в литературе представлено множество примеров различных зондов на основе тиофена для распознавания катионов и анионов.[136]

В работе [137] представлены исследования заряженного тиофенового красителя **170** (Схема 62) в качестве флуоресцентного зонда для распознавания ДНК. Спектр поглощения и эмиссии красителя в водном буфере содержит максимумы при 436 нм и 571 нм соответственно, Стоксов сдвиг красителя составил 135 нм. Связывание красителя и ДНК подтверждали оптическими физико-химическими методами, при добавлении биомолекулы на спектрах поглощения наблюдалось увеличение интенсивности максимума с небольшим батохромным сдвигом, квантовый выход флуоресценции красителя возрастал с $\varphi^{\text{фл}} = 0.025$ до $\varphi^{\text{фл}} = 0.16$. Однако при добавлении к красителю растворов РНК и БСА наблюдалось умеренное разгорание флуоресценции, что подтверждает высокую селективность красителя в отношении ДНК *in vitro*. По спектрам КД и конкурентному титрованию с этидиумбромидом был определен интеркаляционный режим связывания. Биологические эксперименты по солокализации с ядерным красителем DAPI показали, что **170** локализуется в ядрышках, где синтезируются рибосомные РНК. Эксперименты по расщеплению ДНКазой и РНКазой подтвердили большую аффинность **170** к РНК в клетке. Таким образом, результаты внутриклеточных экспериментов противоречат данным, полученным ранее, что может быть связано с различием между структурами ДНК и РНК в растворе и внутри клетки. В дальнейших экспериментах краситель проявил высокую фотостабильность и низкую цитотоксичность для клеток HepG-2.

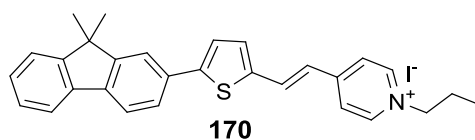


Схема 62

Коллективом британских ученых были разработаны и исследованы 4 заряженных тиофеновых красителя **171-174** (Схема 63).[138] Данные соединения были предложены для флуоресцентного мечения плазматических мембран клетки и в ходе исследования их свойства сравнивали с характеристиками коммерчески доступного красителя для мембран FM4-64. Синтезированные красители имели максимум поглощения в области 506 - 583 нм, максимум флуоресценции в ближней ИК области (723 – 804 нм), большие Стоксовы сдвиги (4000–6000 см^{-1}). Красители не проявили заметной эмиссии в водных растворах, но при добавлении к раствору ПАВ полисорбат-80, как и для FM4-64, наблюдалось усиление эмиссии с небольшим гипсохромным смещением, что объясняется сменой водной среды красителя на гидрофобное окружение мицелл полисорбата-80. Однозарядные метилпиридиниевые красители **171** и **173** токсичны для клеток HeLa в темноте при концентрациях выше 1 μM , тогда как красители с двухзарядными головными группами **172** и **174** проявляют темную токсичность только при концентрациях выше 50 μM . Более высокая токсичность однозарядных соединений метилпиридиния **171** и **173**, по-видимому, связана с их быстрой проницаемостью в клетки. Предварительная визуализация больших однослойных везикул показала, что все красители локализуются в липидных бислоях мембран, и при внедрении в мембрану их флуоресцентный отклик увеличивается. Красители **172** и **174** показали наибольшее увеличение интенсивности флуоресценции при встраивании в липидный бислой, давая более яркие изображения по сравнению с FM4-64 при одинаковых концентрациях.

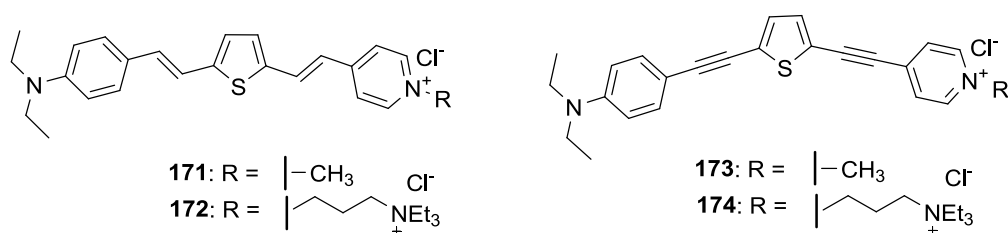


Схема 63

В литературе представлено не так много примеров нейтральных зондов, нацеленных на митохондрии. Серия таких соединений **175-178** (Схема 64) на основе тиофена была синтезирована исследователями из Китая.[139] Все соединения демонстрируют две интенсивные полосы поглощения примерно при 300 нм, соответствующей π - π^* -переходу, и 410 нм, относящейся к внутримолекулярному переносу заряда. При двухфотонном возбуждении красители имеют максимум эмиссии при 850 нм. Биологические эксперименты показали, что

все четыре красителя эффективно поглощаются живыми клетками HepG2 и демонстрируют низкую токсичность при концентрации 10 нМ - 1 мМ. Благодаря легкому протонированию трипиридиновых фрагментов при слабокислом pH, заряженные красители локализуются в митохондриях клетки, что подтвердили эксперименты по солокализации с Mito-tracker Deep Red. Окрашивание внутриклеточных митохондрий оставалось стабильным, не влияя на жизнеспособность клеток в течение 48 часов. Полученные результаты дали новую идею для разработки нейтральных митохондриальных зондов.

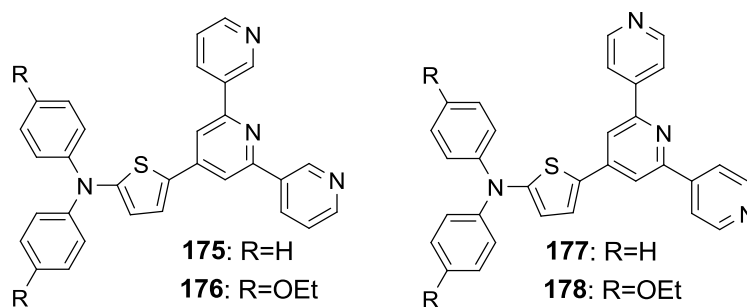


Схема 64

Коллективом исследователей из Италии был осуществлен синтез и проведено исследование двух биосовместимых флуоресцентных зондов на основе тиофена **179** и **180** (Схема 65) для специфической визуализации лизосом в живых образцах.[140] Структуры **179** и **180** были сконструированы путем соединения дифениламинового звена в положениях 4 и 4' молекул дитиофен-2-илметанона и этил 2-циано-3,3-ди(тиофен-2-ил)акрилата, соответственно, чтобы расширить π -сопряжение конечных соединений и получить хромофорные системы, которые позволяют точно контролировать цвет излучения красителей. Оптические спектры красителей **179** и **180** показали максимумы поглощения при 436 и 496 нм и максимумы флуоресценции при 528 и 536 нм соответственно. Квантовые выходы флуоресценции для **179** и **180** составили 0.051 и 0.007. При сравнении спектров поглощения и испускания были обнаружены большие Стоксовы сдвиги, 92 нм для **179** и 40 нм для **180**. В гидрофильных средах, например, в воде, интенсивность флуоресценции падала, и коэффициенты экстинкции двух красителей оказались ниже, чем в дихлорметане. Эти результаты согласуются с общими наблюдениями для органических красителей, что флуоресценция имеет большую интенсивность в органических растворителях и часто гасится в водной среде. Поэтому исследователи предположили, что соединения **179** и **180** с низким фоновым сигналом подходят для окрашивания гидрофобных биомембран. Кроме того, было обнаружено, что эти красители нечувствительны к pH среды, сохраняя неизменными интенсивности поглощения и испускания в диапазоне pH 2.0–10.0. Эксперименты по солокализации с красителями Mito-Tracker и Lyso-Tracker показали преимущественную локализацию тиофеновых производных в лизосомах. В биологических экспериментах на клеточной линии MCF7 данные красители продемонстрировали низкую

цитотоксичность и более высокую фотостабильность по сравнению с коммерческими красителями для митохондрий и лизосом.

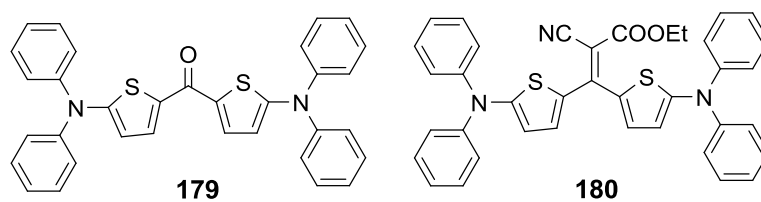
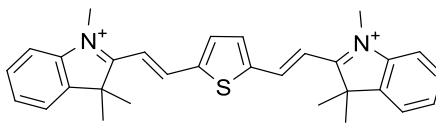


Схема 65

Баек и коллеги в работе [141] разработали чувствительный к вязкости флуоресцентный краситель, а именно тиофендигемицианин **181** (Схема 66), который позволяет специфически окрашивать митохондрии. Дизайн красителей был осуществлен следующим образом. Во-первых, в красителе **181** имелись положительные заряды для обеспечения эффективного накопления потенциала мембраны митохондрий. Во-вторых, сильный внутримолекулярный эффект переноса заряда (ICT) делает краситель **181** типичным молекулярным ротором. Таким образом, можно ожидать интенсивный флуоресцентный ответ **181** в вязких средах. Кроме того, было показано, что изменения вязкости митохондрий являются важным индикатором многих метаболических функций.[142] Исследования показали, что краситель практически не флуоресцировал при возбуждении в невязком растворе, напротив, сильный пик эмиссии с максимумом при 600 нм был обнаружен в высоковязких растворах. Кроме того, интенсивность флуоресценции постепенно увеличивалась в соответствии с увеличением вязкости. В диапазоне вязкости (0–453 сП) была получена хорошая линейная зависимость между интенсивностью флуоресценции и вязкостью. Эти данные показали, что краситель **181** может служить в качестве чувствительного к вязкости флуоресцентного красителя. Основной механизм этого явления определения вязкости можно объяснить эффектом молекулярного ротора. В невязких растворах внутримолекулярное свободное вращение вокруг виниловой связи **181** вызывает безызлучательное затухание возбужденного состояния, что приводит к значительному тушению флуоресценции. Однако в вязкой среде это свободное вращение затрудняется, что снижает безызлучательные пути релаксации и восстанавливает начальную флуоресценцию. Эксперименты по локализации красителя показали совпадение областей окрашивания **181** с Mito-tracker Deep Red, что говорит о преимущественном окрашивании красителем митохондрий. По сравнению с наиболее популярным митохондриальным красителем (Mito-tracker Deep Red, MTDR) краситель **181** показал высокую чувствительность к мембранному потенциалу митохондрий и изменениям внутримитохондриальной вязкости, а также более высокую фотостабильность. Данный краситель впоследствии использовался для визуализации митохондриального транспорта в первичных кортикальных нейронах с высоким разрешением,

где четко визуализировался быстрый транспорт трубчатых митохондрий вдоль дендритов и аксонов.



181

Схема 66

2.10. Гибридные красители

Особый интерес представляет класс так называемых гибридных красителей. В структуре они могут содержать несколько фрагментов красителей одного или различных классов. В предыдущих главах данного обзора уже были представлены примеры бисхромофорных структур в основном симметричного строения (**67-68**, **71**, **129a-c**, **133-134**). В данной главе будут рассмотрены примеры исследований в биовизуализации гибридных красителей несимметричного строения, то есть в структуре которых содержатся хромофорные системы различных классов красителей.

Один из примеров использования гибридных молекул-красителей в био-имиджинге представлен в работе [143]. Авторы разработали и синтезировали серию красителей **182-186** (Схема 67), которые структурно состояли из классического кумарина и хроменхинолина. Изучение оптических характеристик соединений **182-185** в дихлорметане показало, что красители имеют максимум поглощения в области 446 - 474 нм, и максимум испускания – в области 520 - 606 нм. Замена метильной группы в структуре красителя **182** на трифторметильный фрагмент с получением красителя **183** приводило к сильному батохромному смещению максимума флуоресценции ($\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}} = 605$ нм, $\Delta\lambda = 85$ нм), что значительно увеличивало Стоксов сдвиг красителя (155 нм). Такие оптические изменения вполне логичны, поскольку введение сильной электроноакцепторной трифторметильной группы усиливает протекание ICT-процесса. Введение джулолидинового фрагмента в структуру красителя **182** с получением красителя **184**, приводило к смещению максимума флуоресценции в красную область спектра ($\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}} = 546$ нм), поскольку джулолидиновая группа является более сильным донором электронов, чем диэтиламиногруппа. Для красителя **185**, имеющего в структуре джулолидиноый и трифторметильный фрагмент, оптические свойства были аналогичны красителю **183**, за исключением того, что максимум спектра поглощения был слабо смещен в красную область. Полученные красители показали высокие квантовые выходы флуоресценции ($\varphi^{\text{фл}} = 57.6\%$ для **182** и $\varphi^{\text{фл}} = 60.3\%$ для **184**). Стоит отметить, что введение джулолидиновой

группы не приводило к уменьшению интенсивности флуоресценции, что может быть связано с ингибированием ПИСТ-процесса. В отличие от лигандов **182-185** для получения красителя **186** в качестве исходного субстрата был использован 6-аминокумарин (вместо 7-аминокумарина), что приводило к получению конъюгата иной формы. По сравнению с лигандом **182** максимум спектра поглощения красителя **186** был смещен в синюю область на 80 нм, а максимум спектра флуоресценции был батохромно сдвинут на 27 нм, что приводило к увеличению Стоксового сдвига красителя (181 нм). В экспериментах по облучению растворов красителей ксеноновой лампой соединения проявили высокую фотостабильность. Результаты МТТ-теста показали высокий процент выживаемости клеток, инкубированных красителем **182**, что говорит о низкой цитотоксичности таких соединений. Далее авторы исследовали возможность использования полученных красителей для визуализации живых клеток. После инкубации клеток HeLa в присутствии красителя **182** с помощью конфокальной микроскопии было показано, что лиганд эффективно проникает внутрь и окрашивает клетки. Также были проведены эксперименты по окрашиванию *in vivo*: после инкубации рыбок данио с красителем **182** (5.0 μM) у рыбок наблюдался сильный флуоресцентный сигнал. Полученные результаты показали, что красители **182-186** способны окрашивать живые клетки с низкой цитотоксичностью, и могут использоваться для биовизуализации *in vivo*.

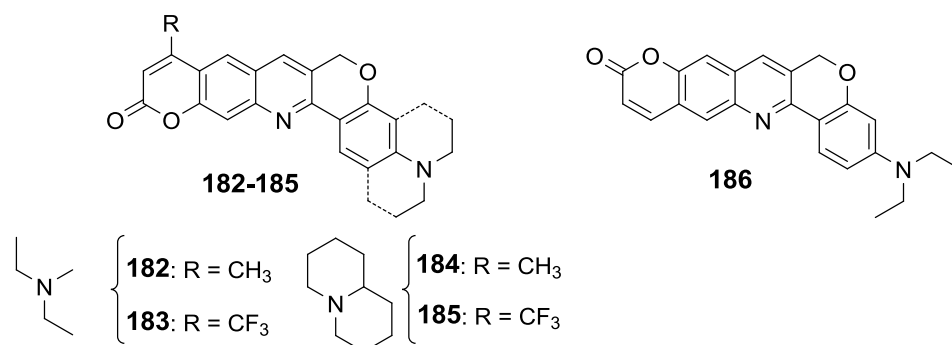


Схема 67

Коллективом турецких авторов в работе [144] были успешно синтезированы и охарактеризованы три новые гибридные красители **187-189** (Схема 68), содержащие в структуре BODIPY-остов и моно-, ди- и три-нафталимидные фрагменты. Спектры поглощения красителей **187-189** в дихлорметане содержали две полосы: в области 358-364 нм, соответствующая π - π^* -переходу нафталимидного хромофора, и в дальневолновой области 502-635 нм, которые соответствуют переходу S_0 - S_1 BODIPY-хромофора. При облучении красителя **187** светом длиной волны $\lambda_{\text{возб}}=470$ нм наблюдалась эмиссия красителя с максимумом при 513 нм и квантовым выходом флуоресценции $\varphi^{\text{фл}} = 0.23$. Краситель **188** показал полосу испускания в более дальневолновой области при 578 нм ($\lambda_{\text{возб}} = 510$ нм) с умеренным значением $\varphi^{\text{фл}} = 0.13$.

Максимум эмиссии лиганда **189** наблюдался при 647 нм ($\lambda_{\text{возб}} = 610$ нм), а значение квантового выхода флуоресценции составило $\varphi^{\text{фл}} = 0.16$. Также для полученных соединений авторами были измерены значения времени жизни флуоресценции, которые составляли 3.56 нс (краситель **187**), 3.92 нс (краситель **188**) и 4.15 нс (краситель **189**). Далее авторы использовали полученные соединения для окрашивания линии клеток PLC/PRF/5, где красители продемонстрировали проникновение внутрь клетки и цитоплазматическое окрашивание. Эксперименты по выявлению антимикробной активности показали, что BODIPY-нафталиимидные гибридные красители проявляют антибактериальную активность как против грамположительных (*S. aureus*), так и грамотрицательных (*E. coli*) бактерий. Наиболее активное соединение **189**, содержащее три нафталиимидных фрагмента, показало эффективное ингибирование роста бактерий *E. coli* и *S. aureus*.

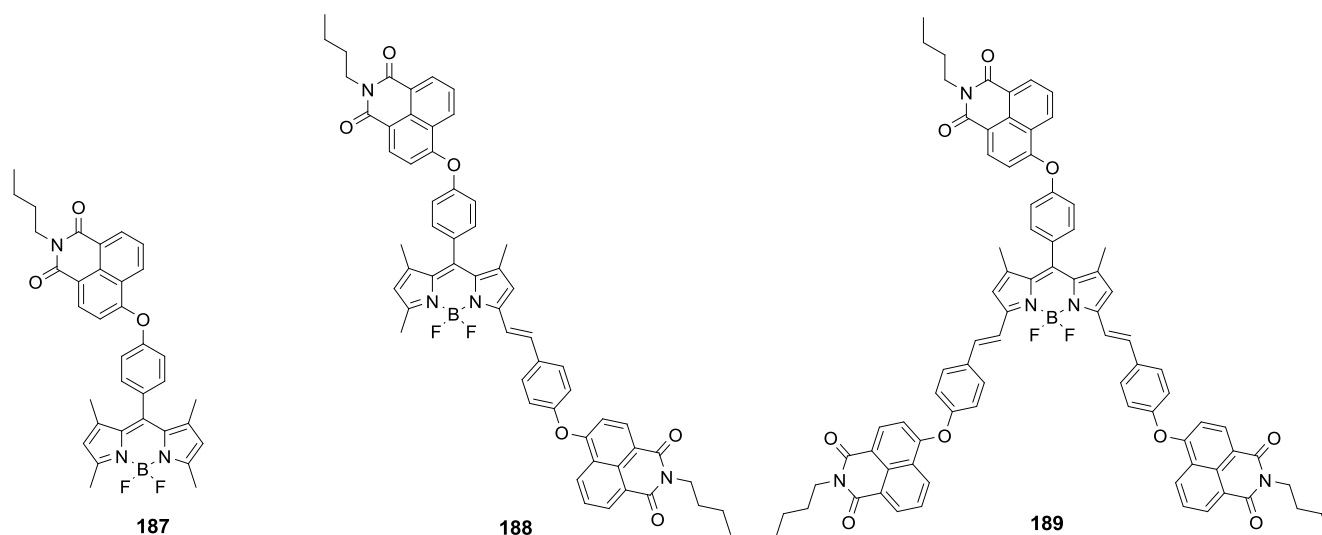
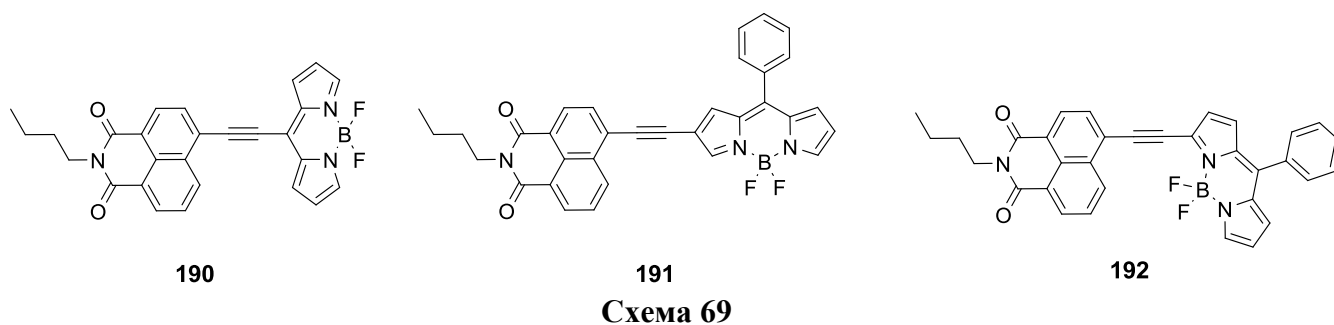


Схема 68

В работе [145] были разработаны и синтезированы три бисхромофорных красителя **190-192** (Схема 69), представляющие собой мезо-, β - и α -нафталиимидзамещенный BODIPY-краситель. В спектрах поглощения растворов данных красителей в дихлорметане наблюдались две полосы: одна - в области 465–600 нм с высокими молярными коэффициентами экстинкции, характерная для π - π^* -перехода BODIPY-хромофора, другая полоса - в области 300–450 нм со сравнительно более низкими молярными коэффициентами экстинкции, соответствующая π - π^* -переходу нафталиимидного фрагмента. Максимум поглощения α -замещенного красителя **192** сдвинут в более красную область относительно максимумов полос поглощения лигандов **190-191**, этот краситель также имеет более высокий молярный коэффициент экстинкции. Наиболее высокий квантовый выход флуоресценции показал краситель **192** ($\varphi^{\text{фл}} = 0.94$), с максимумом эмиссии при 583 нм, тогда как бисхромофор **190** демонстрировал испускание при 584 нм с более низкой

интенсивностью ($\phi^{\text{фл}} = 0.32$). При том, что эмиссия красителя **191** была наиболее длинноволновой с максимумом при 603 нм, его квантовый выход флуоресценции оказался самым низким ($\phi^{\text{фл}} = 0.31$). Наблюдаемые Стоксовы сдвиги для красителей **190-192** составляли 26 нм, 60 нм и 12 нм соответственно. В биологических экспериментах красители **190-192** показали низкую цитотоксичность ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$). Исследования с помощью конфокальной микроскопии клеток HeLa и A375, инкубированных с лигандами **190-192**, показали, что полученные соединения легко проникают через клеточную мембрану и демонстрируют интенсивную многоцветную внутриклеточную флуоресценцию, перекрывающую весь видимый диапазон с четкими сигналами эмиссии в синем, зеленом и красном каналах. При детальном рассмотрении изображений конфокальной микроскопии можно отметить, что бисхромофоры **190-192** демонстрируют флуоресцентное окрашивание во внеядерной области с четкими границами ядерной мембраны и показывают неравномерное распределение внутри клетки.



Также в литературе представлены примеры использования гибридных красителей для определения изменения внутриклеточной вязкости. В работе [146] сообщается о синтезе трех зондов **193-195** (Схема 70), состоящих из BODIPY-остова, сопряженного с роторным фениленовым (**193**), тиофениленовым (**194**) и кумариновым (**195**) фрагментом. Архитектура всех трех зондов представляет собой электроноакцепторное бордипиррометеновое ядро и электронодонорный фрагмент 2Н-хромен-2-он (кумарин). Среди полученных соединений только краситель **195** показал линейное увеличение интенсивности флуоресценции при изменении вязкости. Для зондов **193-194** аномальное затухание флуоресценции не позволило контролировать их связь с изменениями вязкости в области низких вязкостей (0.59–10 сП). Авторы отметили, что зонды **193-194**, которые имеют более крупный линкер между фрагментами кумарина и BODIPY, обладают большей планарностью, что облегчает динамику вращения зондов. Тем не менее, краситель **195** имеет незначительное увеличение жесткости роторного фрагмента, что повышает его чувствительность к вязкости в диапазоне низких значений. Авторами были проведены исследования конфокальной флуоресцентной микроскопии клеток HeLa, окрашенных полученными зондами, где наилучший контраст изображения показал лиганд **195**. Красители продемонстрировали неспецифическое

распределение в органеллах клетки. Такой тип локализации может быть следствием отсутствия формального распределения заряда и их относительно низкой гидрофобности, препятствующей селективной локализации. Тем не менее, модификация гибридно красителя **195** фрагментами, нацеливающими его локализацию в отдельных органеллах, позволило бы использование данного зонда для определения изменений вязкости локального микроокружения в клетке.

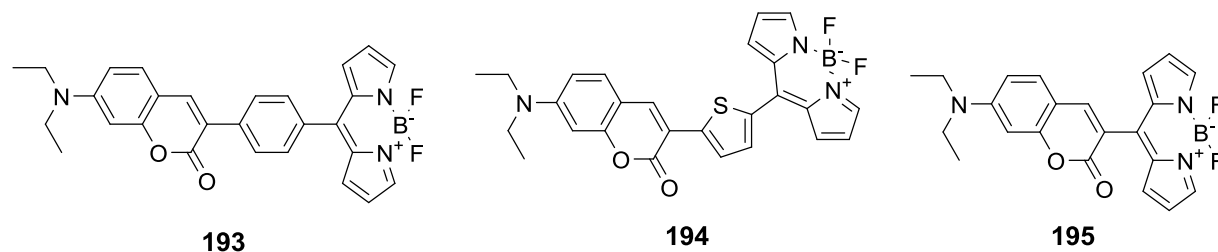


Схема 70

В работе [147] сообщается о синтезе бордипиррометенкумаринового красителя **196** (Схема 71), модифицированного трифенилфосфиновым фрагментов для таргетирования красителя на митохондрии. Связь С-С между фенильным спейсером и BODIPY может свободно вращаться, вызывая тушение флуоресценции в среде с низкой вязкостью, в более вязких средах вращение становится затруднительно, что приводит к усилению флуоресценции. Спектр флуоресценции красителя **196** характеризуется двумя полосами с максимумами при 427 и 516 нм, соответствующими кумариновому и BODIPY-хромофору. В растворе метанола краситель показал низкий квантовый выход флуоресценции, поскольку эмиссия гасится из-за быстрого вращения связи С-С между фенильным- и BODIPY-фрагментами. При увеличении вязкости среды наблюдался рост интенсивностей каждой из полос. Однако, в вязкой среде эмиссия BODIPY (516 нм) показала больший рост интенсивности по сравнению с эмиссией кумаринового фрагмента при 427 нм. Авторами была определена прямая линейная зависимость отношения интенсивностей флуоресценции (I_{516} / I_{427}) от вязкости растворителя (η). Следовательно, краситель **196** можно использовать для ратиометрического определения вязкости в различных средах, включая биологические системы. Эксперименты по определению локализации красителя в клетках показали преимущественное расположение в митохондриях. Для определения возможности использования соединения **196** для визуализации митохондриальной вязкости, были получены конфокальные лазерные флуоресцентные изображения клеток HeLa, дополнительно обработанных ионофорами монензином и нистатином. Известно, что монензин и нистатин вызывают нарушения работы митохондрий, вызванные структурными изменениями или набуханием органеллы. Используя линейную зависимость между соотношением интенсивности флуоресценций и вязкостью, была

установлена средняя вязкость митохондрий в клетках HeLa, значение которой было около 62.8 сП. После обработки клеток монензином и нистатином соотношение интенсивностей флуоресценции (I_{516} / I_{427}) явно увеличилось. Значения I_{516} / I_{427} после инкубации с монензином и нистатином составили 2.44 ± 0.50 и 2.62 ± 0.48 , что было эквивалентно 90.5 и 109 сП соответственно. Чтобы подтвердить результаты ратиометрического измерения митохондриальной вязкости, также был проведен эксперимент по визуализации времени жизни флуоресценции (FLIM). Время жизни митохондриальной флуоресценции красителя **196** в клетках HeLa было измерено как ~ 1.4 нс, что указывает на вязкость ~ 67.5 сП. После обработки клеток монензином и нистатином наблюдалось увеличение времени жизни флуоресценции, которое составило ~ 1.55 нс (монензин) и ~ 1.90 нс (нистатин), что соответствует значениям вязкости ~ 80.8 и 112 сП. Полученные расчетные значения вязкости сопоставимы между собой. Таким образом, гибридный краситель **196** может использоваться для определения митохондриальной вязкости с высокой точностью и надежностью.

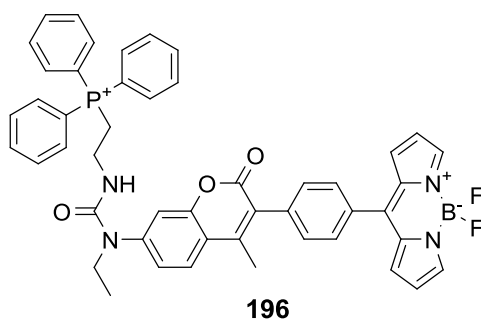


Схема 71

Коллективом китайских авторов в статье [148] сообщается о флуоресцентном ратиометрическом зонде **197** (Схема 72) для определения изменений вязкости в митохондриях. Для создания такого зонда авторы объединили в одну структуру кумариновый краситель, флуоресцентные свойства которого слабо зависят от вязкости среды, и стироловый краситель в качестве молекулярного ротора. Стироловый краситель содержал катион индолина как сильную электроноакцепторную группу и диметиламино-фрагмент в качестве сильной электронодонорной группы. Благодаря положительному заряду индола, краситель обретал свойства селективной локализации в митохондриях. В качестве линкера, соединяющего хромофорные фрагменты, для сохранения расстояния между хромофорами была выбрана гибкая углеродная цепь. При изучении оптических свойств красителя было показано, что при увеличении вязкости цвет раствора изменяется, а интенсивность флуоресценции многократно возрастала. Поскольку в данном соединении между хромофорами реализуется резонансный перенос энергии, при возбуждении раствора красителя в этаноле на длине волны 425 нм спектр флуоресценции содержал два относительно слабых пика при 477 нм и 609 нм. При увеличении

доли глицерина в растворе интенсивность полос эмиссии увеличивалась на каждой из длин волн, но увеличение интенсивности флуоресценции при 477 нм было намного меньше, чем при 609 нм. Кратность разгорания флуоресценции **197** при 609 нм составила 14.5 раз, но эмиссия при 477 нм показала лишь 2.9-кратное возращание. При построении зависимости между $\log(I_{609}/I_{477})$ и $\log(\text{вязкость})$ краситель **197** показал хорошую линейную зависимость с коэффициентом корреляции 0.99, что указывает на то, что данное соединение можно использовать в качестве ратиометрического флуоресцентного зонда для количественного определения вязкости раствора. Также краситель **197** показал высокую фотостабильность и низкую цитотоксичность для клеток HeLa. Флуоресцентная визуализация клеток, окрашенных **197**, показала, что краситель проникаем для мембран и накапливается в митохондриях. Таким образом, соединение **197** может использоваться в качестве эффективного зонда для контроля уровня вязкости в митохондриях.

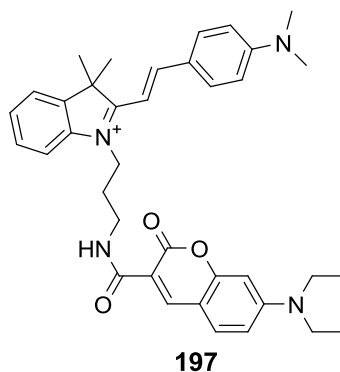


Схема 72

Авторы из Канады сообщают о синтезе и исследовании нового флуоресцентного зонда **198** (Схема 73).[149] Стратегия разработки гибридного митохондриального зонда **198** заключалась в объединении флуоресцентного молекулярного ротора на основе фенилхиноксалина, который подвергается внутреннему вращению со скоростью, зависящей от локальной микровязкости[150] (но не зависящей от изменений полярности), с кумарином 343, сольватохромным зондом полярности[151], внутреннее вращение которого заблокировано, что позволяет избежать локальных перекрестных помех микровязкости. Присоединение этих двух красителей к концам нацеленного на митохондрии пептида разделяет функциональные модули зонда, и, таким образом, электрическая дипольная природа и сольватохромный характер кумаринового фрагмента определяются исключительно полярностью клеточного микроокружения. С другой стороны, профиль затухания флуоресценции нейтрального фенилхиноксалинового ротора определяется исключительно изменениями его локальной микровязкости, а его большой Стоксов сдвиг предотвращает дезактивацию за счет переноса энергии. Такие два зонда позволяют измерять в окружающей среде два разных явления;

микровязкость измеряют, контролируя время жизни флуоресценции фенилхиноксалинового хромофора, а микрополярность определяют, контролируя профиль флуоресценции кумаринового сенсора. Вектор доставки представляет собой нацеленный на митохондрии пептид, не разрушающий при этом мембрану.[152] При введении в структуру гибридного красителя такого пептида, соединение **198** обрело свойство локализации в митохондриях клетки, что было подтверждено экспериментами по солокализации с использованием красителя Mito-Tracker.

Для определения возможности использования фенилхиноксалина в качестве сенсора вязкости авторы исследовали влияние вязкости среды растворителя на скорость процесса безызлучательной релаксации. Для построения калибровочной прямой исследователи измеряли время жизни флуоресценции (τ) красителя **198** в зависимости от вязкости с использованием смесей метанол/глицерин. Флуоресценцию каждого из хромофоров контролировали по зеленому каналу (от 400 нм до 570 нм), который включает полосы эмиссии фенилхиноксалина (τ_1) и кумарина 343 (τ_2). По мере увеличения вязкости значение τ_1 увеличивались с 1.19 ± 0.17 до 4.89 ± 0.32 нс, в то время как значения τ_2 демонстрировали гораздо меньшее увеличение. Небольшое изменение времени жизни флуоресценции кумарина 343, вероятно, отражает небольшое увеличение полярности смесей растворителей при изменении вязкости.

Фрагмент кумарина 343 в структуре **198** не проявляет существенных изменений во времени жизни флуоресценции с увеличением вязкости, однако хромофор проявил значительную чувствительность к полярности среды растворителя. Интенсивность эмиссии кумарина сильно усиливается по мере уменьшения полярности растворителя. При количественном определении соотношения интенсивности флуоресценции при 420 нм и 570 нм (I_{420}/I_{570}) наблюдалась линейная зависимость с коэффициентом регрессии $R^2 = 0.99$.

Биологические эксперименты на клетках HeLa показали, что гибридный краситель **198** представляет собой новый мощный инструмент для одновременного мониторинга локальной микровязкости, микрополярности и морфологических изменений в митохондриях. Авторами было показано, что зонд надежно контролирует влияние агентов, вызывающих набухание органелл и апоптоз, на физико-химические свойства митохондрий. В частности, с использованием таргетного зонда **198** впервые количественно проанализировано сильное влияние нистатина не только на морфологию, но и на микрополярность и микровязкость митохондрий. Таким образом, полученный бисхромофорный зонд представляет собой надежную платформу для мониторинга этих параметров в режиме реального времени. Учитывая важность микровязкости и микрополярности для митохондриальной функции и биоэнергетики клетки, краситель **198** является перспективным инструментом для дальнейшего изучения этих параметров в биологии и медицине. Кроме того, сочетание такого типа

многофункционального зонда со спектроскопией сверхвысокого разрешения обеспечит мощный инструмент для характеристики клеток.

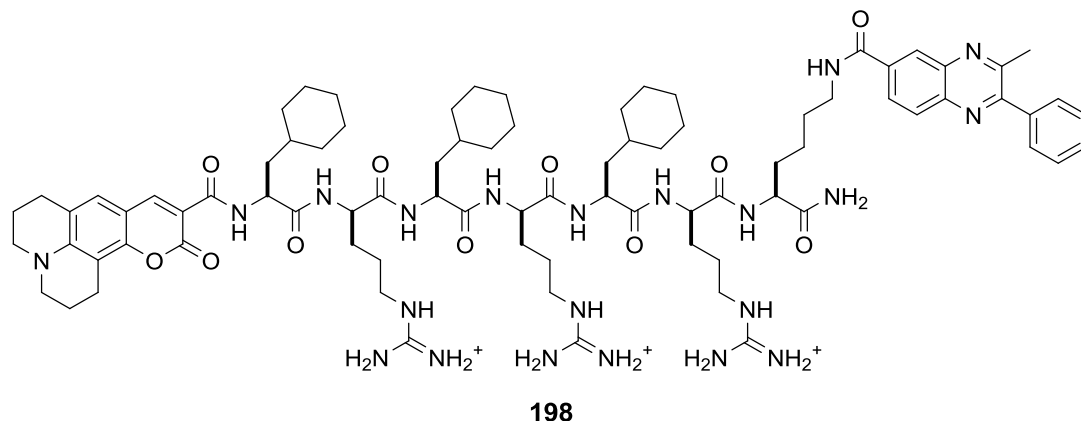


Схема 73

В работе [153] были разработаны и синтезированы два нафталимидзамещенных стироловых красителя **199**, **200** с различными размерами ароматических групп (Схема 74). Авторы выбрали полиароматические красители для создания бисхромофорного сенсора для G-квадруплексной ДНК. Введение ароматических групп в структуру красителя способствует π - π стэкингу между лигандом и ДНК, что в целом увеличивает эффективность взаимодействия с биомолекулой. Исследования комплексообразования полученных красителей с различными последовательностями ДНК показали, что соединение **199**, содержащее в структуре ароматическую группу большого размера, демонстрирует гораздо большее усиление флуоресценции и селективность по отношению к G-квадруплексным структурам. Спектры поглощения и результаты просвечивающей электронной микроскопии показали, что в буферном растворе **199** может образовывать агрегаты и дезагрегировать в присутствии G-ДНК. Также авторы оценили цитотоксичность полученных соединений по отношению к различным опухолевым и незлокачественным клеткам. Оказалось, что оба красителя обладают более эффективной противораковой активностью, чем препарат 5-фторурацил. Кроме того, потенциальное применение красителя **199** было продемонстрировано путем окрашивания и визуализации живых клеток HeLa. Полученные результаты показали, что новый краситель **199** можно использовать для специфичного биомолекулярного распознавания G-квадруплексной ДНК и визуализации клеток.

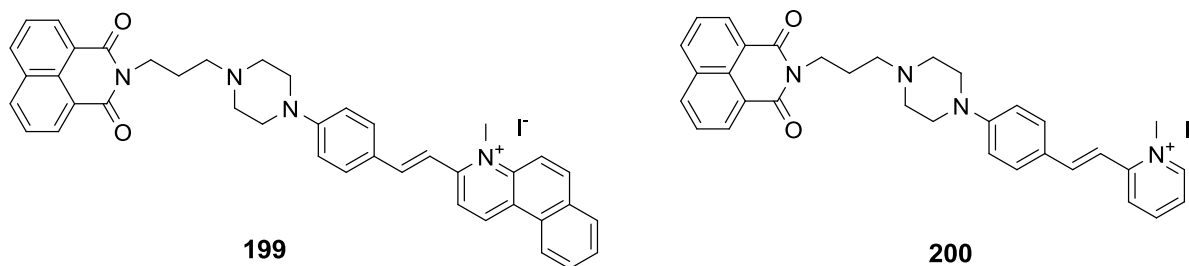


Схема 74

В статье [154] представлена серия гибридных красителей **201-206** (Схема 75), состоящих из флуоресцеина и тетраметилпродамина, связанных через олигометиленовый спейсер, интенсивность испускания которых увеличивается при связывании с флуоресцеин рекомбинантным моноклональным антителом. Такое изменение эмиссии красителя при связывании с антителом представляет собой значительное отклонение от общепринятого понимания того, что антитела, специфичные к флуоресцеину, тушат флуоресценцию красителя при связывании. В данной работе авторы показали, что связывание бисхромофорной молекулы с флуоресцеин рекомбинантным моноклональным антителом может на самом деле увеличивать интенсивность эмиссии, что приводит к прямому соотношению флуоресцентного отклика с молекулярным распознаванием.

Увеличение интенсивности эмиссии, по предположению авторов, происходит из-за диссоциации внутримолекулярных димеров, которые тушат флуоресценцию родаминового хромофора. Бисхромофорные красители могут проявлять очень низкую флуоресценцию в растворе по причинам внутримолекулярной димеризации и стэкинга. Однако при связывании с антителом равновесие между линейной и сэндвич-формой красителя смещается в сторону линейной, которая демонстрирует большую интенсивность флуоресценции. Однако при связывании с антителом флуоресценция флуоресцеинового хромофора все равно остается низкой, что объясняется внутримолекулярным резонансным переносом энергии между хромофорами (FRET).

Кроме образования внутримолекулярных димеров в бисхромофорной системе красителей **201-206** реализуется резонансный перенос энергии между флуоресцеином и тетраметилпродаминоном. Энергия возбужденного состояния флуоресцеина безызлучательно передается тетраметилпродаминовому хромофору, который в свою очередь испускает свой собственный флуоресцентный сигнал. В результате, такие бисхромофоры обладают большим Стоксовым сдвигом, флуоресцентный отклик которых зависит от связывания с антителами.

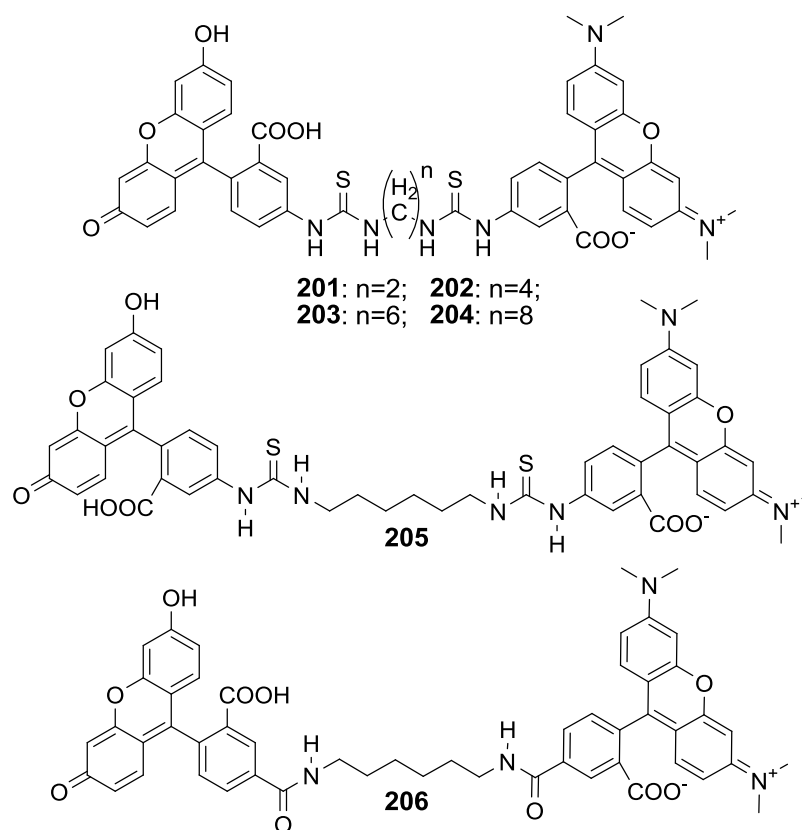


Схема 75

Заключение

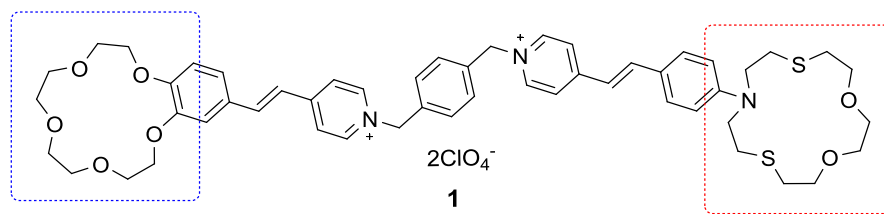
Как следует из литературного обзора, представленные в литературе низкомолекулярные флуорофоры для биологических исследований принадлежат к различным классам красителей и отличаются широким разнообразием спектральных и фотохимических свойств. Описанные в данном обзоре органические флуоресцентные метки и зонды включают соединения с флуоресценцией различной эффективности в диапазоне электромагнитного спектра от ультрафиолетового до ближнего инфракрасного. Как правило, из имеющегося набора флуорофоров для анализа биологических систем удастся выбрать флуорофоры с нужными спектральными характеристиками. Тем не менее, все еще существуют проблемы и задачи более глубокого изучения и понимания различных биохимических и биомеханических процессов, решение которых возможно с использованием более сложных гибридных молекул красителей. В настоящее время в литературе представлено не очень большое количество примеров получения и исследований таких красителей. Поэтому разработка и применение новых гибридных бисхромофорных красителей в биологии и медицине является актуальной научной проблемой.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ¹

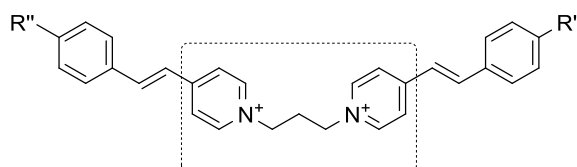
При подготовке данного раздела использованы собственные публикации автора [155–158].

Как следует из анализа литературных данных, стирильные красители являются одним из классов красителей, которые активно исследуются в качестве флуоресцентных маркеров для биоимиджинга. Благодаря их оптическим свойствам, более высокой фотостабильности по сравнению с классическими цианиновыми красителями и относительной легкости получения, данные соединения являются перспективным классом для разработки реагентов для флуоресцентного мечения в биологии и медицине. В ходе работы была синтезирована и исследована серия гомо- и гетеро-димерных бисстирилпиридиниевых красителей, содержащих в фенильном ядре алкокси- и диалкиламино- группы. Исходя из структурных особенностей, объекты исследования были разделены на четыре группы:

1. Бисстириловый краситель, содержащий два краун-эфирных фрагмента с различным сочетанием гетероатомов (1).



2. Бисстириловые красители симметричного (2, 3) и несимметричного строения (4), хромофоры которых соединены между собой алифатическим линкером через гетероциклические фрагменты (тип «голова к голове»).

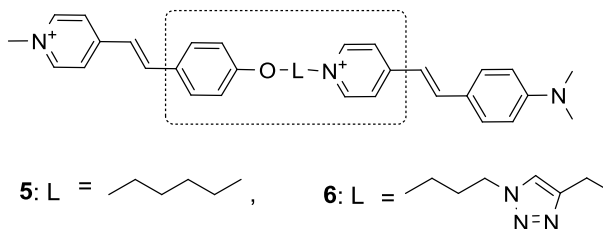


2: R' = R'' = OMe

3: R' = R'' = NMe₂

4: R' = OMe, R'' = NMe₂

3. Бисстириловые красители несимметричного строения, хромофоры которых соединены между собой алифатическим (5) и триазолсодержащим линкером (6) через гетероциклический и О-фенильный фрагмент (тип «голова к хвосту»).



¹ Нумерация соединений и схем отличается от нумерации в Литературном обзоре

На первой стадии осуществлялся синтез двух незаряженных стироловых красителей, содержащих различные краун-эфирные фрагменты **10** и **11**. Для получения азадитиакраун-содержащего бензальдегида проводилась макроциклизация между 4-(бис(2-хлорэтил)амино)бензальдегидом и 2,2'-(этилендиокси)диэтантолом в сильно разбавленном растворе в присутствии карбоната цезия в качестве основания. Реакцию конденсации полученного бензальдегида **9** с 4-пиколином далее проводили в условиях кислотно-основного катализа, поскольку проведение данной реакции в условиях кислотного (в среде уксусного ангидрида) или основного (в присутствии органического или неорганического основания) катализа не приводило к получению продукта. Для получения кислородсодержащего стирилпиридина **11** аналогично проводили реакцию конденсации между соответствующим бензальдегидом и 4-пиколином, но в присутствии *t*-BuOK в качестве основания. Следующим этапом была реакция кватернизации моностирилового красителя **10** *n*-бисбромметилбензолом. Заключительной стадией была кватернизация соединения **11** полученным полупродуктом **12**. Конечный бисстириловый краситель был переведен в перхлорат **1**.

Синтез бисстириловых красителей типа «голова к голове»

Для синтеза гомодимерных бисстириловых красителей, хромофорные фрагменты которых связаны между собой через гетероциклические фрагменты, была предложена схема синтеза, где на первом этапе получали незаряженный моностириловый краситель и далее его вводили в реакцию кватернизации с недостатком 1,3-дибромпропана.

Моностириловый краситель **13** (Схема 2) получали с помощью реакции конденсации 4-*n*-метоксибензальдегида и 4-пиколина в присутствии *t*-BuOK в сухом ДМФА. Далее путем реакции алкилирования соединения **13** с 1,3-дибромпропаном в соотношении 2:1 получали бисстириловый краситель **2**. В ходе реакции в качестве побочного продукта также образовывался продукт монокватернизации. Выделение продуктов реакции проводили с помощью колоночной хроматографии.

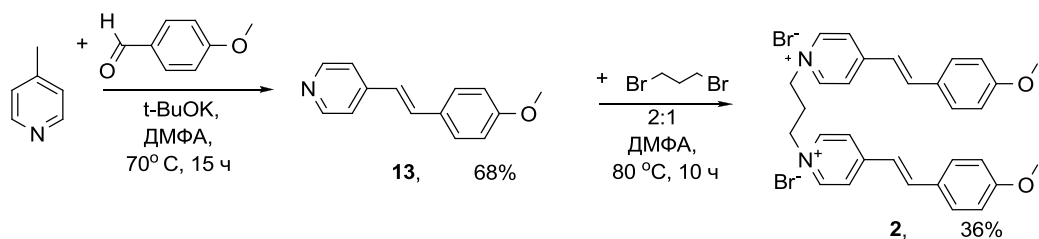


Схема 2

Получение 4-*n*-диметиламиностирилпиридина (Схема 3) проводили путем спекания соответствующего бензальдегида и 4-пиколина в присутствии KOH. Далее, аналогично ранее

описанной схеме, проводилась реакция алкилирования полученного полупродукта **14** с 1,3-дибромпропаном.

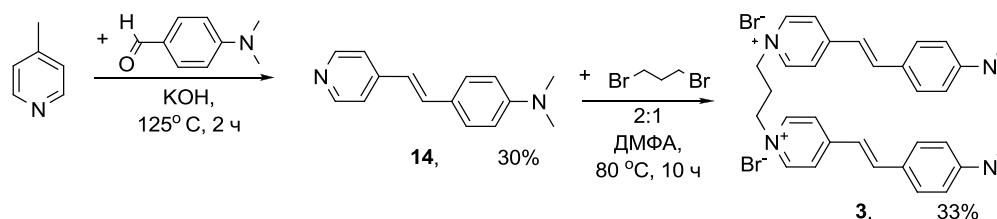


Схема 3

Для синтеза гетеродимерного красителя **4** было предложено несколько путей синтеза. По первому методу (Схема 4) вначале проводили кватернизацию 4-*n*-метоксистирилпиридиниевого красителя с 1,3-дибромпропаном. Для получения преимущественно продукта монокватернизации реакцию проводили при 10-кратном избытке дибромида. Далее полупродуктом **15** кватернизовали 4-пиколин, а на заключительной стадии проводили конденсацию с 4-диметиламинобензальдегидом. В ходе реакции по ТСХ наблюдали появление продукта конденсации, однако его выделение в чистом виде осложнялось тем, что исходное соединение **16** и конечный бисстириловый краситель **4** являются солями с двухзарядными катионами, и разделение такой смеси с помощью колоночной хроматографии не представляется возможным.

Метод 1

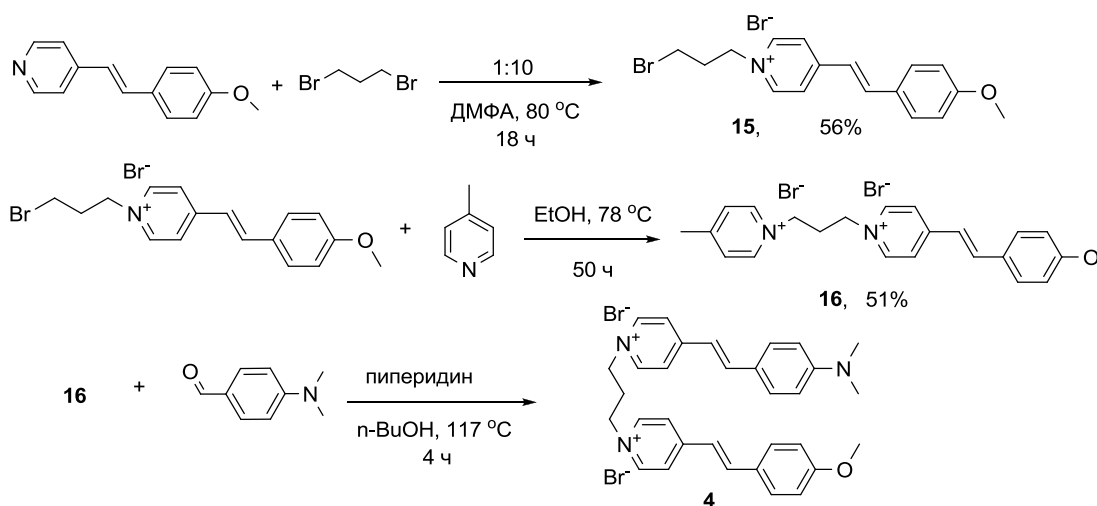


Схема 4

Поэтому был предложен альтернативный путь синтеза (метод 2, Схема 5), где на первом этапе проводили монокватернизацию стирилового красителя **14** с избытком 1,3-дибромпропана, и далее полученным полупродуктом **17** кватернизовали 4-*n*-метоксистирилпиридин. Были опробованы различные условия синтеза, но целевой продукт был получен только при добавлении йодида калия. Увеличение скорости протекания реакции в присутствии йодида

калия может объясняться тем, что в ходе реакции бром замещается на йод, а поскольку йод является лучшей уходящей группой, реакция алкилирования с таким производным протекает быстрее. С помощью элементного анализа было подтверждено содержание йода, которое соответствует расчётному значению, а также следовые количества брома, что говорит о наличии йода в молекуле в качестве противоиона.

Метод 2

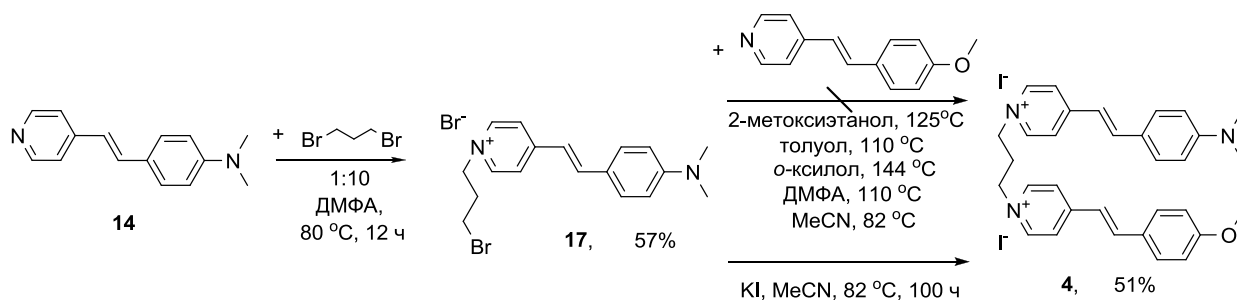


Схема 5

Полученные бисстириловые красители **2**, **3**, **4** были очищены методом колоночной хроматографии и выделены в виде Е-изомеров, что было подтверждено величинами констант спин-спинового взаимодействия протонов С=С связи стириловых фрагментов, находящимся в интервале $J_{trans} \sim 15.6 - 16.2$ Гц. В случае несимметричного бисстирилового красителя **4** в спектре ¹Н ЯМР можно увидеть набор сигналов от двух независимых стириловых фрагментов (Рисунок 1).

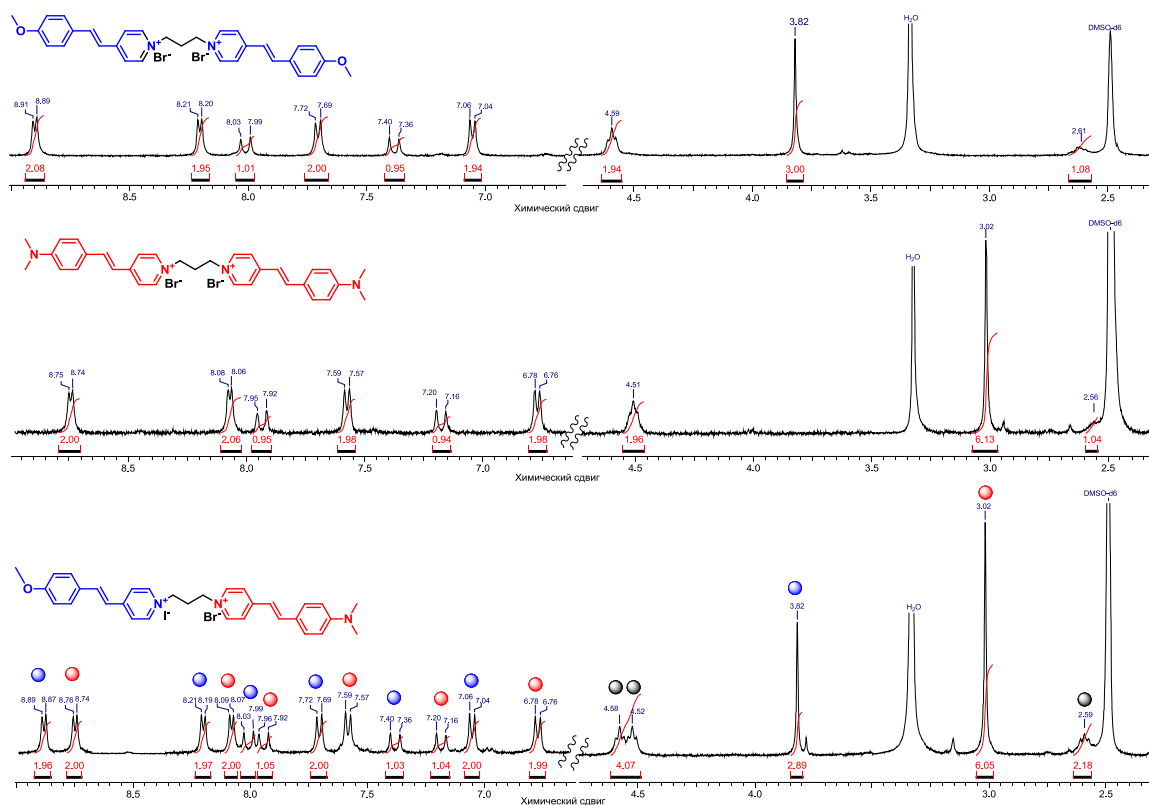


Рисунок 1. ¹Н ЯМР-спектры бисстириловых красителей **2**, **3**, **4** в ДМСО-*d*₆.

Синтез бисстириловых красителей типа «голова к хвосту»

Для получения гетеродимерного бисстирилового красителя, хромофорные фрагменты которого были соединены через гетероциклический и О-фенильный фрагмент алифатическим линкером, была предложена схема синтеза (метод 1, Схема 6), где на последней стадии проводилась реакция О-алкилирования. На первом этапе получали заряженный 4-гидроксистирилпиридиниевый краситель **18**. Поскольку реакция проводилась между 4-гидроксibenзальдегидом и тозилатом 1,4-диметилпиридиния, были подобраны более мягкие условия конденсации. Алкильные группы четвертичных пиридиниевых солей во 2 и 4 положениях легко депротонируются, при этом образуется резонансно-стабилизированный карбанион, легко вступающий в реакции нуклеофильного присоединения. Поэтому для отрыва протона у CH_3 -группы 4-пиколина использовали пиперидин, в качестве растворителя – этанол. Далее полученный моностирил **18** вводили в реакцию алкилирования с моностирилом **17**. По ТСХ-контролю детектировали получение целевого продукта. Несомненным плюсом данной методики является проведение реакции при комнатной температуре, что уменьшает вероятность осмоления и полимеризации. Но выделить продукт в чистом виде (выделению мешало наличие в реакционной массе карбоната калия) и охарактеризовать не удалось, поскольку он обладает плохой растворимостью.

Метод 1

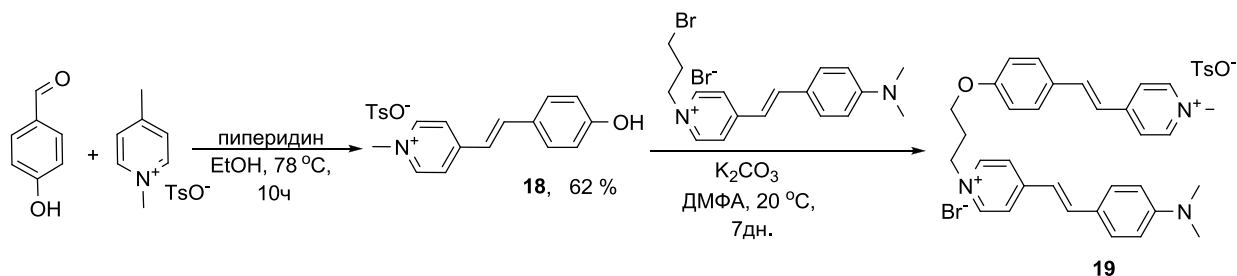


Схема 6

Была предложена альтернативная схема синтеза (метод 2, Схема 7) аналогичная получению несимметричного красителя **4**. На первой стадии проводилась реакция алкилирования 4-гидроксibenзальдегида и 1,4-дибромбутана. Поскольку исходные реагенты брались в соотношении 1:2, в ходе реакции получались продукты моно- и бис-алкилирования, которые далее разделяли колоночной хроматографией. Затем полученный бензальдегид **20** вводили в реакцию конденсации с йодидом 1,4-диметилпиридиния в присутствии пиперидина в этаноле. Как и в схеме 5 заключительной стадией была реакция кватернизации 4-*n*-диметиламинострилипиридина и полупродукта **21** в присутствии йодида калия. В результате

реакции был получен гетеродимерный краситель **5**, где по элементному анализу был подтвержден Γ в качестве противоиона.

Метод 2

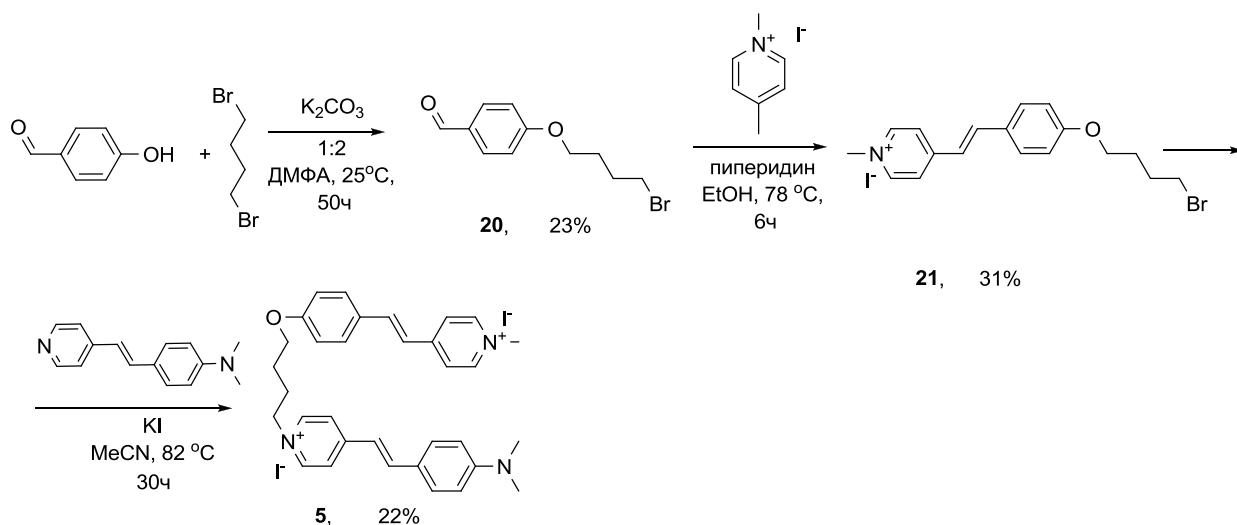


Схема 7

Объединение хромофоров в структуре бисстирилового красителя через гетероциклический и О-фенильный фрагмент было осуществлено с использованием клик-реакции с образованием триазольного фрагмента в качестве линкера. Триазолы могут легко ассоциироваться с биологическими мишенями за счет водородных связей и дипольных взаимодействий, что могло бы улучшить эффективность связывания такого красителя с биомолекулой ДНК и РНК. Для синтеза такой структуры на первом этапе синтезировали моностириловые красители, содержащие азидную (**24**) и пропаргильную (**26**) группы (Схема 8). При получении азидсодержащего моностирилового красителя на первой стадии проводили реакцию кватернизации 4-пиколина с 1,3-дибромпропаном, где для получения моно-продукта использовался пятикратный избыток дибромида. Далее с использованием азидата натрия проводили замену брома. Реакция конденсации 4-диметиламинобензальдегида и полупродукта **23** приводила к получению моностирилового красителя, содержащего азидную-группу (**24**). Для получения ацетилен-содержащего моностирилового красителя на первом этапе проводилась реакция алкилирования 4-гидроксибензальдегида и бромпропаргила. Далее реакция конденсации приводила к получению моностирилового красителя, содержащего ацетиленовую группу (**26**). Заключительной стадией получения бисстирилового красителя являлась клик-реакция, которая проводилась в присутствии основания DIPEA и каталитических количеств CuI , что не приводило к замещению противоиона Br^- на Γ в структуре красителя **6**.

этапе путем реакции алкилирования собирали спейсер, затем с помощью реакции конденсации получали бисхромофорный краситель.

При получении красителя **7** на первой стадии проводилась реакция алкилирования между 1,3-дибромпропаном и 4-гидроксибензальдегидом (Схема 9), условия реакции были аналогичны тем, что использовались при синтезе соединения **20** в схеме 7. Для увеличения доли выхода продукта моноалкилирования использовали 1.5-кратный избыток дибромида. Далее полупродукт **27** вводили в реакцию кватернизации с N^1,N^1,N^3,N^3 -тетраметилпропан-1,3-диамином, синтез проводили при длительном кипячении в толуоле. Затем полученное бискарбальдегидное производное **28** использовали в реакции конденсации с йодидом 1,4-диметилпиридиния с использованием пиперидина в качестве основания. В качестве растворителя для реакции были испробованы этанол и ДМФА, но конечный продукт **7** был получен при проведении конденсации в 2-этоксиэтаноле. По-видимому, более эффективному протеканию реакции в 2-этоксиэтаноле способствуют высокая температура кипения и хорошая растворимость исходных реагентов.

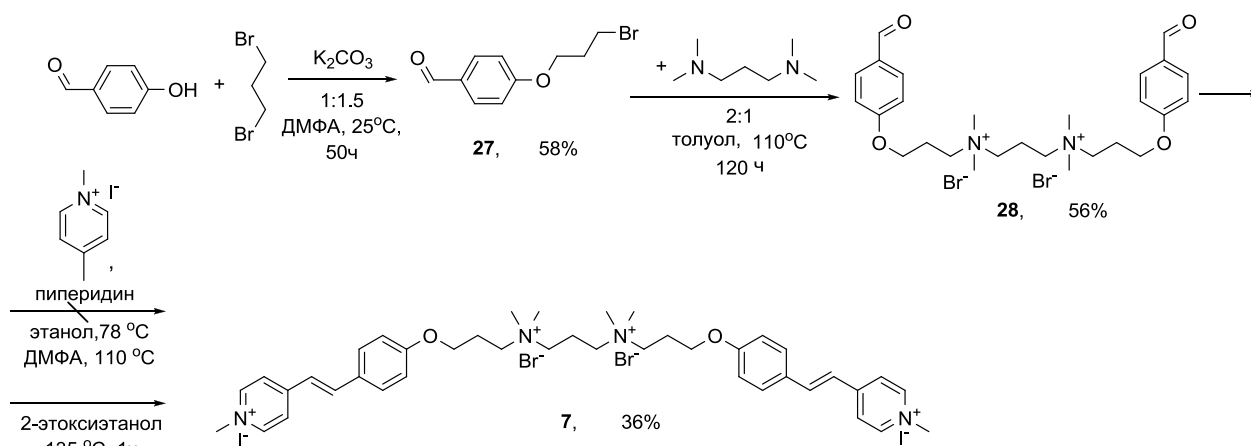


Схема 9

Для синтеза бисстирилового красителя **8** использовали ранее полученный 4-(4-бромобутокс)бензальдегид (**20**), его вводили в реакцию кватернизации с 1,4-диазабицикло[2.2.2]октаном (Схема 10). Синтез проводили при длительном кипячении в толуоле. Для заключительной стадии конденсации были использованы ранее подобранные условия с использованием в качестве растворителя 2-этоксиэтанола.

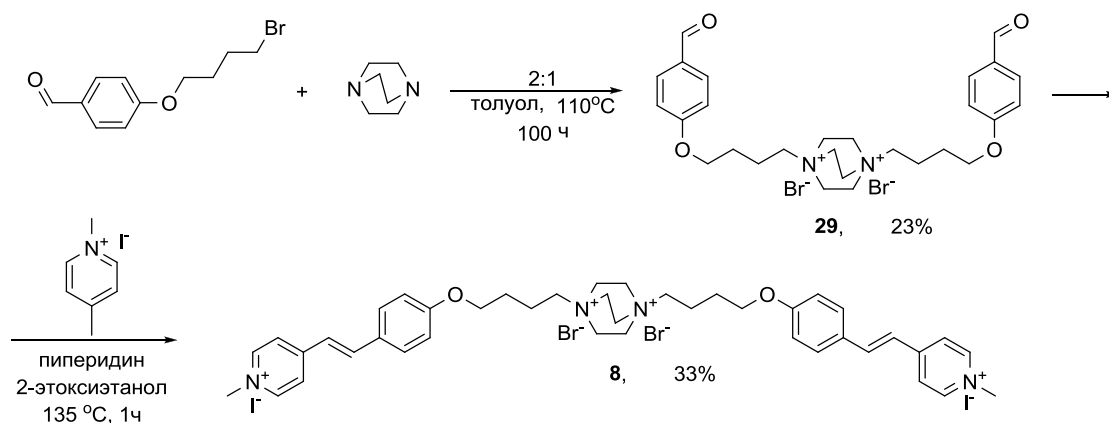


Схема 10

Таким образом, были разработаны синтезы моностириловых производных, содержащих различные функциональные группы, и проанализированы пути синтеза на их основе бисстириловых красителей. По итогу получены бисстириловый краситель **1**, содержащий два различных краун-эфирных фрагмента, два гомодимерных бисстириловых красителя **2**, **3**; предложены и оптимизированы методы получения неописанных ранее гетеродимерных красителей **4**, **5**, **6** и гомодимерных красителя **7**, **8**. Структуры всех полученных соединений были доказаны с помощью методов ЯМР-спектроскопии, ИЭР-масс-спектрометрии и элементного анализа.

3.2. Оптические свойства бисстириловых красителей

В исследуемых нами структурах бисстириловых красителей присутствуют две различные хромофорные системы, где в качестве акцептора выступает 1-метил-пиридиниевый фрагмент, а в качестве донора - метокси- (**m₁**) и диметиламино- (**m₂**) фрагменты в *para*-положении фенильной группы. Спектр поглощения моностириловых красителей в воде характеризуется длинноволновой полосой поглощения (ДПП), соответствующей внутримолекулярному процессу переноса заряда с электронодонорной метокси- или диметиламино-группы на метилпиридиниевый фрагмент (Рисунок 3, Таблица 1). Максимум полосы поглощения красителя **m₁** при 370 нм расположен в более коротковолновой области относительно красителя **m₂** с максимумом при 445 нм, что объясняется различием в донорности фрагментов. Красители имеют большой Стоксов сдвиг (более 100 нм), максимумы эмиссии находятся в области 500 нм (краситель **m₁**) и 620 нм (краситель **m₂**). Невысокие значения квантовых выходов флуоресценции (1.2% - для красителя **m₁**, 0.26% - для красителя **m₂**) могут быть объяснены фотоиндуцированными безызлучательными процессами релаксации: *E-Z*-изомеризацией и образованием ТИСТ-состояний, которые подавляют флуоресценцию красителей.

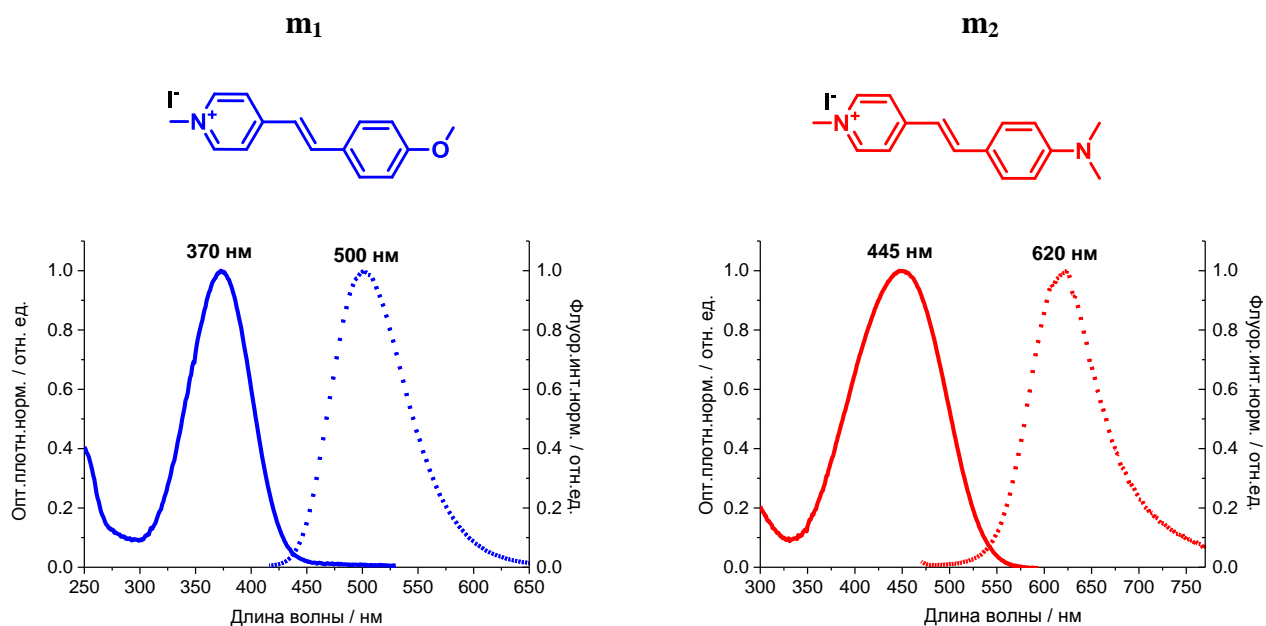


Рисунок 3. Нормализованные спектры поглощения и флуоресценции моностириловых красителей m_1 , m_2 в натрий-фосфатном буфере.

Таблица 1. Основные характеристики спектров поглощения и эмиссии соединений m_1 , m_2 , **1-6** в натрий-фосфатном буфере (кроме **1*** – в MeCN).

Соединение	$\lambda_{\text{погл. макс.}}$, нм	$\lambda_{\text{фл. макс.}}$, нм	ϵ_{λ} , $M^{-1} \cdot cm^{-1}$	$\phi^{фл.}$, %	Стоксов сдвиг, cm^{-1}
m_1	372	500	26960	1.2	6882
m_2	450	620	28800	0.26	6093
1*	415, 486	618	31800, 29600	1.9	4395
1	402, 469	603	32700, 22950	1.5	4738
2	380	510, 694	47435	0.47	6708
3	468	627	58235	0.05	5419
4	401, 503	500, 623	35850, 20650	0.04	4938, 3829
5	380, 471	502, 610	49715, 19440	0.12	6396, 4838
6	380, 482	508, 617	40940, 24640	0.08	6631, 4539

Для симметричных бисстириловых красителей **2**, **3** максимумы ДПП батохромно сдвинуты (~8-18 нм) по сравнению с максимумами соответствующих моностириловых красителей m_1 , m_2 (Рисунок 4, Таблица 1), что может быть объяснено повышенной поляризацией хромофоров и,

следовательно, более выраженным ICT-взаимодействием, обусловленным близостью двух положительных зарядов в структуре.[160] Поскольку гомодимерные красители **2**, **3** содержат в структуре два одинаковых хромофора, их значения коэффициентов экстинкции примерно в 2 раза выше аналогичных значений для красителей **m₁**, **m₂**. Максимумы эмиссии бисстириловых красителей **2**, **3** также оказались батохромно сдвинуты (~7-10 нм) относительно максимумов флуоресценции моностириловых красителей, а значения квантовых выходов флуоресценции оказались ниже. В спектре испускания метокси-бисстирилового красителя **2** помимо коротковолновой полосы при 510 нм присутствует широкая полоса с максимумом 694 нм, которая соответствует флуоресценции эксимера данного соединения. Эксимеры – это димеры в возбужденном состоянии, которые образуются в результате взаимодействия возбужденной и такой же невозбужденной молекул. Полоса флуоресценции эксимера обычно смещена в длинноволновую область, что мы и наблюдаем на спектре флуоресценции красителя **2**. Стоит отметить, что при различных концентрациях красителя в буферном растворе отношение интенсивностей в максимумах длинноволновой и коротковолновой полосы испускания не изменялось, следовательно, краситель **2** может образовывать внутримолекулярные эксимеры сэндвич-типа. Также возможным объяснением отличий оптических характеристик бисстириловых красителей **2**, **3** по сравнению с красителями **m₁**, **m₂** в буферном растворе может быть агрегация хромофорных фрагментов между собой.

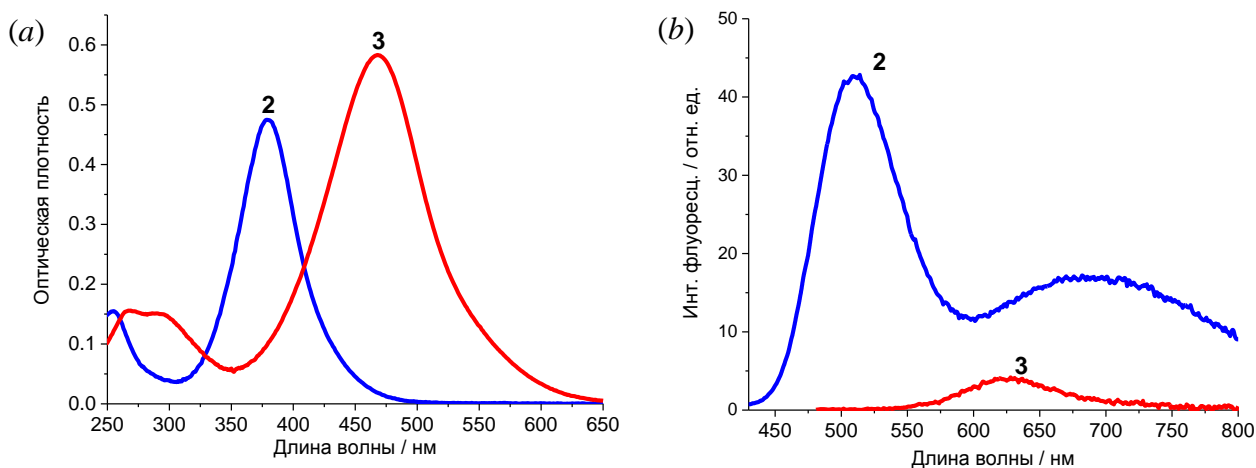


Рисунок 4. Спектры поглощения (a) и флуоресценции (b) бисстириловых красителей **2**, **3** в натрий-фосфатном буфере ($C = 10 \mu\text{M}$), $\lambda_{\text{возб}}^2 = 360 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{возб}}^3 = 470 \text{ нм}$.

На спектрах поглощения гетеродимерных бисстириловых красителей **4**, **5**, **6** наблюдаются две полосы с максимумами в области 390 и 500 нм (Рисунок 5, Таблица 1), что соответствует наличию двух различных хромофоров в структуре красителей. Однако максимумы ДПП бисстириловых красителей батохромно сдвинуты по сравнению с моностириловыми, причем наиболее сильные сдвиги наблюдаются у красителя **4**. Можно проследить следующую

зависимость: чем короче линкер и чем ближе расстояние между хромофорами, тем больше разница в максимумах N- и O-хромофоров бисстирила по сравнению с соответствующими моностириловыми красителями. Также сильно отличаются коэффициенты экстинкции монохромофоров в структуре бисстирила, это объясняется тем, что более широкая полоса поглощения диметиламино-хромофора накладывается на полосу метокси-хромофора. Несмотря на схожесть структуры красителей **4-6** их спектры испускания заметно различались (Рисунок 5b). Во всех трех случаях красители облучались светом короткой длины волны (~380-400 нм), при этом в случае красителей **4, 6** наблюдалась двухполосная флуоресценция с максимумами при 500 и 617 нм, а для красителя **5** спектр представлял собой полосу при 500 нм с плечом при 610 нм. При облучении красителей светом длиной волны ~480 нм спектр флуоресценции характеризовался однополосным сигналом при 620 нм. Квантовые выходы флуоресценции красителей **4, 5, 6** достаточно низки и лежат в диапазоне 0.04 - 0.12 %. Полученные спектры испускания несимметричных красителей при облучении светом короткой длины волны (~380-400 нм) свидетельствуют о возможности протекания процесса фотоиндуцированного внутримолекулярного переноса энергии между хромофорами красителя.

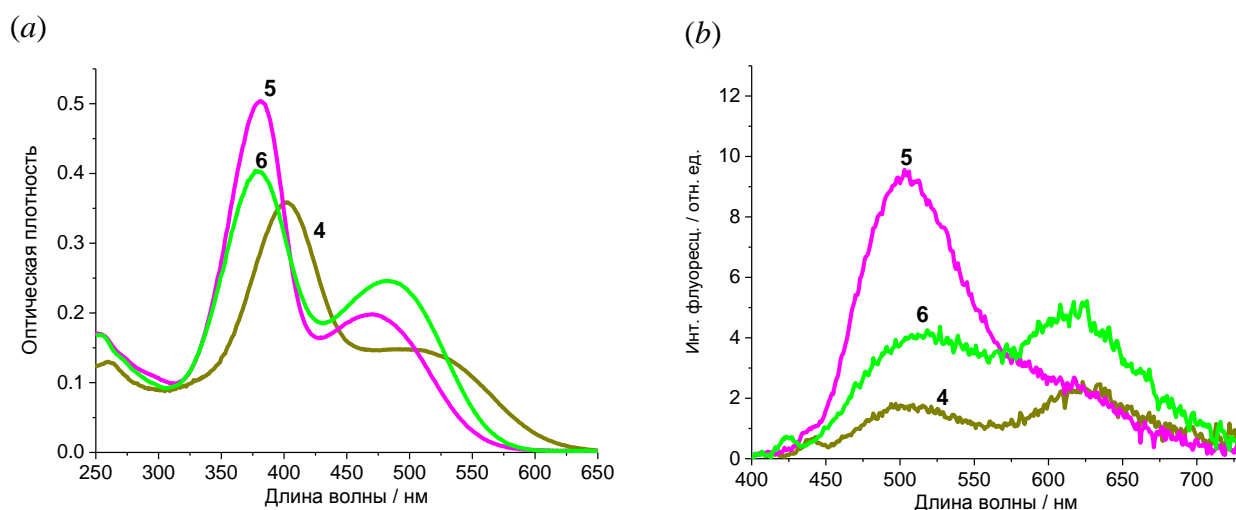
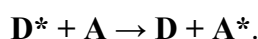


Рисунок 5. Спектры поглощения (a) и флуоресценции (b) бисстириловых красителей **4, 5, 6** в натрий-фосфатном буфере ($C = 10 \mu\text{M}$), $\lambda_{\text{возб}}^4 = \lambda_{\text{возб}}^5 = 380 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{возб}}^6 = 370 \text{ нм}$.

3.3. Фотоиндуцированный безызлучательный перенос энергии в несимметричных бисстириловых красителях **1, 4, 5, 6**

Явление переноса энергии заключается в том, что молекула донора D^* переходит из возбужденного состояния в основное, передавая свою энергию молекуле акцептора A , которая при этом переходит в возбужденное состояние:



Теоретическое обоснование механизма молекулярного резонансного переноса энергии сформулировал Теодор Фёрстер в 1946 году (FRET – Förster Resonance Energy Transfer). FRET – это процесс, при котором энергия возбуждения донорного хромофора посредством кулоновского взаимодействия безызлучательно переносится в результате диполь-дипольного взаимодействия на ближайшую акцепторную молекулу. При этом возбужденный электрон донора энергии возвращается в основное состояние одновременно с промотированием электрона акцептора энергии из основного в возбужденное состояние (Схема 11).

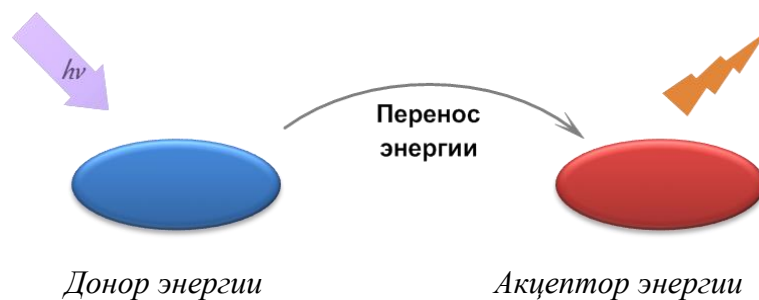


Схема 11

Для эффективности FRET необходимо выполнение следующих факторов:

- 1) необходимо перекрытие спектра флуоресценции донора энергии и спектра поглощения акцептора энергии;
- 2) расстояние между донором и акцептором должно находиться в диапазоне приблизительно 10-100 Å;
- 3) необходимо взаимное соответствие электронно-колебательных уровней донора и акцептора.

Вместе с тем, очень важную роль играет взаимная ориентация диполей донора и акцептора, и при неблагоприятной пространственной ориентации взаимодействующих хромофоров перенос энергии не может быть реализован, даже при соблюдении остальных условий.

В исследуемых нами несимметричных красителях **1, 4, 5, 6** донором энергии электронного возбуждения является хромофор, содержащий алкокси-фрагмент (О-хромофор), максимум ДПП которого располагается в области 390 нм. В качестве акцептора энергии выступает диалкиламино-моностириловый фрагмент (N-хромофор), максимум ДПП которого находится в области 480 нм. Как показано на рисунке 6, условие перекрытия спектра флуоресценции донора энергии (О-хромофор) со спектром поглощения акцептора энергии (N-хромофор) выполняется, что обеспечивает возможность протекания резонансного переноса энергии (FRET) в рассматриваемых бисхромофорных системах.

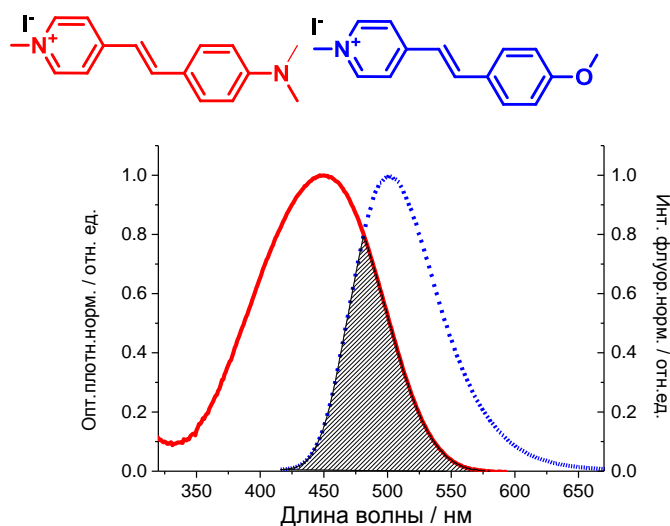


Рисунок 6. Перекрывание спектра флуоресценции красителя **m₁** и спектра поглощения красителя **m₂**.

Расстояние между хромофорами (r) было найдено из оптимизированной геометрии основного состояния каждого из бисстириловых красителей **1**, **4**, **5**, **6**, значения которых лежат в диапазоне 12.3 – 18.8 Å (Таблица 2) и соответствуют диапазону расстояний для выполнения FRET-процесса. Трёхмерная структура красителей была построена с помощью пакета программ MORAC 2016 с использованием полуэмпирического метода PM7 [161].

Таблица 2. Расчётное расстояние между хромофорами в структурах бисстириловых красителей **1**, **4**, **5**, **6**.

Соединение	1	4	5	6
Расчётное r / Å	15.3	12.3	15.6	18.8

Также для оценки возможности протекания переноса энергии было проведено электрохимическое исследование². Окислительно-восстановительные потенциалы моностириловых красителей **m₁** и **m₂** исследовали методом циклической вольтамперометрии в MeCN, содержащем гексафторфосфат тетрабутиламмония в качестве фонового электролита на Pt-электроде. Анализ полученных вольтамперограмм позволил рассчитать значения уровней энергии ВЗМО (высшая занятая молекулярная орбиталь) – НСМО (низшая свободная молекулярная орбиталь) хромофоров, взаимное расположение которых изображено на рисунке 7.

² Экспериментальные данные электрохимических исследований получены в ИНЭОС им. А.Н. Несмеянова РАН к.х.н. н.с. Токаревым С.Д.

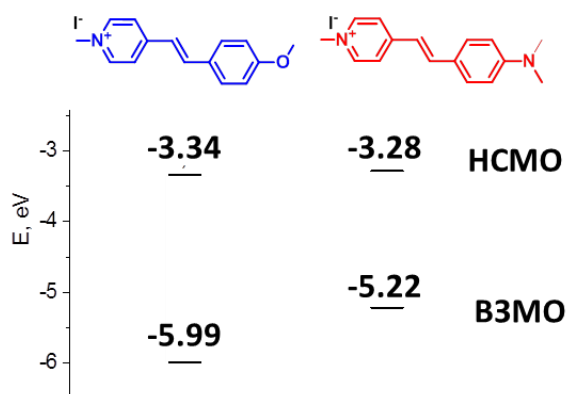


Рисунок 7. Взаимное расположение ВЗМО-НСМО красителей m_1 и m_2 , полученное из электрохимических данных.

Как показано на рисунке 7, НСМО О-хромофора и N-хромофора близки по энергии. Они расположены на положительно заряженных пиридиновых фрагментах. ВЗМО обоих хромофоров локализованы на донорных алкокси- и диалкиламино-фрагментах. Энергетическая щель ВЗМО-НСМО у красителя m_2 меньше, чем у m_1 , поэтому протекание переноса энергии от О-хромофора к N-хромофору в системе, содержащей два таких моностириловых фрагмента возможно.

Для фотоиндуцированного переноса энергии характерно полное или частичное тушение флуоресценции хромофора-донора, что мы использовали для расчёта эффективности протекания данного процесса. Эквимолярная смесь соответствующих моностириловых красителей m_1 и m_2 демонстрирует две полосы поглощения при 382 и 452 нм, принадлежащих ОМе- и NMe₂-хромофорам (Рисунок 8а). При возбуждении эквимолярной смеси m_1 и m_2 светом 380 нм, который в основном поглощается О-хромофором m_1 , наблюдается полоса испускания при 505 нм, аналогичная таковой в спектре моностирила m_1 . Спектр поглощения бисстирилового красителя **6** содержит полосы с максимумами 382 нм и 495 нм (Рисунок 8а). В спектре флуоресценции красителя **6** наблюдается две полосы примерно равной интенсивности с максимумами при 505 и 627 нм (Рисунок 8б). Этот результат указывает на протекание переноса энергии в бисхромофорной системе от донорного О-хромофора к акцепторному N-хромофору. Используя интенсивности излучения бисхромофора **6** и эквимолярной смеси m_1 и m_2 при 500 нм, где акцепторный хромофор не флуоресцирует, эффективность переноса энергии была рассчитана согласно уравнению (1) [162] и составила 93%

$$\Phi_{\text{RET}} = 1 - \frac{I}{I_0} = 93\% \quad (1)$$

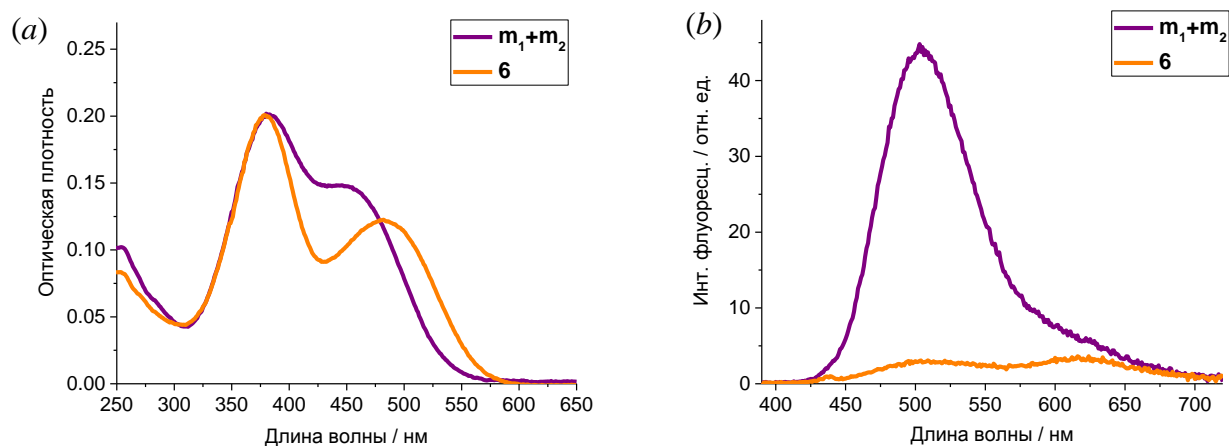


Рисунок 8. Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) бисстирилового красителя **6** и эквимольной смеси моностириловых красителей m_1 и m_2 в натрий-фосфатном буфере при ($C_6 = C_{m1} = C_{m2} = 20 \mu\text{M}$), $\lambda_{\text{возб}}^{m1+m2} = \lambda_{\text{возб}}^6 = 380 \text{ нм}$.

Аналогично были рассчитаны значения эффективности переноса энергии для красителей **1**, **4**, **5** (Таблица 3), значения которых превышали 80%.

Таблица 3. Значения эффективности FRET-процесса в бисстириловых красителях **1**, **4**, **5**, **6**.

Соединение	1 *	4	5	6
Эффективность FRET, %	84	97	81	93

* - для красителя **1** приводится эффективность переноса энергии в воде, где в качестве эквимольной смеси использовалась смесь соответствующих краун-содержащих моностириловых красителей.

3.4. Комплексообразование краун-содержащего бисстирилового красителя **1** с катионами металлов в MeCN

Ранее в нашей лаборатории с помощью спектрофотометрического титрования было изучено комплексообразование бисстирилового красителя **1** с катионами Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , H^+ , Hg^{2+} , Ag^+ . Выбор анализируемых ионов металлов проводился на основе предыдущего изучения сотрудниками нашей лаборатории комплексообразования различных хромофоров, содержащих аналогичные краун-эфирные фрагменты [159,163–165]. В данной работе с помощью методов спектроскопии и флуориметрии исследовалось влияние комплексообразования на процесс фотоиндуцированного переноса энергии в красителе **1**.

Активными центрами связывания бисстирилового красителя такой структуры являются краун-эфирные фрагменты. Комплексообразование с ионами металлов приводит к гипсохромным сдвигам как спектров поглощения, так и флуоресценции соответствующей

хромофорной части связывающего лиганда. Это происходит за счет взаимодействия катиона с неподеленной электронной парой атомов кислорода или азота краун-эфирного фрагмента, входящей в хромофорную систему молекулы красителя. Величина гипсохромных сдвигов зависит от природы иона металла.

На рисунке 9 показан спектр поглощения красителя **1** в ацетонитриле при титровании перхлоратом бария. При добавлении $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ наблюдается большой гипсохромный сдвиг полосы при 415 нм, соответствующей поглощению хромофора с кислородным краун-эфиром. Полоса поглощения при 415 нм испытывает аналогичные изменения при добавлении солей Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} (Таблица 4). В случае катионов Ba^{2+} возможно образование как комплексов 1:1, так и сэндвичевых комплексов с двумя лигандами, содержащими фрагмент бензо-15-краун-5-эфира, состава 2:1. Положение полосы поглощения азадитиакраун-эфира при этом остается неизменным.

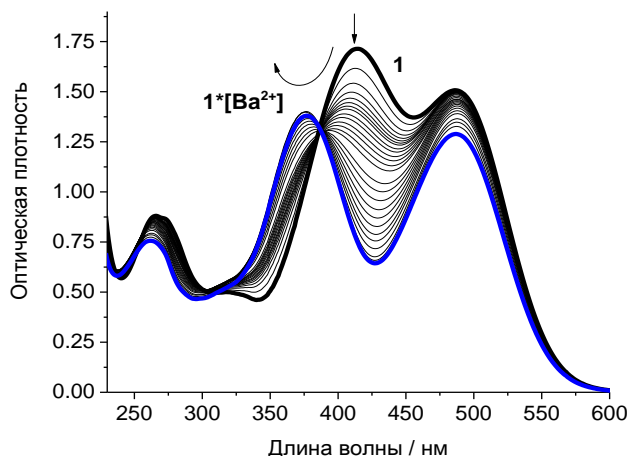


Рисунок 9. Спектрофотометрическое титрование бисстирилового красителя **1** солью $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($C_1 = 50 \mu\text{M}$, $C_{\text{Ba}^{2+}}/C_1 = 0-193$) в MeCN .

Так как азадитиакраун-эфиры образуют стабильные комплексы с катионами переходных металлов, нами было проведено исследование комплексобразования красителя **1** с Hg^{2+} , Ag^+ и H^+ , которые избирательно связываются с этим макроциклом [165]. Добавление данных ионов приводит к гипсохромному сдвигу полосы поглощения хромофора, сопряженного с азадитиакраун-эфиром (Таблица 4, Рисунок 10).

Оптические свойства и константы устойчивости комплексов бисстирилового красителя с катионами были рассчитаны с использованием данных прямого спектрофотометрического титрования с помощью программы SpecFit-32 [166,167] (Таблица 4). Для Ca^{2+} и Mg^{2+} значение $\lg K$ составили 4.07 ± 0.01 и 3.92 ± 0.01 , для комплекса с Hg^{2+} $\lg K$ оказался больше 7, что находится за пределами возможностей определения значения констант данным методом.

Таблица 4. Оптические свойства и константы устойчивости комплексов бисстирилового красителя с катионами $1 \cdot M^{n+}$ в MeCN.

Соединение	$\lambda_{\text{макс}}^{\text{погл}}$, нм	$\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}}$, нм	$\varphi^{\text{фл}}$, %	lgK
1	415, 487	620, 565	1.9	-
1 ·Mg ²⁺	367, 487	623	1.6	3.92 ± 0.01
1 ·Ca ²⁺	368, 487	623	1.6	4.07 ± 0.01
1 ·Na ⁺	389, 487	623, 532	2.0	3.01 ± 0.02
1 ·Li ⁺	391, 487	623, 532	1.9	3.46 ± 0.02
1 ·Ba ²⁺ (1:1)	378, 487	623, 526	1.7	4.2 ± 0.16
1 ·Ba ²⁺ (2:1)	490, 413, 373	-	-	8.7 ± 0.25
(1 ·Hg ²⁺)·Mg ²⁺	364	584	-	4.26 ± 0.02
(1 ·Hg ²⁺)·Na ⁺	377	578	-	3.03 ± 0.02
1 ·Ag ⁺	412, 443	605	5.4	2.77 ± 0.01
1 ·Hg ²⁺	399, 369	575	4.3	>7 ^[159]
1 ·H ⁺	394, 341	559	3.0	5 ± 0.1

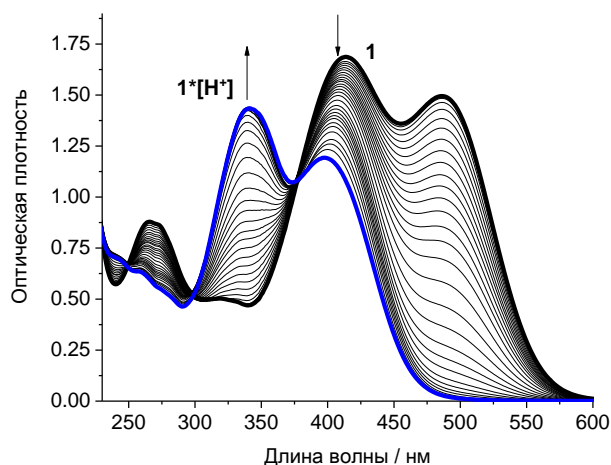


Рисунок 10. Спектрофотометрическое титрование бисстирилового красителя **1** кислотой HClO₄ ($C_1 = 50 \mu\text{M}$, $C_{\text{H}^+}/C_1 = 0-93$) в MeCN.

На рисунке 11 представлены спектры поглощения красителя **1** в комплексе с ионами металлов, а на рисунке 12 - фотографии растворов комплексов при дневном освещении. Среди исследуемых металлов, взаимодействующих с бензо-15-краун-5 эфиром, наиболее сильные сдвиги полосы при 415 нм и более высокие константы устойчивости показали ионы Mg²⁺ и Ca²⁺. Цвет раствора красителя возникает из-за комбинации двух полос (415 и 487 нм), поэтому

на фотографии изменение положения коротковолновой полосы поглощения не может быть распознано «невооруженным глазом». В случае комплексообразования азадитиакраун-эфира с катионами H^+ и Hg^{2+} сильное гипсохромное смещение претерпевала ДПП при 487 нм, поэтому визуально наблюдалось выраженное обесцвечивание раствора красителя.

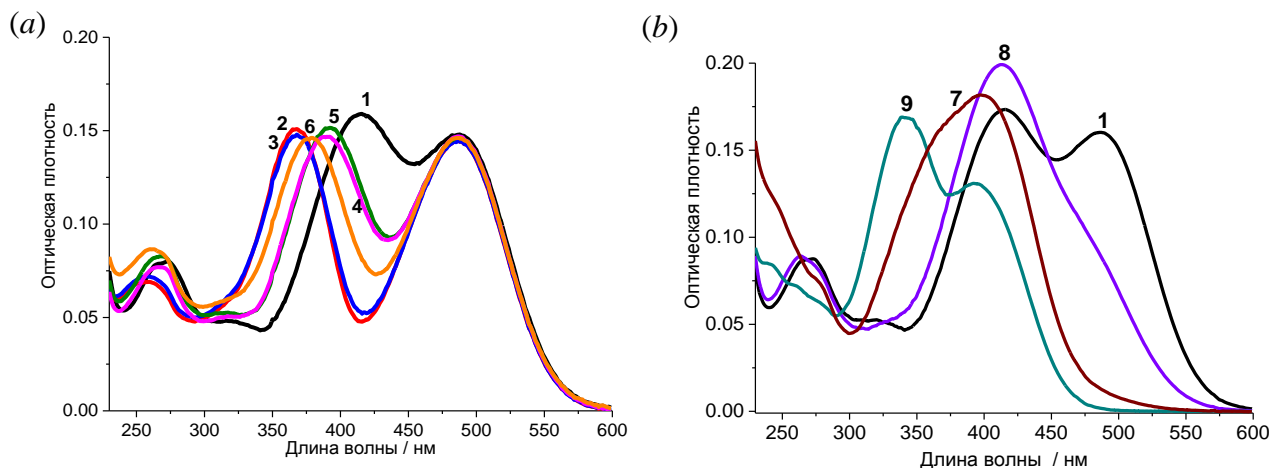


Рисунок 11. Спектры поглощения бисстирилового красителя **1** (1); а) комплекса **1**- Mg^{2+} (2); комплекса **1**- Ca^{2+} (3); комплекса **1**- Na^+ (4); комплекса **1**- Li^+ (5); комплекс **1**- Ba^{2+} (б); б) комплекса **1**- Hg^{2+} (7); комплекса **1**- Ag^+ (8); комплекса **1**- H^+ (9); $C_1 = 5 \mu\text{M}$, $C_{\text{M}^+} = 5 \text{mM}$ (кроме Hg^{2+} , $C_{\text{Hg}^{2+}} = 5 \mu\text{M}$), в MeCN.

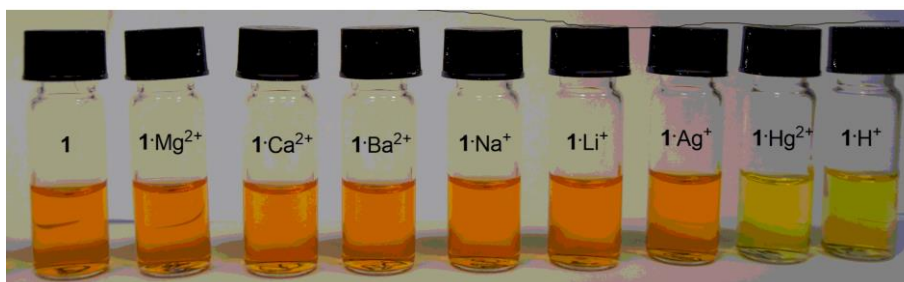


Рисунок 12. Изменения в окраске ацетонитрильных растворов красителя **1** после добавления 10 экв. различных ионов металлов (1 экв. в случае Hg^{2+}).

Максимум спектра флуоресценции бисстирилового красителя **1** в ацетонитриле при возбуждении $\lambda_{\text{возб}} = 490 \text{ нм}$ находится в области около 620 нм , а при облучении $\lambda_{\text{возб}} = 415 \text{ нм}$ - при $\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}} = 620 \text{ нм}$ с плечом при 550 нм . Появление плеча вызвано неполным переносом энергии, флуоресценция при 550 нм принадлежит хромофору с кислородным краун-эфиром. Максимумы и квантовые выходы флуоресценции красителя **1** и его комплексов приведены в таблице 4. Добавление ионов металлов, связывающихся с оксакраун-эфиром, не оказывает существенного влияния на квантовый выход флуоресценции. Очень слабое увеличение квантового выхода флуоресценции было обнаружено при добавлении ионов H^+ , Hg^{2+} и Ag^+ . Наблюдаемые эффекты согласуются с таковыми для аналогичных краун-содержащих стириловых красителей [164,165].

Для изучения влияния комплексообразования на процесс переноса энергии нами были проведены флуориметрические исследования бисстирилового красителя **1** с добавлением Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , H^+ , Hg^{2+} и Ag^+ при возбуждении $\lambda_{\text{возб}} = 415$ нм (Схема 12). Затем была исследована флуоресценция красителя в присутствии тех же ионов металлов при возбуждении $\lambda_{\text{возб}} = 490$ нм.

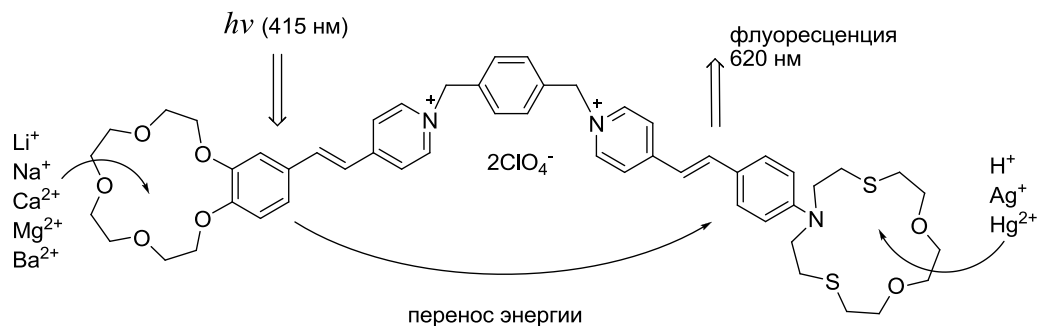


Схема 12

Комплексообразование красителя с катионами металлов приводит к сдвигу соответствующей полосы поглощения и флуоресценции в коротковолновую область спектра. Таким образом, при связывании красителем **1** катионов щелочных и щелочно-земельных металлов интенсивность поглощения на длине волны 415 нм, которую мы использовали для возбуждения, уменьшается, что приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции красителя в комплексе с металлами (Рисунок 13, 15). Очевидно, что тушение флуоресценции зависит от величины сдвига полосы поглощения хромофора с бензо-15-краун-5-эфиром. Наибольший сдвиг вызывает наибольшее уменьшение интенсивности поглощения при 415 нм. На рисунке 13 показана флуоресценция комплексов красителя **1** с Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} . Интенсивность флуоресценции с максимумом при 620 нм является самой низкой для комплексов с Mg^{2+} и Ca^{2+} и самой высокой для комплексов с Na^+ и Li^+ . Это также согласуется с полученными значениями констант связывания комплексов.

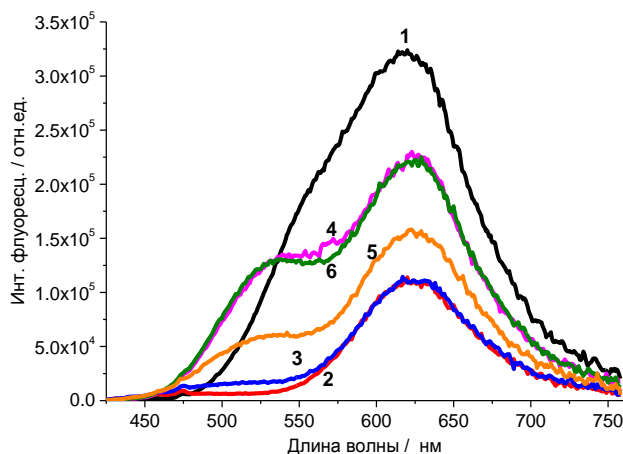


Рисунок 13. Спектр флуоресценции бисстирилового красителя **1** (1); комплекса **1**- Mg^{2+} (2); комплекса **1**- Ca^{2+} (3); комплекса **1**- Na^+ (4); комплекса **1**- Li^+ (5); комплекс **1**- Ba^{2+} (6); при $\lambda_{\text{возб}} = 415$ нм, $C_1 = 5 \mu\text{M}$, $C_{\text{M}^+} = 5 \text{mM}$, в MeCN.

Процесс переноса энергии изучали также при комплексообразовании бисстирилового красителя **1** с катионами H^+ , Hg^{2+} , Ag^+ при $\lambda_{\text{возб}} = 415$ нм. Связывание катионов H^+ , Hg^{2+} , Ag^+ с азадитиакраун-эфиром вызывает существенный сдвиг полосы поглощения данного хромофора и ухудшает перекрывание спектров флуоресценции донора энергии (O-хромофора) и поглощения акцептора энергии (N-хромофора). В этом случае при облучении комплекса $\lambda_{\text{возб}} = 415$ нм перенос энергии будет затруднен, в результате чего спектр флуоресценции будет содержать полосы, соответствующие обоим хромофорам, как с бензо-краун-эфиром, так и с азадитиакраун-эфиром. Таким образом, спектры флуоресценции комплексов $\mathbf{1} \cdot \text{H}^+$ и $\mathbf{1} \cdot \text{Hg}^{2+}$ составлены из полосы при 550 нм, соответствующей флуоресценции стирила со свободным бензо-15-краун-5-эфиром, и из полосы при 560-570 нм – флуоресценции стирила со связанным азадитиакраун-эфиром (Рисунок 14, 15).

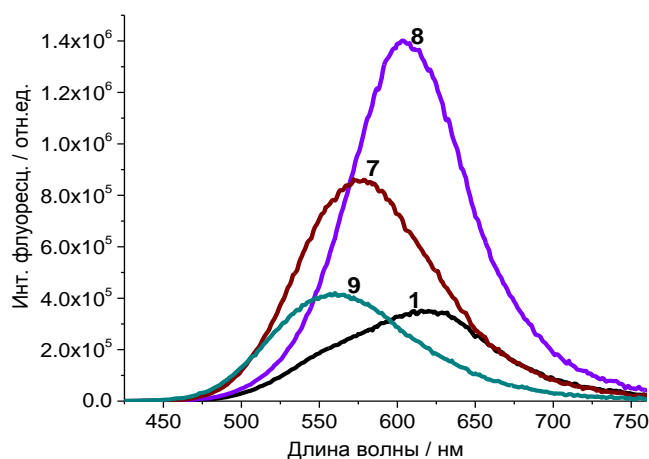


Рисунок 14. Спектр флуоресценции бисстирилового красителя **1** (1); комплекса $\mathbf{1} \cdot \text{Hg}^{2+}$ (7); комплекса $\mathbf{1} \cdot \text{Ag}^+$ (8); комплекса $\mathbf{1} \cdot \text{H}^+$ (9), при $\lambda_{\text{возб}} = 415$ нм, $C_1 = 5 \mu\text{M}$, $C_{\text{M}^+} = 5 \text{mM}$ (кроме соли Hg^{2+} $C_{\text{Hg}^{2+}} = 0.02 \text{mM}$), в MeCN.

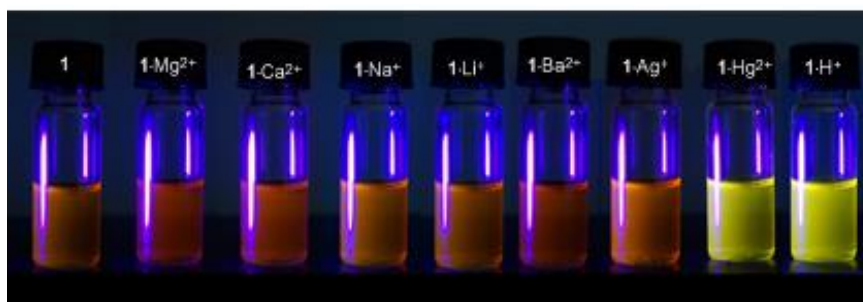


Рисунок 15. Изменения в окраске растворов красителя **1** после добавления 10 экв. различных ионов металлов (1 экв. в случае Hg^{2+}) при $\lambda_{\text{возб}} = 415$ нм в MeCN.

Комплексообразование красителя с катионами по кислородному краун-эфиру позволяет настраивать эффективность переноса энергии. Таким образом, данный бисстириловый краситель может использоваться для ратиометрического флуоресцентного детектирования ионов, поскольку сигнал, получаемый при переносе энергии при $\lambda_{\text{возб}} = 415$ нм, может

генерировать индивидуальный флуоресцентный отклик в области 600 нм для каждого из исследуемых катионов, связывающихся с макроциклами. При этом при возбуждении $\lambda_{\text{возб}} = 490$ нм спектр флуоресценции красителя **1** практически не изменяется в присутствии катионов, координированных через бензокраун-эфир (Рисунок 16).

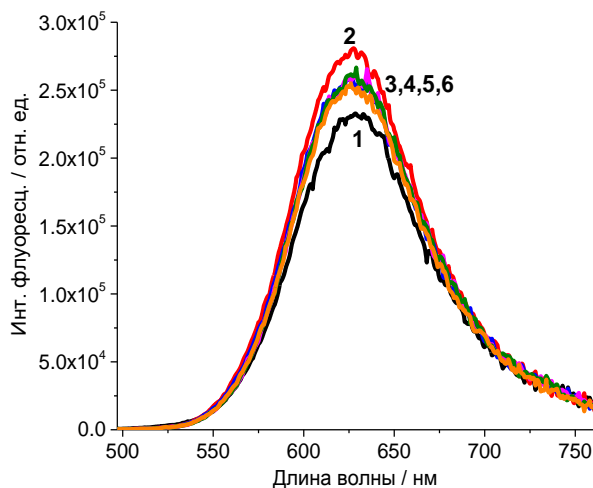


Рисунок 16. Спектр флуоресценции бисстирилового красителя **1**(1); комплекса **1**- Mg^{2+} (2); комплекса **1**- Ca^{2+} (3); комплекса **1**- Na^+ (4); комплекса **1**- Li^+ (5); комплекс **1**- Ba^{2+} (6); при $\lambda_{\text{возб}} = 490$ нм, $C_1 = 5 \mu\text{M}$, $C_{\text{M}^+} = 5 \text{mM}$, в MeCN.

Для анализа способности одновременного детектирования нескольких катионов далее изучался протонированный краситель **1** на предмет возможности координирования ионов металлов через кислородный краун-эфир. Добавление хлорной кислоты к красителю **1** приводит к протонированию азадитиакраун-эфира, что отражается на спектрах поглощения. Протонирование вызывает сдвиг полосы при 415 нм, принадлежащей O-хромофору, до 404 нм (Рисунок 17). Полоса N-хромофора меняет положение с 490 нм до 338 нм. Такие изменения связаны с тем, что протоны координируются с атомом азота азадитиакраун-эфира. Далее было показано, что $\mathbf{1} \cdot \text{H}^+$ может координироваться с катионами Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} . Координация сопровождается смещением положения полос поглощения аналогично свободному лиганду **1**.

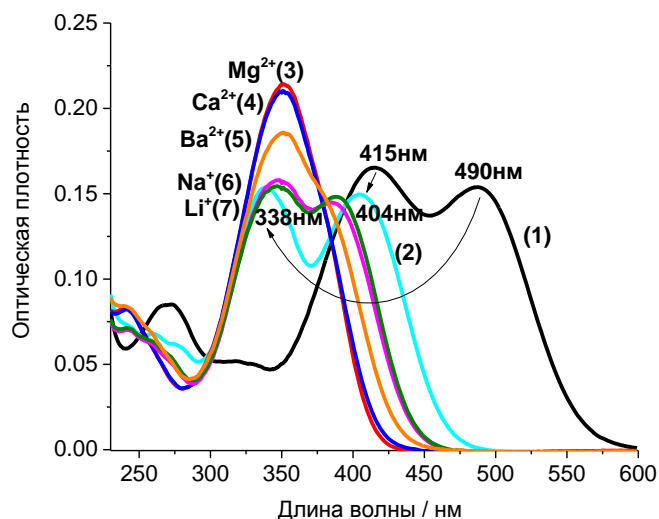


Рисунок 17. Спектры поглощения бисстирилового красителя **1** (1); комплекса $1 \cdot \text{H}^+$ (2); комплекса $1 \cdot \text{H}^+ \cdot \text{Mg}^{2+}$ (3); комплекса $1 \cdot \text{H}^+ \cdot \text{Ca}^{2+}$ (4); комплекса $1 \cdot \text{H}^+ \cdot \text{Ba}^{2+}$ (5); комплекса $1 \cdot \text{H}^+ \cdot \text{Na}^+$ (6); комплекса $1 \cdot \text{H}^+ \cdot \text{Li}^+$ (7); $C_1 = 5 \mu\text{M}$, $C_{\text{M}^{2+}} = 5 \text{mM}$, (кроме H^+ , $C = 0.5 \text{mM}$), в MeCN.

Комплекс $1 \cdot \text{Hg}^{2+}$ также демонстрирует способность координировать ионы Na^+ и Mg^{2+} через кислородный краун-эфирный фрагмент (Рисунок 18). Спектрофотометрическое титрование позволило рассчитать константы устойчивости комплексов $1 \cdot \text{Hg}^{2+} \cdot \text{Mg}^{2+}$ и $1 \cdot \text{Hg}^{2+} \cdot \text{Na}^+$ (Таблица 4).

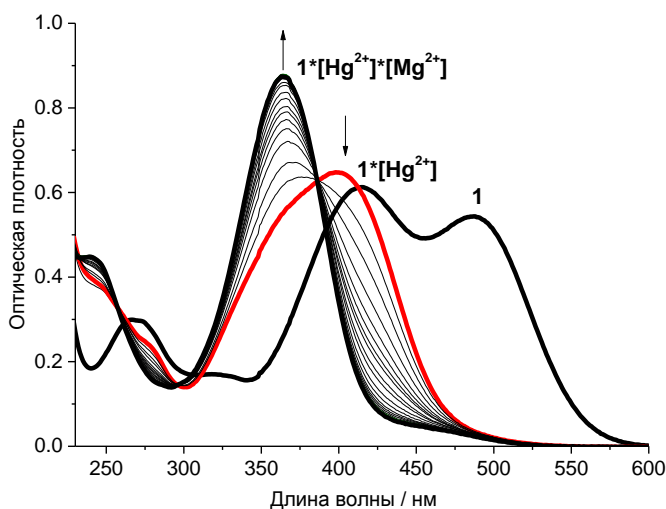


Рисунок 18. Спектрофотометрическое титрование комплекса $1 \cdot \text{Hg}^{2+}$ солью $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($C_1 = 20 \mu\text{M}$, $C_{\text{Mg}^{2+}}/C_1 = 0-111$) в MeCN.

Таким образом, комбинация двух флуорофоров и двух активных центров связывания, расположенных в одной системе бисстирилового красителя **1**, дает информацию о типе связанных ионов металлов и позволяет различать металлы, скоординированные с одним и тем же макроциклическим центром.

3.5. Комплексообразование краун-содержащего бисстирилового красителя **1** с катионом ртути в воде

Для определения возможности использования лиганда **1** в качестве сенсора на ионы металлов в биологических средах далее было проведено исследование по связыванию красителя **1** с катионами металлов в водном растворе. Все эксперименты проводили при pH 6,0 (ацетатный буфер, 0.01 M), что, с одной стороны, достаточно близко к слабокислой среде внутри клеток A549 [168] (эти клетки использовались в клеточных экспериментах далее), а с другой стороны, исключает протонирование атома азота азакраун-эфира и связанные с ним спектральные сдвиги.

В водной среде добавление катионов Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} не приводило к существенным изменениям в спектрах поглощения и флуоресценции красителя **1**. В тех же условиях постепенное добавление аликвот Hg^{2+} к раствору лиганда **1** резко снижало оптическую плотность при 470 нм при одновременном росте интенсивности коротковолновой полосы на спектрах поглощения (Рисунок 19). На спектре испускания при возбуждении на длине волны 380 нм добавление Hg^{2+} приводило к усилению сигнала флуоресценции и его гипсохромному сдвигу (Рисунок 19). Анализ спектров, полученных при различных концентрациях катионов Hg^{2+} , показал, что в водном растворе образуется комплекс в соотношении металл:лиганд 1:1. По данным спектрофотометрического и спектрофлуориметрического титрования были рассчитаны значения константы устойчивости комплекса с помощью программы SpecFit-32 (Таблица 5).

Таблица 5. Оптические свойства стироловых красителей **mc**₁, **mc**₂ и константы устойчивости комплексов соединений **1** и **mc**₂ с Hg^{2+} в ацетатном буфере при pH 6.0.

Соединение	$\lambda_{\text{погл. макс.}}$, нм	ϵ_{λ} , $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{фл. макс.}}$, нм	$\phi^{\text{фл.}}$, %	$\lg K$	
					Спектрофотометр. титрование	Спектрофлуориметр. титрование
(1)- Hg^{2+}	395	40 970	581 (380)	4.1	6.27 ± 0.12	6.24 ± 0.11
mc ₁	384	25 300	541 (380)	2.9	–	–
mc ₂	457	30 650	607 (405)	1.2	–	–
(mc ₂)- Hg^{2+}	380	18 390	571 (405)	5.2	6.03 ± 0.06	6.05 ± 0.06

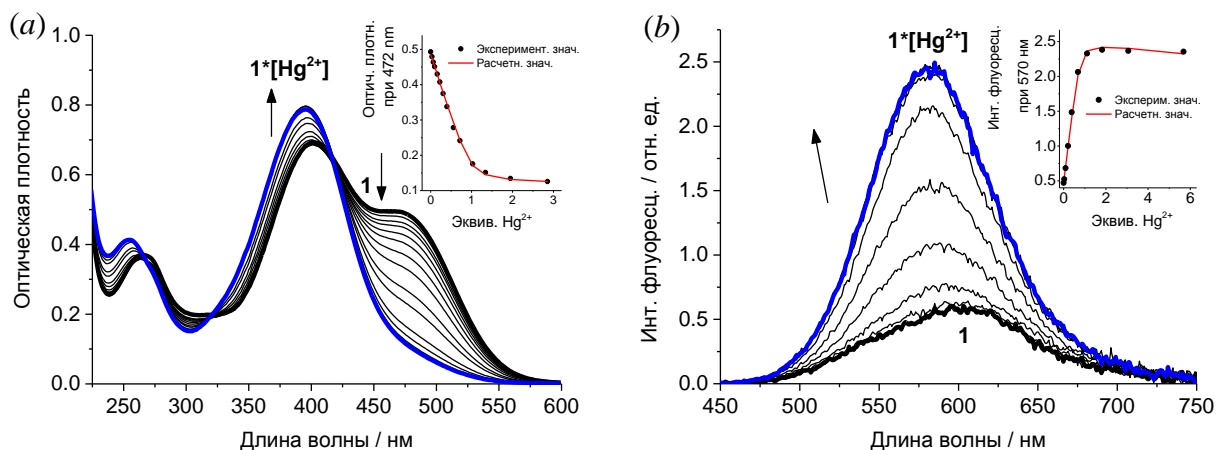


Рисунок 19. Спектрофотометрическое (а) и спектрофлуориметрическое (б) титрование бисстирилового красителя **1** солью $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ в ацетатном буфере (рН 6.0) при $\lambda_{\text{возб}} = 380$ нм, $C_1 = 20$ μM .

Чтобы объяснить наблюдаемые спектральные эффекты, дополнительно было исследовано влияние добавки Hg^{2+} на спектроскопические свойства монохромоформных производных **mc**₁ и **mc**₂ (Схема 13). В случае оксакраун-соединения **mc**₁ изменений в положении и интенсивности ДПП и флуоресценции при добавлении Hg^{2+} не было обнаружено, что указывает на то, что донорный О-хромофор в структуре соединения **1** не участвует в координации с данным ионом. В спектре поглощения производного азакраун-эфира **mc**₂ при добавлении катионов Hg^{2+} наблюдались гипсохромный сдвиг (на 77 нм) длинноволновой полосы и появление изобестической точки при 408 нм, что обусловлено образованием комплекса $(\text{mc}_2)\cdot\text{Hg}^{2+}$ (Рисунок 20). При возбуждении на длине волны 405 нм, близкой к изобестической точке, в спектре флуоресценции **mc**₂ при добавлении катионов Hg^{2+} наблюдается увеличение интенсивности и сдвиг максимума флуоресценции в коротковолновую область спектра (Рисунок 20). Усиление интенсивности флуоресценции при добавлении Hg^{2+} свидетельствует о более высоком квантовом выходе флуоресценции комплекса $(\text{mc}_2)\cdot\text{Hg}^{2+}$ по сравнению со свободным **mc**₂ (Таблица 5), тогда как синее смещение может быть результатом снижения ИСТ-взаимодействия между донорным атомом азота азакраун-эфира, координированным с Hg^{2+} , и акцепторным N-метилпиридиниевым фрагментом.

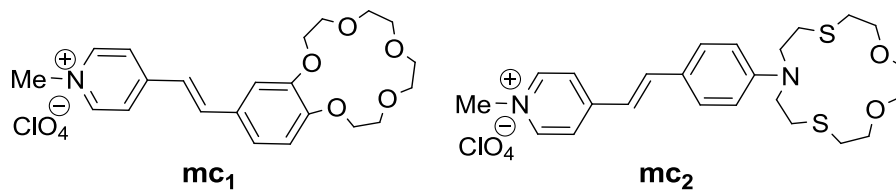


Схема 13

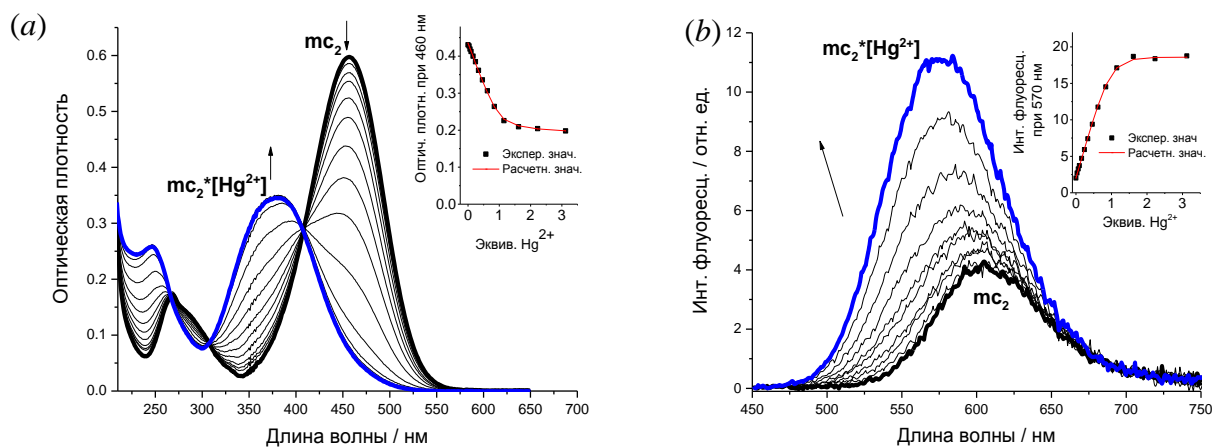


Рисунок 20. Спектрофотометрическое (a) и спектрофлуориметрическое (b) титрование моностирилового красителя mc_2 солью $Hg(ClO_4)_2$ в ацетатном буфере (pH 6.0) при $\lambda_{возб} = 405$ нм, $C_{mc_2} = 20 \mu M$.

Полученные данные о взаимодействии mc_1 и mc_2 с Hg^{2+} позволили предположить, что изменения в спектре поглощения **1** в присутствии $Hg(ClO_4)_2$ связаны только с гипсохромным сдвигом полосы поглощения N-хромофора, обусловленным координацией азадитиа-15-краун-5-эфира с катионом ртути (II). Однако природа флуоресцентного отклика красителя **1** в комплексе с Hg^{2+} оказалась более сложной. Длина волны возбуждения 380 нм, используемая для спектрофлуориметрического титрования лиганда **1**, соответствует максимуму поглощения комплекса N-хромофора с Hg^{2+} (Таблица 5). Это означает, что наблюдаемое усиление флуоресценции (Рисунок 19) отчасти связано с непосредственным возбуждением N-хромофорного фрагмента в комплексе $(1) \cdot Hg^{2+}$, концентрация которого увеличивается в ходе эксперимента по титрованию. В то же время, длина волны 380 нм близка к положению максимума ДПП производного оксакрауна mc_1 (Таблица 5), что позволяет предположить некоторый вклад флуоресценции O-хромофора в полосу испускания $(1) \cdot Hg^{2+}$. Гипсохромный сдвиг, наблюдаемый для соединения mc_2 при связывании с Hg^{2+} , приводит к уменьшению перекрытия его полосы поглощения со спектром испускания O-хромофора, что может снизить эффективность переноса энергии. Следовательно, при возбуждении хромофора с оксакраун-эфиром в структуре $(1) \cdot Hg^{2+}$ без переноса энергии, эмиссия O-хромофора может вносить свой вклад в общий спектр флуоресценции. В отличие от свободного лиганда **1**, коротковолновая часть полосы флуоресценции $(1) \cdot Hg^{2+}$ не уширялась из-за близких значений максимума эмиссии свободного O-хромофора и N-хромофора, связанного с Hg^{2+} .

*Эксперименты по клеточной визуализации.*³

Далее была исследована возможность применения красителя **1** для флуоресцентной визуализации Hg^{2+} в живых клетках. Для сравнения также исследовали соединения **mc₁** и **mc₂**. С помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии было обнаружено, что красители **1**, **mc₁** и **mc₂** проникают в клетки аденокарциномы легкого человека A549 и накапливаются в цитоплазме (Рисунок 21). После оптимизации условий внутриклеточного возбуждения и детекции соединения **1** и **mc₂** показали интенсивное флуоресцентное окрашивание, тогда как клеточная флуоресценция **mc₁** была слабой. Три красителя **1**, **mc₁** и **mc₂** показали различное распределение внутри клетки. Для бисстирилового красителя **1** наблюдали накопление в везикулярных структурах субмикронного размера и диффузное окрашивание цитоплазмы (Рисунок 21a). Соединение **mc₁** продемонстрировало только диффузное окрашивание цитоплазмы (Рисунок 21b). Краситель **mc₂** накапливался в вытянутых структурах, образующих сложную сеть (Рисунок 21c), морфология которой типична для митохондрий.

Для выяснения происхождения органелл, аккумулирующих соединения **1** и **mc₂**, был проведен эксперимент по солокализации флуоресцентных зондов для конкретных органелл и исследуемых соединений. Изучение совместной локализации **mc₂** и родамина 123, который, как отмечалось в литературном обзоре, накапливается в митохондриях, подтвердило митохондриальное распределение красителя **mc₂** в клетках A549. Было показано, что везикулы, окрашенные лигандом **1**, отличаются от липидных капель, то есть клеточных органелл, в которых хранятся нейтральные липиды. Используя производное хлорина еб, для которого ранее было доказано, что оно накапливается в лизосомах [169], было обнаружено, что соединение **1** локализовано в лизосомах.

Спектры внутриклеточной флуоресценции соединений **1**, **mc₁** и **mc₂** анализировали в спектральном режиме измерения конфокального изображения. При длине волны возбуждения $\lambda_{\text{возб}} = 488$ нм соединения **1** и **mc₂** имеют очень близкие внутриклеточные спектры с максимумом около 584 нм (Рисунок 21d). Спектр внутриклеточной флуоресценции **mc₁** ($\lambda_{\text{возб}} = 405$ нм) имеет максимум при 543 нм. Спектры флуоресценции соединений **1** ($\lambda_{\text{возб}} = 488$ нм), **mc₁** и **mc₂** не были заметно изменены по форме в разных участках клеток, но различались по интенсивности. Сравнение со спектрами флуоресценции **1**, **mc₁** и **mc₂**, измеренными в водном растворе (Таблица 5), показывает, что внутриклеточный спектр **mc₁** имеет тот же максимум, тогда как максимумы спектра **1** и **mc₂** сдвинуты в синюю область спектра примерно на 30 нм, вероятно, из-за взаимодействия **1** и **mc₂** с некоторыми клеточными молекулами. Подобный

³ Экспериментальные данные получены в лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ФГБУН ИБХ им. ак ММ. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН Ефременко А.В. и д.х.н. Феофановым А.В.

синий сдвиг полосы флуоресценции наблюдался для ранее описанного производного 4-п-диметиламиностирила в клетках A549 [170].

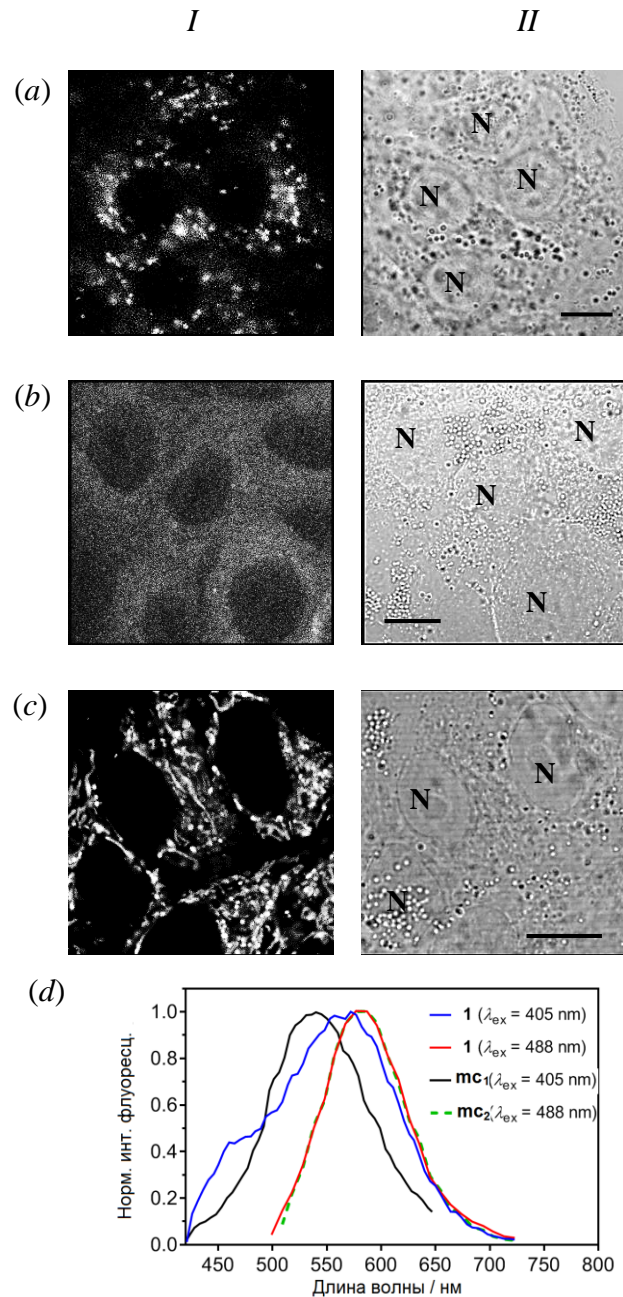


Рисунок 21. Изображения конфокальной флуоресцентной микроскопии (а–с) и спектры флуоресценции (d) **1**, **mc₁** и **mc₂** в клетках A549. (а–с) Изображения внутриклеточного распределения (столбец I) **1** (а), **mc₁** (b), **mc₂** (с) и соответствующие изображения клеток в проходящем свете (столбец II). Метка - 10 μ m. N - обозначает ядро. Клетки инкубировали с красителями **1**, **mc₁** и **mc₂** (10 μ M) в течение 30 мин. (d) Спектры внутриклеточной флуоресценции **1**, **mc₁** и **mc₂**, нормированные на максимум.

Спектр внутриклеточной флуоресценции **1** при возбуждении на длине волны 405 нм очень широк, с центром около 570 нм и имеет плечо в диапазоне 420–480 нм (Рисунок 21d). Таким образом, этот спектр можно описать как суперпозицию спектров **mc₁** и **mc₂** и остаточного спектра, имеющего максимум при 459 нм. Относительный вклад этих трех компонентов в спектр **1** варьируется в разных областях клетки. В спектральном диапазоне 500–700 нм

флуоресценция красителя **1** представляет собой суперпозицию эмиссий хромофоров с оксакраун- и азокраун-эфирными группами со сравнимыми вкладами. Это можно объяснить неполным переносом энергии в соединении **1** (84%) при относительно высоком квантовом выходе флуоресценции донорного хромофора (значение $\phi^{фл}$ для **mc**₁ в 2,4 раза выше, чем для **mc**₂ (Таблица 5). Вполне естественно, что при переходе из водного раствора в клеточную среду могут происходить некоторые изменения эффективности FRET и/или квантовых выходов флуоресценции фотоактивных фрагментов в соединении **1**. Например, перенос энергии может быть затруднен в результате специфического изменения конформации или уменьшения степени перекрытия между спектром испускания донорного хромофора и спектром поглощения акцепторного хромофора. «Остаточный» компонент при 459 нм не может быть связан с клеточной автофлуоресценцией, поскольку он отсутствует в необработанных клетках и клетках, обработанных **mc**₁ и **mc**₂. Возможно, компонента на 459 нм является результатом эмиссии от хромофора с оксакраун-эфиром особых комплексов лиганда **1**, образуемых в клетках.

Предварительная инкубация клеток с $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ не изменила качественной картины внутриклеточного распределения красителя **1** (Рисунок 22), но привела к значительным изменениям в спектрах внутриклеточной флуоресценции при возбуждении $\lambda_{\text{возб}} = 405$ нм, что свидетельствует об образовании комплексов $(\mathbf{1}) \cdot \text{Hg}^{2+}$ (Рисунок 22c,d). При высокой концентрации Hg^{2+} спектр внутриклеточной флуоресценции **1** ($\lambda_{\text{возб}} = 405$ нм) становится узким и имеет максимум при 590 нм. При облучении $\lambda_{\text{возбх}} = 488$ нм внутриклеточный спектр $(\mathbf{1}) \cdot \text{Hg}^{2+}$ несколько смещен в красную область по сравнению с внутриклеточным спектром **1** ($\lambda_{\text{возб}} = 488$ нм), имеет максимум при 590 нм и совпадает по форме со спектром комплекса $(\mathbf{1}) \cdot \text{Hg}^{2+}$ при возбуждении $\lambda_{\text{возб}} = 405$ нм. Такие изменения формы полосы испускания согласуются с данными спектрофлуориметрического титрования, полученными в водном растворе (Рисунок 19b). Как было отмечено выше, уширение коротковолновой части спектра испускания наблюдалось для свободного лиганда **1**, но не для комплекса $(\mathbf{1}) \cdot \text{Hg}^{2+}$. Кроме того, усиление флуоресценции в 4,8 раза происходило при 580 нм (Рисунок 20b) за счет индуцированного катионом Hg^{2+} увеличения квантового выхода акцепторного хромофора (Таблица 5). Аналогичное увеличение интенсивности флуоресценции (в $4,3 \pm 0,3$ раза) обнаружено и при координации Hg^{2+} с **1** в клетках.

Наблюдаемые различия в спектрах внутриклеточной флуоресценции **1** и $(\mathbf{1}) \cdot \text{Hg}^{2+}$ при облучении $\lambda_{\text{возб}} = 405$ нм могут быть использованы для ратиометрического флуоресцентного обнаружения Hg^{2+} в клетках с использованием соединения **1**. Например, сравнивая спектры флуоресценции красителя **1** внутри клеток в спектральных диапазонах 500–600 нм и 600–730 нм одновременно при $\lambda_{\text{возб}} = 405$ нм, можно увидеть, что относительные интенсивности флуоресценции на этих диапазонах заметно различаются в присутствии и в отсутствие ионов

Hg^{2+} (Рисунок 22a,b). Отношение R интенсивностей флуоресценции в данных двух диапазонах $I_{(500-600 \text{ нм})}/I_{(600-730 \text{ нм})}$, рассчитанное и усредненное по выборке клеток ($n = 20$), равно 4.4 ± 0.2 в отсутствие ионов Hg^{2+} и 1.43 ± 0.10 при связывании **1** с Hg^{2+} . Отношение R уменьшается в зависимости от концентрации $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$, добавленного к клеткам (Рисунок 23), что указывает на то, что R чувствителен к внутриклеточной концентрации Hg^{2+} .

Следует отметить, что при прямом возбуждении акцепторного фрагмента ($\lambda_{\text{возб}} = 488 \text{ нм}$) спектры внутриклеточной флуоресценции **1** и $(\mathbf{1}) \cdot \text{Hg}^{2+}$ близки по форме и максимумам, а комплексообразование с Hg^{2+} в основном проявляется увеличением интенсивности флуоресценции. При увеличении концентрации раствора Hg^{2+} , который использовался для предварительной инкубации клеток, интенсивность внутриклеточной флуоресценции увеличивается в 4.1 ± 0.1 раза по сравнению со свободным **1**. Таким образом, изменение интенсивности внутриклеточной флуоресценции **1** при $\lambda_{\text{возб}} = 488 \text{ нм}$ можно использовать (с некоторыми ограничениями) в качестве индикатора изменения внутриклеточной концентрации Hg^{2+} , когда известно, что ионы Hg^{2+} присутствуют в клетках. Напротив, при облучении красителя **1** $\lambda_{\text{возб}} = 405 \text{ нм}$ применимы ратиометрические измерения как для обнаружения ионов Hg^{2+} в клетках, так и для измерения изменения их концентрации.

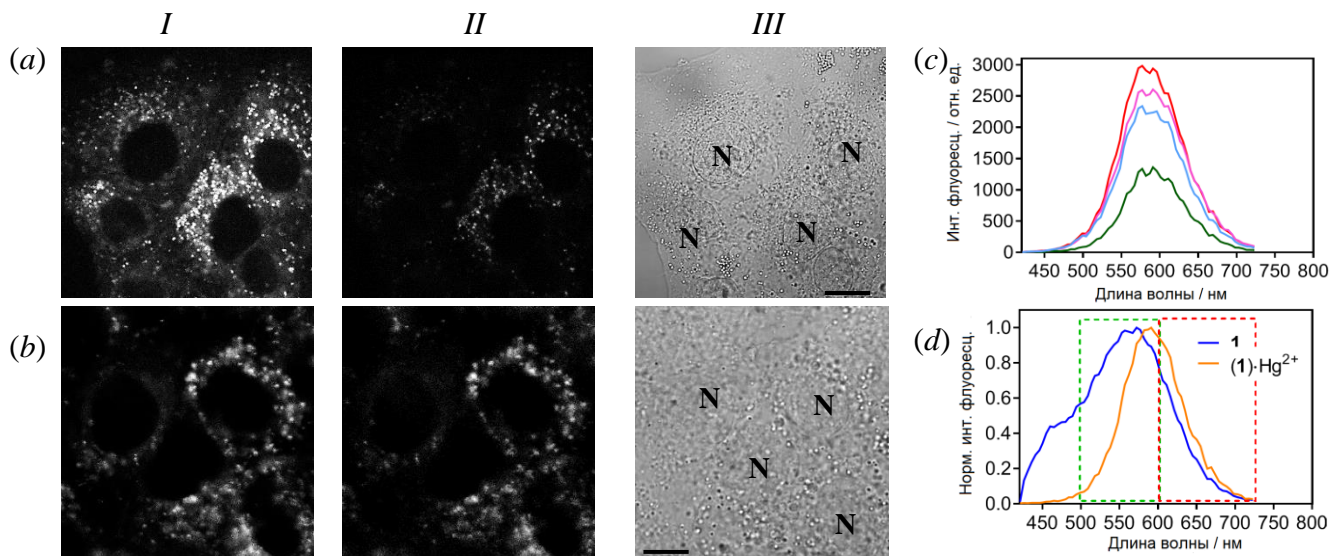


Рисунок 22. Изображения конфокальной флуоресцентной микроскопии (a,b) и спектры флуоресценции (c,d) лиганда **1** и комплекса $(\mathbf{1}) \cdot \text{Hg}^{2+}$ в клетках A549. (строка a) Клетки инкубировали с **1** ($10 \mu\text{M}$) в течение 20 мин. (строка b) Клетки подвергались предварительной инкубации с $20 \mu\text{M}$ $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ в течение 20 мин, дважды промывали раствором Хэнкса и инкубировали с красителем **1** ($10 \mu\text{M}$) в течение 20 мин. Изображения внутриклеточной флуоресценции измеряли в спектральных диапазонах 500–600 нм (столбец I) и 600–730 нм (столбец II) при возбуждении $\lambda_{\text{возб}} = 405 \text{ нм}$. В столбце III показаны изображения клеток в проходящем свете. Метка - $10 \mu\text{m}$. N - обозначает ядро. (c) Спектры флуоресценции **1** из разных областей клеток, предварительно инкубированных с $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$. (d) Нормализованные спектры внутриклеточной флуоресценции **1** и $(\mathbf{1}) \cdot \text{Hg}^{2+}$. Зеленые и красные прямоугольники показывают две области спектра (500–600 и 600–730 нм), выбранные для получения изображений, показанных в столбцах I и II.

Ратиометрические измерения с **1** можно использовать для оценки внутриклеточных концентраций ионов Hg^{2+} ($[\text{Hg}^{2+}]_i$), используя уравнение (2)

$$[\text{Hg}^{2+}]_i = K_d \cdot Q \cdot \frac{R_{\max} - R}{R - R_{\min}}, \quad (2)$$

где K_d – константа диссоциации комплекса (**1**)· Hg^{2+} , рассчитанная по $\lg K$ (Таблица 5) и равная $0,56 \pm 0,15 \mu\text{M}$, R_{\max} и R_{\min} – значения R для свободного лиганда **1** ($R_{\max} = 4,4 \pm 0,2$) и для комплекса (**1**)· Hg^{2+} ($R_{\min} = 1,43 \pm 0,10$) в клетках, найденное по графику на рисунке Рисунок 23а, Q – отношение интенсивности внутриклеточной флуоресценции свободного лиганда **1** к интенсивности (**1**)· Hg^{2+} в клетке в диапазоне 600–730 нм ($Q = 0,23 \pm 0,03$). [171]

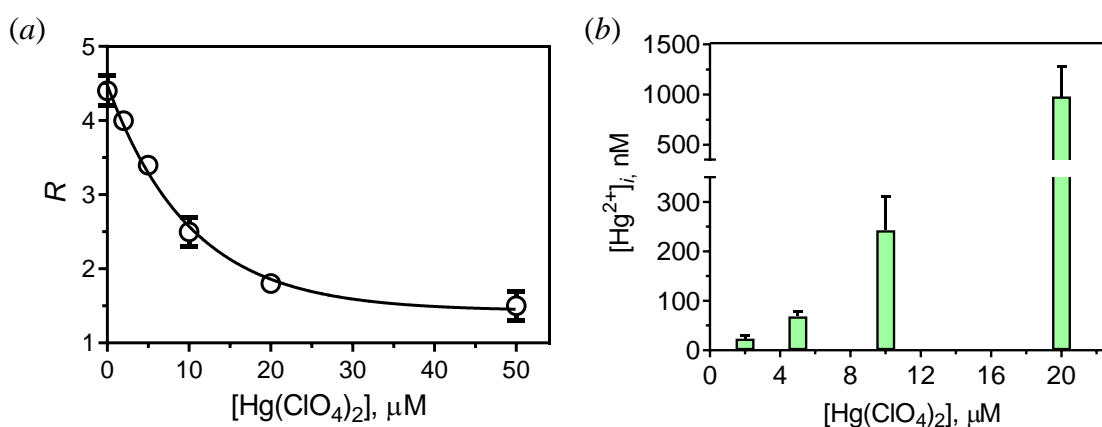


Рисунок 23. Определение внутриклеточных ионов Hg^{2+} ратиометрическим методом с соединением **1**. (а) Зависимость отношения R интенсивностей флуоресценции $I_{(500-600\text{нм})}/I_{(600-730\text{нм})}$ от концентрации $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$, добавленной в клетки. Данные усреднялись по 20 клеткам в каждом измерении и представлялись как среднее \pm стандартное отклонение. (б) Оценка внутриклеточной концентрации ионов Hg^{2+} ($[\text{Hg}^{2+}]_i$) при различных концентрациях $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$, добавленных к клеткам. Клетки предварительно инкубировали с различными концентрациями $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ в течение 15 мин, дважды промывали раствором Хэнкса, инкубировали с **1** (10 μM) в течение 20 мин и измеряли с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

Результаты оценки $[\text{Hg}^{2+}]_i$ на основе значений R , измеренных при различных концентрациях $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$, добавленного к клеткам, представлены на рисунке 23b. Зависимость R от внутриклеточной концентрации Hg^{2+} в диапазоне 0–60 нМ продемонстрировала хорошую линейность с коэффициентом корреляции 0.99. По наклону этой линейной зависимости (r) и стандартному отклонению отношения R (s) предел обнаружения Hg^{2+} в клетках (C_{DL}) согласно уравнению (3) [172] составил 37 нМ:

$$C_{\text{DL}} = \frac{3s}{r} \quad (3)$$

Таким образом, соединение **1** позволяет количественно определять ионы Hg^{2+} в клетках в диапазоне концентраций 37 нМ – 20 μM . Варьируя концентрацию соединения **1**, добавляемого к

клеткам, диапазон количественного определения ионов Hg^{2+} может несколько расширяться. Наблюдаемый предел обнаружения Hg^{2+} (37 нМ) достаточно близок к максимально допустимым концентрациям ртути (II) в питьевой воде, а именно 30 нМ (согласно отчетам Всемирной организации здравоохранения) и 10 нМ (согласно отчетам Агентства по охране окружающей среды США) [173], что квалифицирует соединение **1** как ратиометрический сенсор для мониторинга Hg^{2+} *in vivo* [174]. Представленные результаты позволяют сделать вывод, что соединение **1** может найти применение в исследованиях роли и превращений катиона ртути (II) в сложных биологических системах.

3.6. Комплексообразование красителей типа «голова к голове» **2, 3, 4** с ДНК тимуса теленка

Взаимодействие бисстириловых красителей **2, 3, 4** с дц-ДНК тимуса теленка изучалось с помощью спектрофотометрического и спектрофлуориметрического титрования в натрий-фосфатном буфере при рН 7. Фиксировали изменения в оптических спектрах при постепенном увеличении концентрации ДНК при постоянной концентрации каждого красителя. Для всех красителей были обнаружены два последовательных процесса. При первых добавках ДНК к раствору бисстириловых красителей наблюдалось уменьшение интенсивности максимума полосы поглощения (Рисунок 24). Дальнейшее увеличение концентрации ДНК приводило к увеличению интенсивности полосы поглощения и ее батохромному сдвигу до 15 нм для **2** и 24 нм для **3** (Таблица 6). Добавление ДНК к раствору несимметричного бисстирилового красителя **4** привело к малым изменениям положения максимумов и интенсивности полос поглощения. Батохромный сдвиг ДПП красителей при связывании с ДНК можно объяснить возникающими при этом изменениями локальной полярности вокруг красителя. В комплексе с ДНК энергетическая щель между ВЗМО и НСМО красителя уменьшается [175].

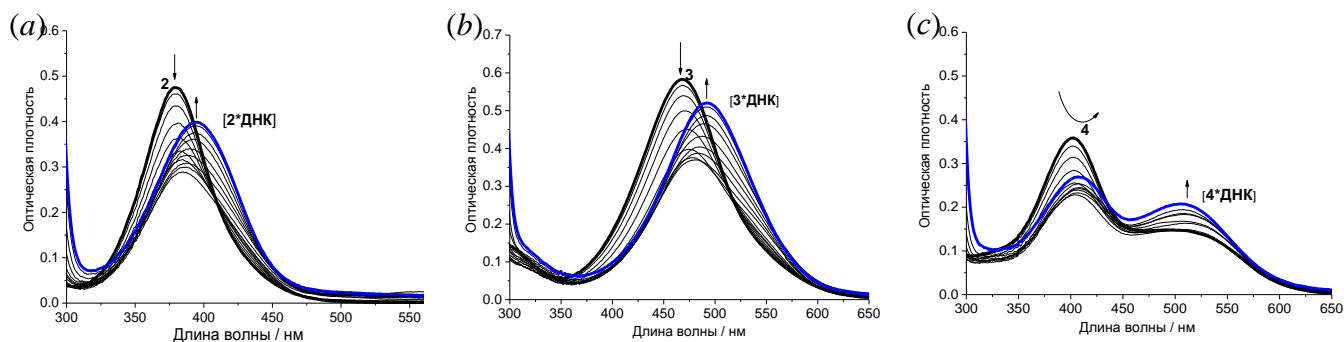


Рисунок 24. Спектрофотометрическое титрование дц-ДНК бисстириловых красителей **2**, $C_{\text{ДНК}}/C_2=0-49$ (а); **3**, $C_{\text{ДНК}}/C_3=0-44$ (b); **4**, $C_{\text{ДНК}}/C_4=0-42$ (с); $C_{\text{лиг}}=10\mu\text{M}$; в натрий-фосфатном буфере.

Таблица 6. Основные характеристики спектров поглощения и флуоресценции соединений **2**, **3**, **4** в комплексе с ДНК в натрий-фосфатном буфере.

Соединение в комплексе с ДНК	$\lambda_{\text{макс}}^{\text{погл}}$, нм	$\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}}$, нм	Стоксов сдвиг, см ⁻¹	$I_{\text{L DNA}}/I_{\text{L}}$	$\varphi^{\text{фл}}$, %
				$(\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}} \cdot \text{L} \cdot \text{DNA})$	
2	395	505	5520	3.2	1.47
3	492	615	4070	60	2.82
4	408, 507	495, 615	4310, 3460	3.2, 23	0.6

Флуоресценция свободных красителей в водном растворе довольно слабая. Для бисстирилового красителя **2** положение максимума флуоресценции изменяется после добавления первых аликвот раствора ДНК, а интенсивность увеличивается незначительно. В этом случае может происходить разрушение внутримолекулярного эксимера, по-видимому, при увеличении концентрации ДНК взаимодействие красителя в линейной форме с дц-ДНК становится более выгодным. С увеличением концентрации ДНК интенсивность флуоресценции **2** растет с незначительным гипсохромным смещением максимума. Первые добавки ДНК в раствор бисстирилового красителя **3** никак не повлияли на сигнал флуоресценции красителя, но при дальнейшем увеличении концентрации ДНК интенсивность возрастала до 60 раз (Рисунок 25b). При добавлении первых аликвот ДНК к раствору красителя **4** увеличивалась интенсивность длинноволновой полосы флуоресценции, тогда как полоса при 500 нм практически не изменялась. Далее также наблюдалось интенсивное увеличение флуоресценции при 620 нм и небольшое увеличение интенсивности коротковолновой полосы (Рисунок 25c, Таблица 6). Такие изменения подтверждают наличие переноса энергии в молекуле, поэтому связывание каждого из хромофоров привело к увеличению интенсивности флуоресценции N-хромофора при 620 нм.

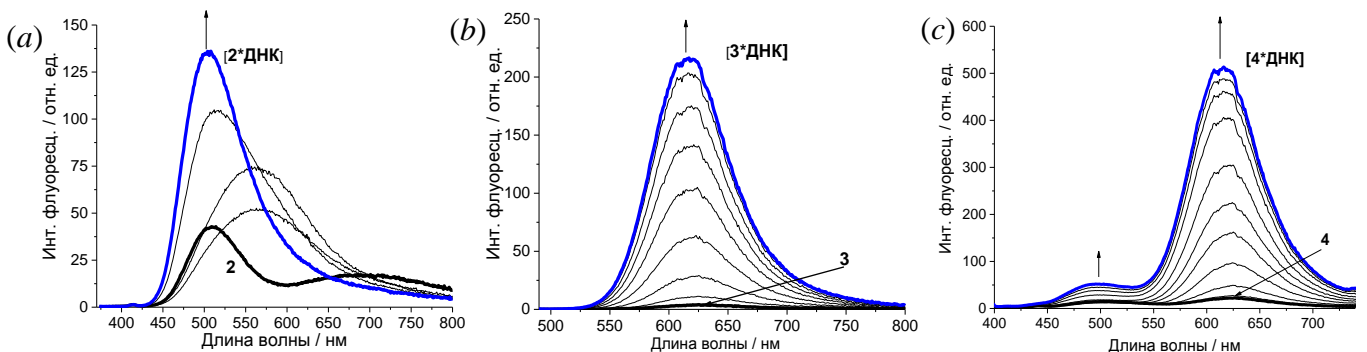


Рисунок 25. Спектрофлуориметрическое титрование дц-ДНК бисстириловых красителей **2**, $C_{\text{ДНК}}/C_2=0-49$ (a); **3**, $C_{\text{ДНК}}/C_3=0-44$ (b); **4**, $C_{\text{ДНК}}/C_4=0-42$ (c); $C_{\text{лиг}}=10\mu\text{M}$; в натрий-фосфатном буфере при возбуждении $\lambda_{\text{возб}}^2=362\text{нм}$, $\lambda_{\text{возб}}^3=470\text{нм}$, $\lambda_{\text{возб}}^4=382\text{нм}$.

Для лучшего понимания структуры комплексов краситель-дц-ДНК мы использовали КД-спектроскопию как высокочувствительный метод обнаружения конформационных изменений во вторичной структуре ДНК [176]. Спектр раствора ДНК имеет форму бисигнала с минимумом при 245 нм и максимумом при 275 нм. Молекулы красителей **2**, **3** и **4** являются ахиральными и не дают сигналов в спектрах КД. Небольшие ахиральные молекулы могут демонстрировать индуцированный сигнал КД (ИКД) при связывании с нуклеиновой кислотой (обычно в диапазоне > 300 нм), такие сигналы могут оказаться весьма информативными для определения способа связывания (интеркаляция, ассоциация, связывание в бороздках и т. д.) [177]. На рисунке 26 изображены спектры КД комплексов красителей **2**, **3** и **4** с ДНК при различных соотношениях краситель:ДНК. При добавлении к ДНК красителя **2** в спектре-КД наблюдается появление сильного экситонного сигнала (Рисунок 26а). Сигнал экситонного КД имеет одну положительную и одну отрицательную полосы по обе стороны от максимума поглощения свободного красителя. Экситонный сигнал-КД указывает на образование димеров или комплексов более высокого порядка либо при залегании в бороздку, либо при внешнем стэкинг-взаимодействии [176,178]. Можно предположить формирование структуры, в которой два красителя образуют димер внутри малой бороздки ДНК, а соседние димеры заполняют малую бороздку вдоль спирали ДНК. Взаимодействие между соседними димерами в малой бороздке вызывает расщепление полосы на положительные и отрицательные сигналы [179]. Правосторонняя спиральная ориентация соседних димеров приводит к такому расположению полос, когда положительный сигнал находится в длинноволновой области, а отрицательный – в коротковолновой. В случае соединения **2** изоэллиптическая точка (380 нм) совпадает с длиной волны, соответствующей максимуму поглощения красителя **2**. Это явление известно как правосторонняя спиральная агрегация в матрице ДНК [180]. По мере увеличения концентрации ДНК димеры заполняют новые сайты связывания и распространяются по бороздке. В спектрах КД увеличение концентрации ДНК приводит к потере расщепления (Рисунок 26а).

Связывание одиночной молекулы в малой бороздке энергетически выгодно благодаря гидрофобности красителя. Если второй краситель попадает в бороздку с образованием димера, то красители будут иметь более благоприятные Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия друг с другом. Сборка одного димера расширяет малую бороздку, что облегчает сборку дополнительных димеров, так как бороздка уже будет заранее предорганизована.

Поскольку мы не обнаружили образования димеров или агрегатов в растворе свободного красителя **3**, то расщепление сигнала КД в спектре комплекса красителя с нуклеиновой кислотой указывает на образование агрегатов уже в бороздке ДНК. После связывания лиганда **3** двойная спираль ДНК остается правосторонней, тогда как экситонное расщепление ИКД красителя указывает на образование левозакрученной спиральной сборки агрегирующих

хромофоров [114]. Для бисстирилового красителя **3** изоэллиптические точки появляются на 476 и 537 нм, т.е. один значительно смещен в красную область по сравнению с максимумом поглощения свободного **3** ($\Delta\lambda = +69$ нм), что может указывать на образование димеров J-типа в бороздке ДНК.

В случае соединения **4** изоэллиптические точки появляются при 439 нм и 477 нм, т.е. они сдвинуты по сравнению с максимумами поглощения свободного красителя **4** ($\Delta\lambda_1 = +38$ нм, $\Delta\lambda_2 = -26$ нм). Степень агрегации не очень высока из-за относительно низкой интенсивности экситонных полос КД, которые возникают из-за боковых взаимодействий, когда димеры в канавке плотно контактируют друг с другом. Такие изменения в спектрах КД могут указывать на то, что молекулы бисстирилового красителя взаимодействуют с ДНК, сворачиваясь в бороздку.

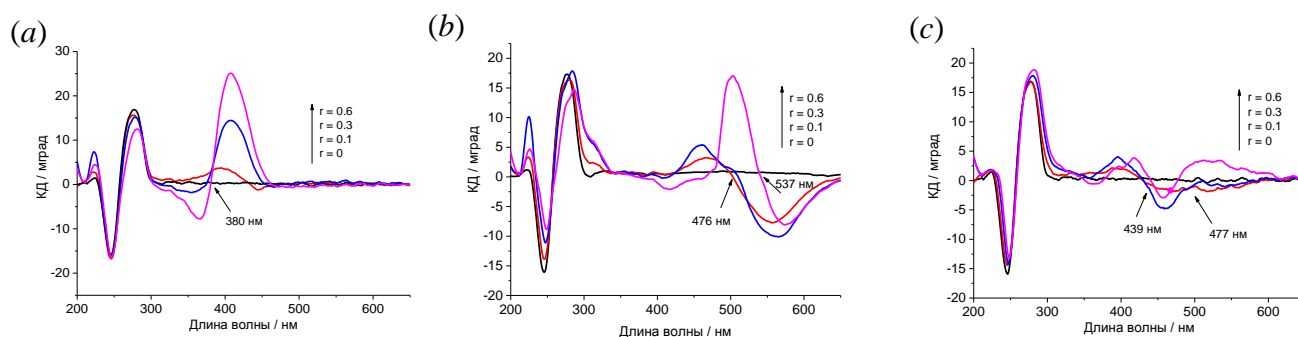


Рисунок 26. Спектры кругового дихроизма тт-ДНК (тт-ДНК = 0.1 мМ п.о.) в отсутствии и в присутствии бисстирилового красителя **2** (а), **3** (б), **4** (с) при разных соотношениях (лиганд – нуклеиновая кислота): 0; 0.1; 0.3; 0.6 в натрий-фосфатном буфере. Стрелками показано изменение полос с увеличением концентрации красителя.

Для определения механизма связывания бисстириловых красителей **2**, **3** и **4** с ДНК были дополнительно проведены эксперименты по конкурентному титрованию с красителями-стандартами, механизм взаимодействия с ДНК которых точно установлен. Эксперимент основан на том принципе, что если небольшая молекула или бисстириловый краситель вытесняет из комплекса связанный с ДНК краситель-стандарт, это указывает на то, что эта молекула связывается с ДНК тем же способом, что и стандартный краситель. Вытеснение красителя-стандарта из комплекса с биомолекулой приводит к изменениям его интенсивности флуоресценции, которые можно легко идентифицировать.

Мы провели конкурентное титрование бисстириловых красителей **2**, **3** и **4** с использованием метиленового зеленого (MeGr), стандартного лиганда для большой бороздки ДНК [181]. Добавление бисстириловых красителей **2**, **3** и **4** не повлияло на спектр флуоресценции комплекса (MeGr)-дц-ДНК, что указывает на то, что соединения **2**, **3** и **4** не взаимодействуют с ДНК по типу связывания с большой бороздкой (Рисунок 27а). Для изучения взаимодействия

бисстириловых красителей с малой бороздкой ДНК мы провели конкурентное титрование с хекстом (Hoechst 33258), стандартом по связыванию с ДНК в малой бороздке [182]. Молекулы, также взаимодействующие путем залегания в малую бороздку, способны вытеснять хекст из спирали ДНК, что приводит к снижению интенсивности флуоресценции комплекса (хекст)-ДНК. Как показано на рисунке 27b, постепенное добавление красителя **2** к комплексу (хекст)-ДНК), также как и добавление красителей **3**, **4**, приводило к последовательному снижению интенсивности флуоресценции, что указывает на связывание бисстириловых красителей в малой бороздке ДНК.

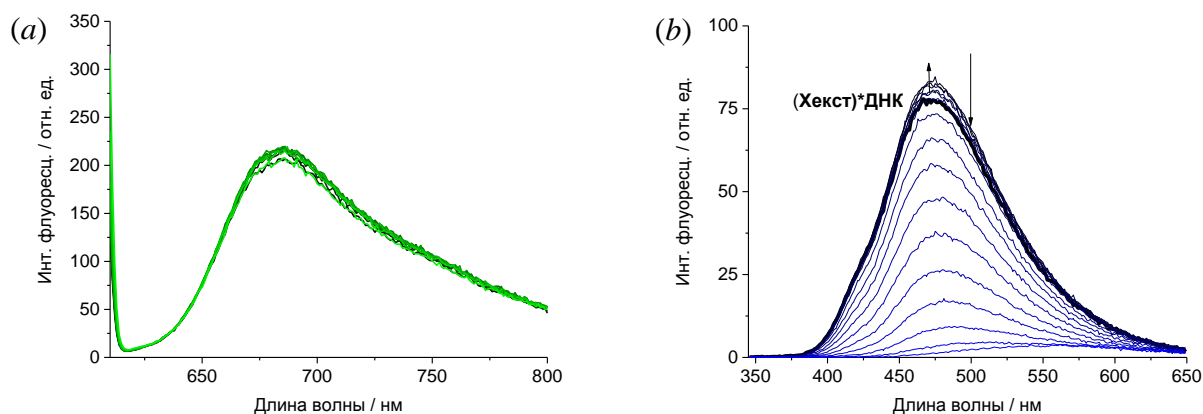


Рисунок 27. Спектрофлуориметрическое титрование комплекса (MeGr)-ДНК (а) и (Хекст)-ДНК (b) бисстириловым красителем **2**, $C_2/C_{\text{Хекст}}=0-12$, $C_{\text{Хекст}}=5\mu\text{M}$, $C_{\text{ДНК}}=0.15\text{mM}$ (а); $C_2/C_{\text{MeGr}}=0-8$, $C_{\text{MeGr}}=5\mu\text{M}$; $C_{\text{ДНК}}=0.3\text{mM}$ (b); в натрий-фосфатном буфере.

Молекулярное моделирование комплексов краситель-ДНК⁴

Для определения конформации соединений **2**, **3** и **4** в растворе была проведена квантово-механическая оптимизация молекул с использованием процедуры Мёллера-Плессета второго порядка и неявным учетом влияния растворителя. Результаты квантово-механического моделирования показаны на рисунке 28.

Для всех трех молекул бисстириловых красителей результаты, представленные на рисунке 28, указывают на возможность образования в растворе внутримолекулярных сэндвич-структур. Наиболее строго параллельное расположение стириловых фрагментов наблюдается в случае красителя **2**, а в остальных молекулах стириловые фрагменты смещены друг относительно друга. Это согласуется с экспериментальным фактом, что сигнал эксимерной флуоресценции наблюдается только в случае соединения **2**. Молекулярное моделирование также показало переход красителей от сэндвич-структуры к линейной в результате тепловых флуктуаций.

⁴ Экспериментальные данные получены в ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России к.х.н. Цветковым В.Б

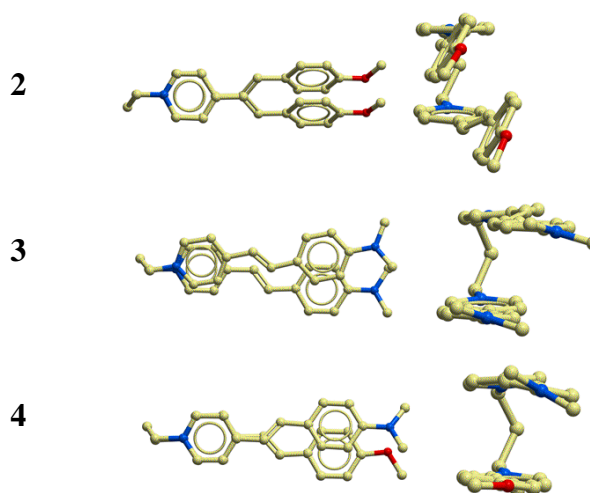


Рисунок 28. Конформации красителей **2**, **3** и **4**, полученные в результате квантово-механической оптимизации, где атомы окрашены следующим образом: углерод - желтым, азот - синим, кислород - красным; атомы водорода не показаны.

Моделирование комплексов соединений **2**, **3** и **4** с ДНК проводилось в два этапа. В качестве модели ДНК использовалась последовательность 5'-AACCGGTTACGTACGT-3'. Сначала с целью установления вероятной геометрии красителя на поверхности ДНК была проведена процедура докинга. При взаимодействии с ДНК все соединения располагаются в малой бороздке; наиболее вероятной была конформация, в которой стироловые фрагменты находятся в линейной форме.

Процедура докинга неявно оценивает влияние растворителя на механизм взаимодействия с ДНК, поэтому на втором этапе расчетов для уточнения результатов проводилось моделирование с использованием молекулярной динамики (МД) и в расчет были добавлены взаимодействия с молекулами растворителя. В расчетах исходные конформации для всех соединений были взяты не только в виде сэндвич-структур, но и в открытых линейных структурах. Исходные конформации располагались на расстоянии, практически исключающем взаимодействие лигандов с ДНК. Анализ данных моделирования показал, что первый плотный контакт с поверхностью ДНК во всех трех случаях происходит за счет сближения положительно заряженных пиридиновых колец. При взаимодействии соединения **2** в виде сэндвича с ДНК наблюдалось залегание в малую бороздку, а также первоначальный переход молекулы в линейную форму и последующее взаимодействие с ДНК. В случаях соединений **3** и **4** сэндвич-конформация сохранялась при встраивании в малую бороздку. На рисунке 29 показаны исходная и полученная на последнем этапе расчета конформации комплексов ДНК с **2**, **3** и **4**, когда исходная конформация бисстирилового красителя имела сэндвич-структуру.

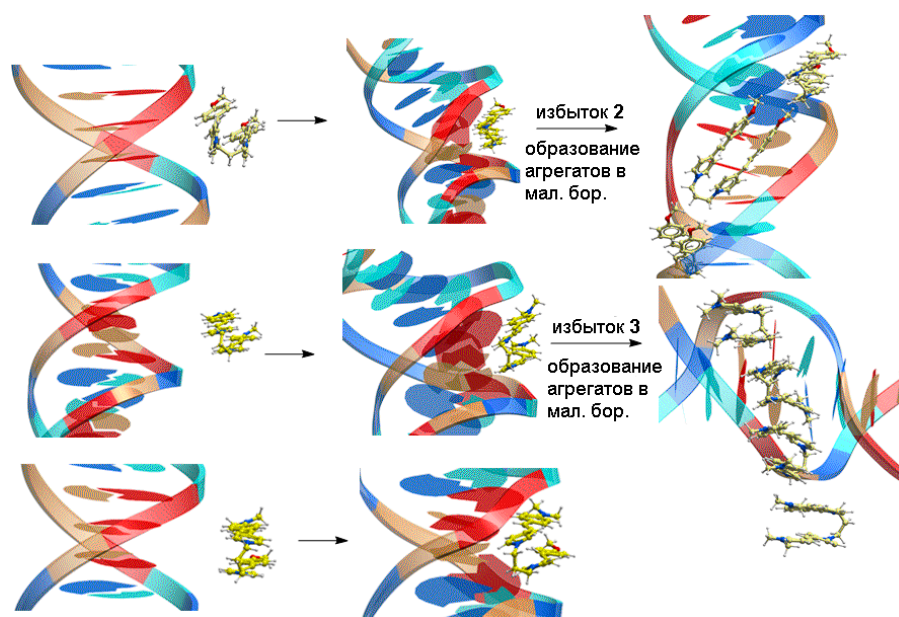


Рисунок 29. Исходные и полученные на последнем этапе расчеты (МД) конформации комплексов ДНК с **2**, **3** и **4** (исходные красители в сэндвич-форме).

Для определения возможности образования агрегатов в малой бороздке ДНК были проведены расчеты комплекса ДНК, образующегося в присутствии 50 молекул **2** и **3**. Для красителя **4** моделирование не проводилось, так как, согласно экспериментальным данным, для этого красителя процесс агрегации незначителен. Структура агрегатов в бороздке ДНК, образованной красителями в форме сэндвича, показана на рисунке 29. Для соединения **2** наиболее вероятно расположение молекул вдоль узкой бороздки таким образом, что пиридиновый сайт одного сэндвича примыкает к арильному фрагменту другого. Агрегаты, образованные красителями **3**, встраиваются в малую бороздку, перпендикулярную поверхности ДНК (Рисунок 29). Такой тип упаковки молекул обеспечивает более плотную упаковку и, как следствие, более сильное гидрофобное взаимодействие молекул с бороздкой ДНК.

На рисунке 30 показаны расчетные структуры димерных агрегатов, образованных красителями **2** и **3** в малой бороздке ДНК, где исходные красители **3** и **4** принимались в линейной форме, а краситель **2** в виде Н-димера.

Таким образом, согласно проведенным расчетам, исходные красители в водном растворе могут существовать в линейной и внутримолекулярной сэндвич-формах, а взаимодействие с ДНК может происходить как с одной, так и с другой формой красителей.

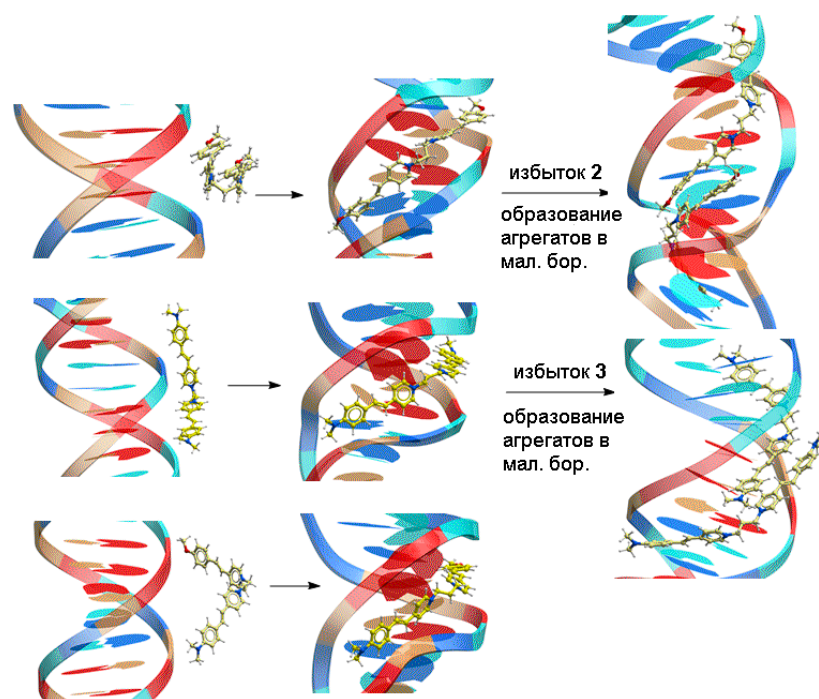


Рисунок 30. Исходные и полученные на последнем этапе расчеты (МД) конформации комплексов ДНК с **2**, **3** и **4** (исходные красители **3** и **4** в линейной форме, краситель **2** в виде Н-димера).

3.7. Комплексообразование красителей типа «голова к хвосту» **5**, **6** с ДНК тимуса теленка и РНК печени теленка

Как и при исследовании красителей типа «голова к голове» для установления факта взаимодействия бисстириловых красителей типа «голова к хвосту» с биомолекулами ДНК и РНК на первом этапе проводили спектрофотометрическое титрование в натрий-фосфатном буфере при $\text{pH} = 7$. Для красителя **5** при первых добавках ДНК наблюдалось уменьшение интенсивности полосы поглощения от О-хромофора и небольшое изменение полосы от N-хромофора (Рисунок 31а). Дальнейшее добавление ДНК привело к батохромному сдвигу и увеличению интенсивности обеих полос поглощения. При взаимодействии красителя **5** с РНК сначала наблюдалось уменьшение интенсивности обеих полос поглощения красителя, а затем, при дальнейшем увеличении концентрации РНК, полосы поглощения увеличивали свою интенсивность и батохромно сдвигались (Рисунок 31б). Для бисстирилового красителя **6** при взаимодействии с ДНК и РНК наблюдались аналогичные изменения. Уменьшение интенсивности полос поглощения может быть связано с перекрыванием электронных облаков комплекса хромофора и азотистых оснований ДНК [183]. Батохромный сдвиг полосы поглощения можно объяснить изменением локальной полярности вокруг красителя, поскольку из гидрофильной среды буфера краситель попадает в гидрофобную среду бороздки ДНК или кармана РНК, а энергетический зазор между НСМО и ВЗМО - орбиталями уменьшается [175].

Такие спектральные изменения подтверждают факт взаимодействия красителей с биомолекулами. Анализ данных спектрофотометрического титрования красителей **5** и **6** с тт-ДНК с использованием программы SpecFit-32 показал образование двух типов комплексов краситель-ДНК состава 1 : 1 и 1 : 2. Значения констант связывания этих комплексов приведены в таблице 7. Аналогичные результаты были получены при анализе данных спектрофотометрического титрования красителей **5** и **6** с пт-РНК, где также были обнаружены комплексы краситель-РНК 1 : 1 и 1 : 2. Следует отметить, что константы связывания комплексов краситель-ДНК и краситель-РНК одинаковой стехиометрии достаточно близки между собой (Таблица 7).

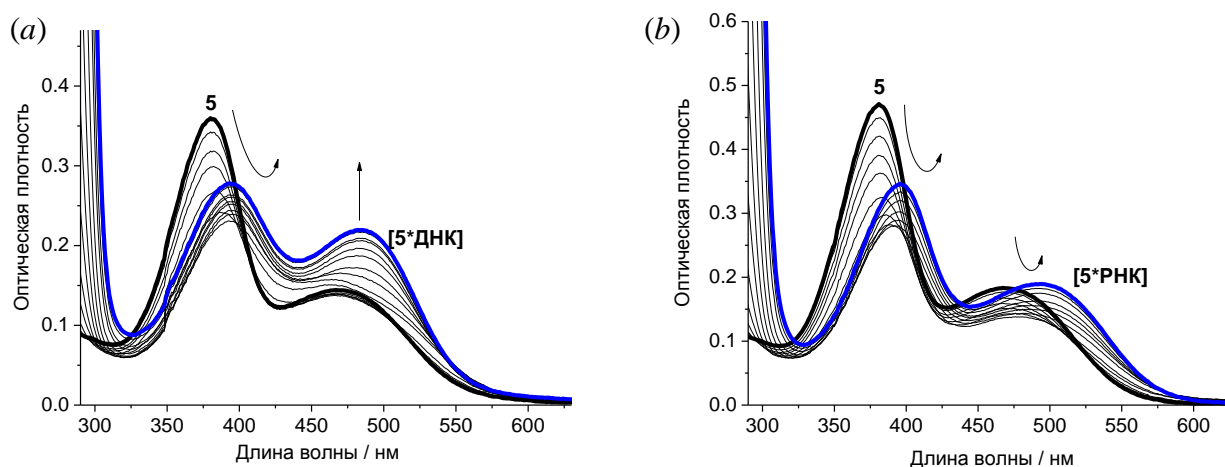


Рисунок 31. Спектрофотометрическое титрование бисстирилового красителя **5** с тт-ДНК (а) и пт-РНК (б), $C_{\text{ДНК}} / C_5 = 0-226$, $C_5 = 7.3 \mu\text{M}$ (а); $C_{\text{РНК}} / C_5 = 0-470$, $C_5 = 10 \mu\text{M}$ (б); в натрий-фосфатном буфере. Стрелками показано изменение интенсивности полос поглощения при добавлении тт-ДНК и пт-РНК.

Таблица 7. Основные характеристики спектров поглощения и флуоресценции соединений **5, 6** в комплексе с ДНК и РНК в натрий-фосфатном буфере.

Соединение в комплексе с биомолекулой	$\lambda_{\text{погл макс}}$, nm		$\lambda_{\text{фл макс}}$, nm		$\lg K_{11} / \lg K_{21}$	$\lg K_{11} / \lg K_{21}$	$\frac{\varphi_{\text{своб.}}}{\varphi_{\text{лиг+ДНК}}}$	$\frac{\varphi_{\text{своб.}}}{\varphi_{\text{лиг+РНК}}}$
	Компл. с ДНК	Компл. с РНК	Компл. с ДНК	Компл. с РНК	(ДНК)	(РНК)	(кратность разгорания флуор.), %	(кратность разгорания флуор.), %
	(2:1)	(2:1)	(2:1)	(2:1)				
5	393,	396,	598	612	5.26 / 9.04	4.68 / 8.03	0.12/18.2 (151)	0.12/2.8 (23)
	485	494						
6	392,	394,	615	620	5.35 / 9.48	4.96 / 8.16	0.08/9.5 (118)	0.08/2.9 (36)
	501	508						

В свободном виде красители **5, 6** демонстрируют низкие квантовые выходы флуоресценции, а при взаимодействии с ДНК или РНК эффективность флуоресценции

возрастает (Рисунок 32). При первых добавках ДНК/РНК наблюдалось слабое тушение коротковолновой полосы и интенсивный рост длинноволновой полосы N-хромофора. С увеличением концентрации ДНК/РНК интенсивность длинноволновой полосы флуоресценции многократно возрастала (Таблица 7). Такие изменения в спектре можно объяснить ограниченной подвижностью молекулы в комплексе с ДНК/РНК, что предотвращает фотоизомеризацию или образование ТИСТ-состояния и приводит к усилению флуоресценции. Стоит отметить, что при взаимодействии с ДНК наблюдается большее усиление флуоресценции (в 151 раз для **5** и 118 раз для **6**), чем при связывании с РНК (в 23 раза для **5** и 36 раз для **6**) (Рисунок 33, Таблица 7).

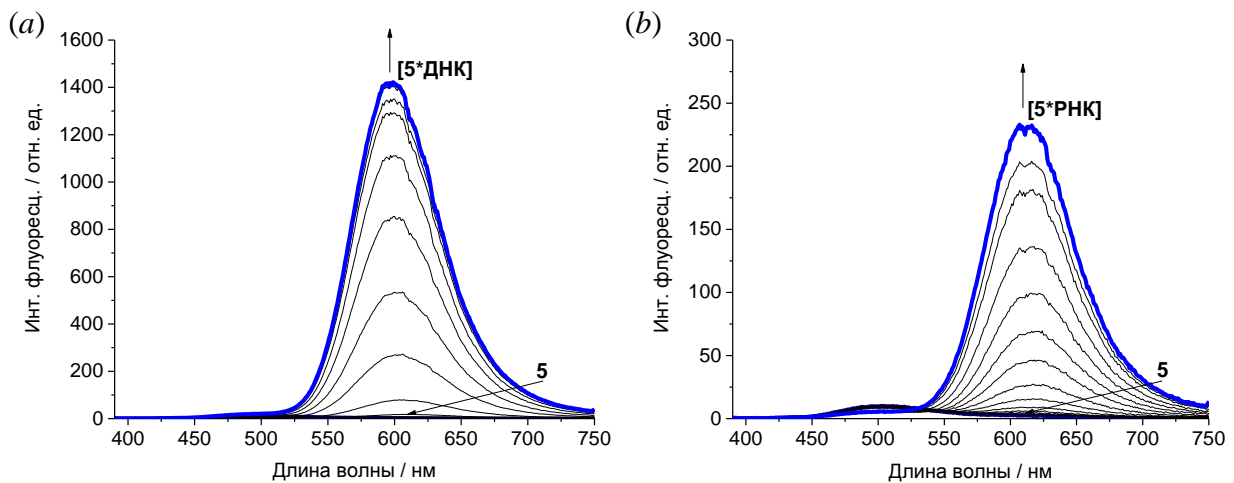


Рисунок 32. Флуориметрическое титрование бисстириловых красителей **5** тт-ДНК (а) и пт-РНК (b), $C_{\text{ДНК}} / C_5 = 0-226$, $C_5 = 7.3 \mu\text{M}$ (а); $C_{\text{РНК}} / C_5 = 0-470$, $C_5 = 10 \mu\text{M}$ (b); $\lambda_{\text{возб}} = 380 \text{ nm}$ в натрий-фосфатном буфере. Стрелками показано изменение интенсивности полос поглощения при добавлении тт-ДНК и пт-РНК.

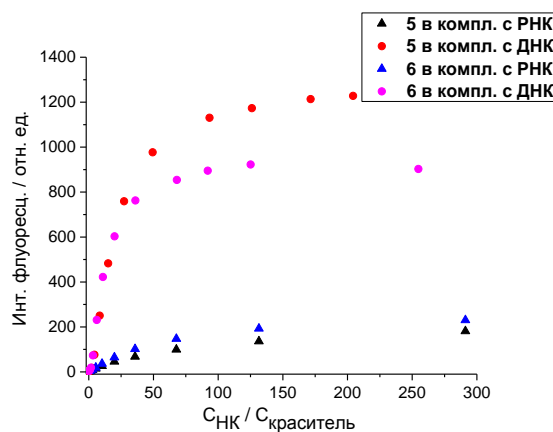


Рисунок 33. Сравнительный график изменения интенсивности флуоресценции в максимуме для красителей **5** и **6** при увеличении концентрации ДНК и РНК в натрий-фосфатном буфере.

Для установления механизма связывания лиганда с ДНК было проведено конкурентное титрование со стандартами связывания в малой бороздке – хёкстом и стандартом для большой бороздки - метиленовым зеленым. Добавление бисстирилового красителя **5** к комплексу (Хёкст)

- ДНК приводило к постепенному гашению флуоресценции комплекса со стандартом при 476 нм и увеличению интенсивности флуоресценции при 610 нм от комплекса ДНК с бисстириловым красителем **5** (Рисунок 34а). При добавлении красителя **5** к раствору комплекса (MeGr) – ДНК наблюдалось небольшое изменение интенсивности флуоресценции комплекса со стандартом при 680 нм (Рисунок 34б). Полученные результаты позволяют сделать вывод о связывании красителя путем залегания в малой бороздке ДНК. Для красителя **6** конкурентное титрование показало аналогичные результаты.

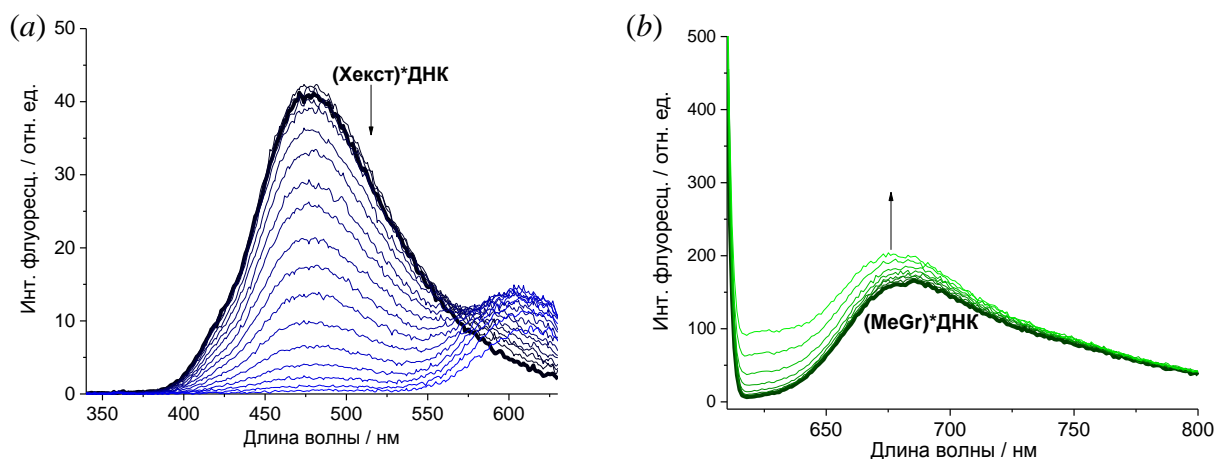


Рисунок 34. Флуориметрическое титрование комплекса Хекст-ДНК с бисстириловым красителем **5**, $C_5 / C_{\text{Хекст}} = 0-5$; $C_{\text{Хекст}} = 5 \mu\text{M}$; $C_{\text{ДНК}} = 0.15 \text{ mM}$, $\lambda_{\text{возб}} = 320 \text{ nm}$ (а); комплекса метиленовый зеленый - ДНК с бисстириловым красителем **5**, $C_5 / C_{\text{MeGr}} = 0-5$; $C_{\text{MeGr}} = 5 \mu\text{M}$; $C_{\text{ДНК}} = 0.3 \text{ mM}$, $\lambda_{\text{возб}} = 600 \text{ nm}$ (б) в натрий-фосфатном буфере. Стрелками показано изменение интенсивности флуоресценции при добавлении красителя.

Также взаимодействие красителей **5**, **6** с ДНК/РНК изучали методом спектроскопии кругового дихроизма. При добавлении красителя **5** к раствору ДНК сигнал от дц-ДНК изменялся слабо, но наблюдался постепенный рост двух полос с максимумами при 407 и 507 нм (Рисунок 35а). Такие изменения в спектре могут указывать на расположение лиганда в малой бороздке ДНК. В этом случае, поскольку в спектрах наблюдается небольшой отрицательный сигнал при 370 нм, возможна частичная межмолекулярная агрегация О-хромофоров вдоль бороздки ДНК. Несмотря на различия в структуре линкера для красителя **6** исследования КД показали аналогичные результаты.

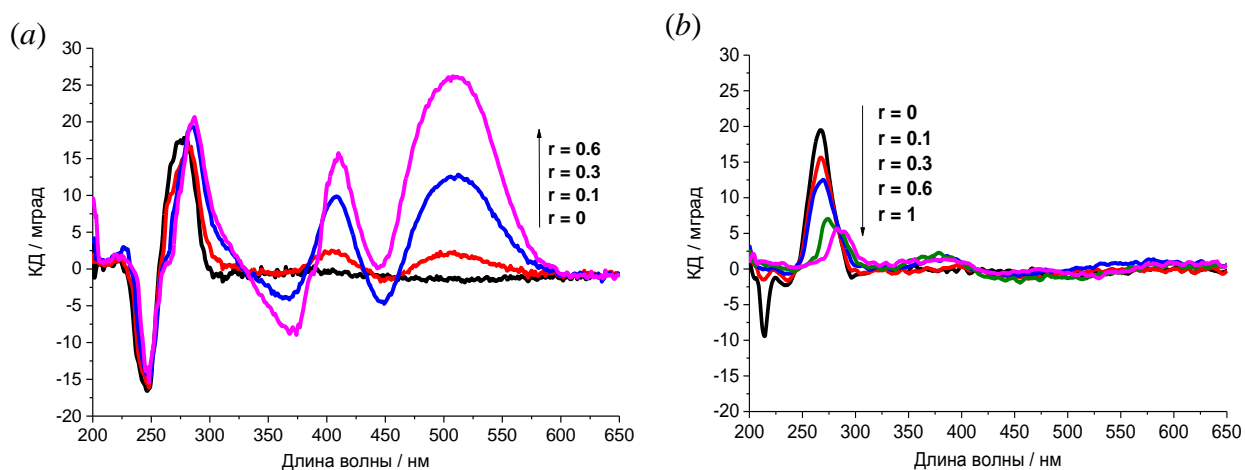


Рисунок 35. Спектры кругового дихроизма тт-ДНК (тт-ДНК = 0.1 мМ п.о.) (а) и пт-РНК (пт-РНК = 0.1 мМ п.о.) (б) в отсутствие и в присутствии бисстирилового красителя **5** при разных соотношениях (лиганд – нуклеиновая кислота): 0; 0.1; 0.3; 0.6 в натрий-фосфатном буфере. Стрелками показано изменение полос с увеличением концентрации красителя.

Спектр КД свободной РНК содержит интенсивный положительный сигнал на 265-275 нм и отрицательный пик около 240 нм (Рисунок 35b) [177]. При добавлении красителя **5** к раствору РНК до соотношения (лиганд : нуклеиновая кислота) = 1 : 1, наблюдалось одновременное уменьшение интенсивности и смещение положительного пика РНК в сторону более длинных волн, что соответствует интеркаляции соединения **5** между парами оснований РНК [184]. Аналогичные изменения в спектре КД РНК были обнаружены в присутствии красителя **6**. Таким образом, на основании проведённого исследования с использованием метода КД можно сделать вывод о различном способе связывания красителей **5** и **6** с ДНК и РНК.

ЯМР-спектроскопия - наиболее информативный метод изучения структуры комплекса краситель-ДНК. Поскольку природная ДНК тимуса телят имеет очень большую молекулярную массу, при которой трудно наблюдать какие-либо сигналы ^1H , для ЯМР-исследований мы использовали синтетический додекамер Дикерсона (ДД) [185]. ДД представляет собой хорошо изученную самокомплементарную 5'-C-G-C-G-A-A-T-T-C-G-C-G-3'-нуклеотидную последовательность, предполагающую конформацию В-ДНК в водном растворе. В наших оптических исследованиях краситель **5** проявил себя в качестве перспективного селективного флуорофора для дц-ДНК; поэтому мы исследовали его взаимодействие с ДД методом ЯМР-спектроскопии. Чтобы избежать агрегации избыточного количества красителя в бороздке ДНК, раствор ДНК титровали бисстириловым красителем **5**. Спектры ЯМР записывали при соотношении лиганд : ДНК 0.3 : 1; 0.6 : 1; 1 : 1 (Рисунок 36). При первом добавлении красителя к ДД наблюдалось небольшое уширение и смещение некоторых сигналов. При более внимательном рассмотрении спектра видно, что наиболее сильный сдвиг наблюдается для нуклеотидной последовательности Т7-Т8-С9-Г10. На спектре заметны сильные уширения иминных протонов нуклеотидов Т7 и Т8 и исчезновение сигнала NH от

нуклеотида G4 (комплементарного C9). В ароматической части спектра также наблюдались сдвиги протонных сигналов нуклеотидов T7 и C9. В области протонов от сахарного остатка наибольшее смещение наблюдалось для T8 и G10. При последующем добавлении красителя наблюдалось еще большее уширение всех сигналов, но дублетов в ароматической части спектра от самого красителя не было обнаружено. Полученные результаты позволяют предположить, что наиболее благоприятным сайтом связывания для красителя **5** является малая бороздка в диапазоне нуклеотидной последовательности T7-T8-C9-G10 (Рисунок 37). Для красителя **6** также были проведены ЯМР-исследования, но уже при первой добавке красителя (L : ДД = 0.3 : 1) наблюдалось сильное уширение сигналов ДНК, поэтому установить примерную локализацию лиганда не удалось.

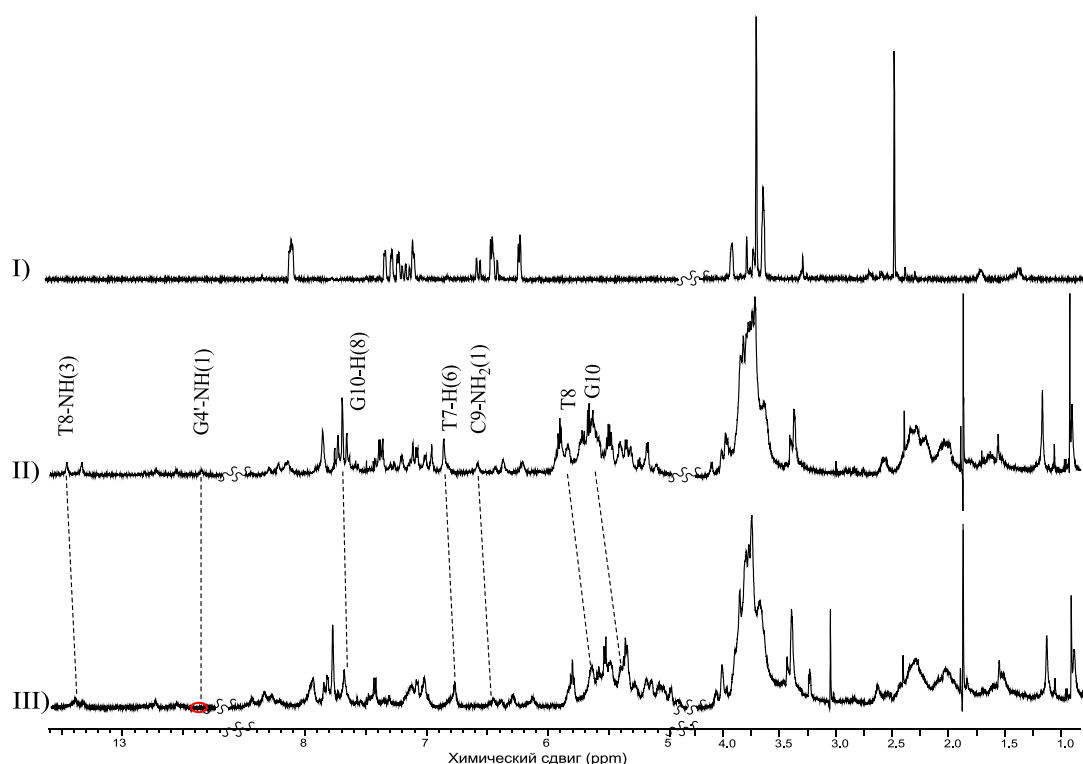


Рисунок 36. Фрагмент ^1H ЯМР-спектров в фосфатном буферном растворе 90% H_2O / 10% D_2O (600 МГц) для: бисстирилового красителя **5** (I), додекамера Дикерсона (ДД) (II), L: ДД = 0.3 : 1 смесь (III).

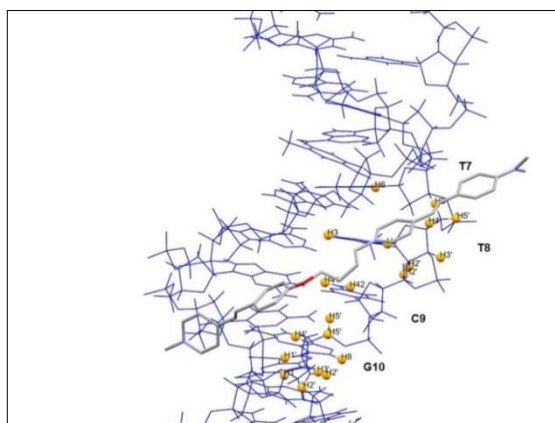


Рисунок 37. Предполагаемая локализация красителя **5** в структуре додекамера Дикерсона.

Эксперименты по клеточной визуализации⁵

Для определения локализации красителей в клетке соединения **5**, **6** инкубировали с фиксированными клетками A549. На рисунке 38 показаны изображения конфокальной флуоресцентной микроскопии фиксированных клеток A549, обработанных 5 μM растворами красителей **5** (a), **6** (b). На рисунке 38a видно, что в случае бисстирилового красителя **5** наблюдается сильный и яркий флуоресцентный сигнал в определенных областях ядра. Наиболее яркое окрашивание наблюдается в области ядра, но также и в цитоплазме клетки. Накопление красителя **6** в ядре при той же концентрации намного меньше, при этом наблюдается большее распределение в цитоплазме клетки (Рисунок 38b). Стоит также отметить, что флуоресценция, возникающая в цитоплазме при добавлении красителя **6**, имеет меньшую яркость.



Рисунок 38. Изображения конфокальной флуоресцентной микроскопии фиксированных клеток A549 после инкубации с красителями **5** (a) и **6** (b), $\lambda_{\text{возб}} = 405 \text{ нм}$. Метка - 10 μm . Клетки инкубировали с красителями **5** и **6** (5 μM) в течение 15 мин.

Для подтверждения специфичности связывания красителей **5** и **6** с РНК или ДНК в клетках были проведены эксперименты на расщепление дезоксирибонуклеазой (ДНКазой) и рибонуклеазой (РНКазой) [186,187]. В исследовании с ДНКазой в клетках гидролизуются только субстраты ДНК, тогда как при использовании РНКазы гидролизуются только субстраты РНК. Также в эксперименте использовали фиксированные клетки A549, а краситель DAPI (который селективно связывается с ДНК) был выбран в качестве контроля [188].

Как и ожидалось, в результате обработки РНКазой клеток окрашенных красителем **5** (Рисунок 39), в ядрах клеток не было обнаружено существенного уменьшения флуоресценции. Напротив, после обработки ДНКазой первоначально интенсивный сигнал флуоресценции в ядрах, окрашенных красителем **5**, резко исчезает (Рисунок 39). Подобное поведение также наблюдалось в контрольном исследовании с DAPI DNaselect. Эти результаты, очевидно, указывают на то, что усиленный сигнал флуоресценции возникает в результате взаимодействия красителя **5** с ДНК в ядрах клеток A549. Как было показано выше, краситель **5** также способен связываться с РНК, но флуоресцентный ответ при этом слабее, чем наблюдаемый при

⁵ Экспериментальные данные получены в ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России Чмелюк Н.С. и к.х.н. Абакумовым М.А.

связывании с ДНК. Поэтому заметного изменения интенсивности флуоресценции в тесте на расщепление РНКазой обнаружено не было. Для красителя **6** не наблюдалось значительных изменений после обработки ДНКазой и РНКазой (Рисунок 39), поэтому можно сделать вывод, что связывание с ДНК/РНК слабо влияет на флуоресцентные свойства красителя.

Также было показано, что исследуемые красители в использованной концентрации нетоксичны для живых клеток А549 (Рисунок 40).

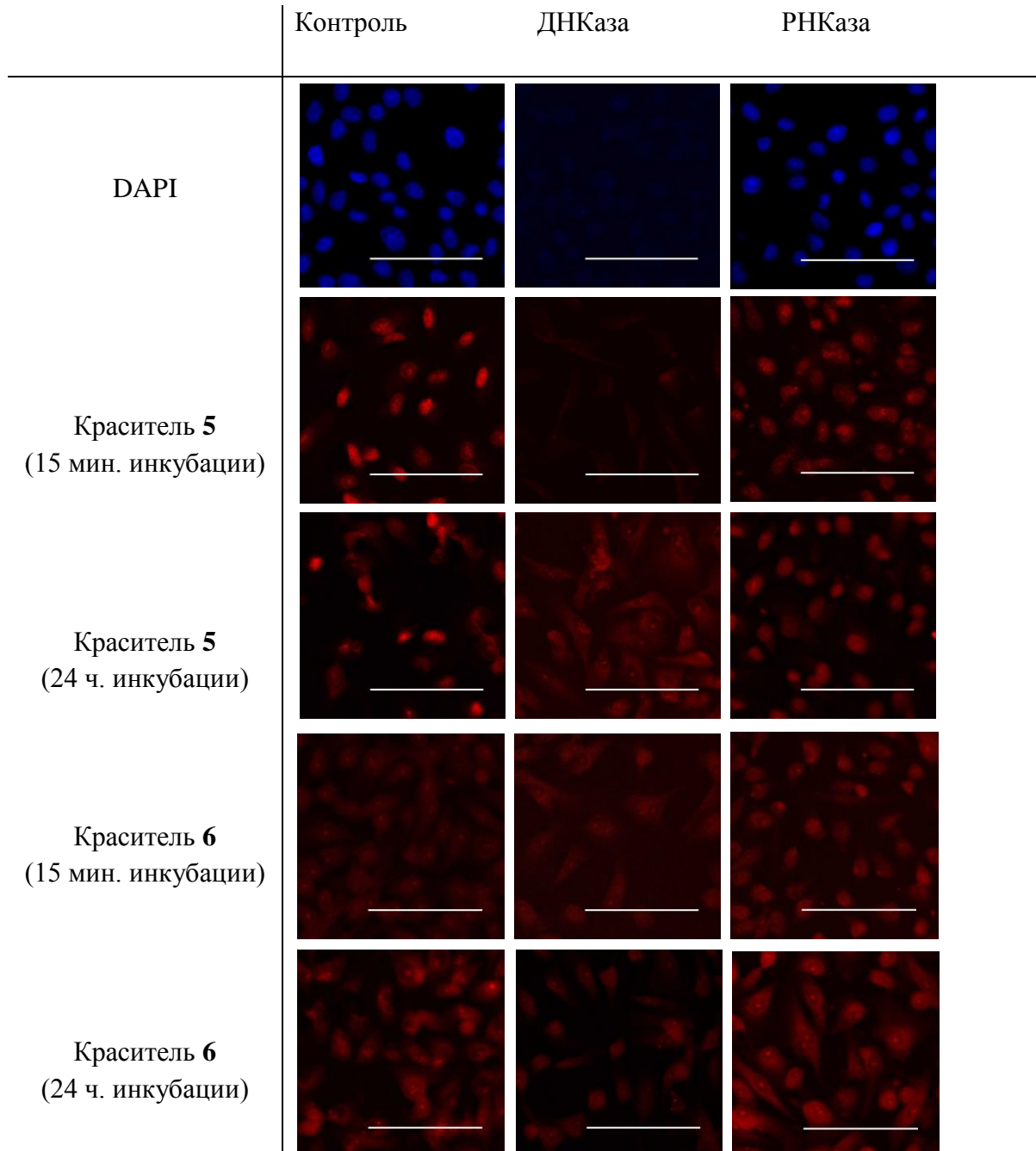


Рисунок 39. Изображения конфокальной флуоресцентной микроскопии фиксированных клеток А549 после инкубации с красителями и обработки ДНКазой и РНКазой, $\lambda_{\text{возб}} = 405$ нм. Метка - 100 μm . Клетки инкубировали с красителями **5** и **6** (5 μM) в течение 15 мин и 24 ч.

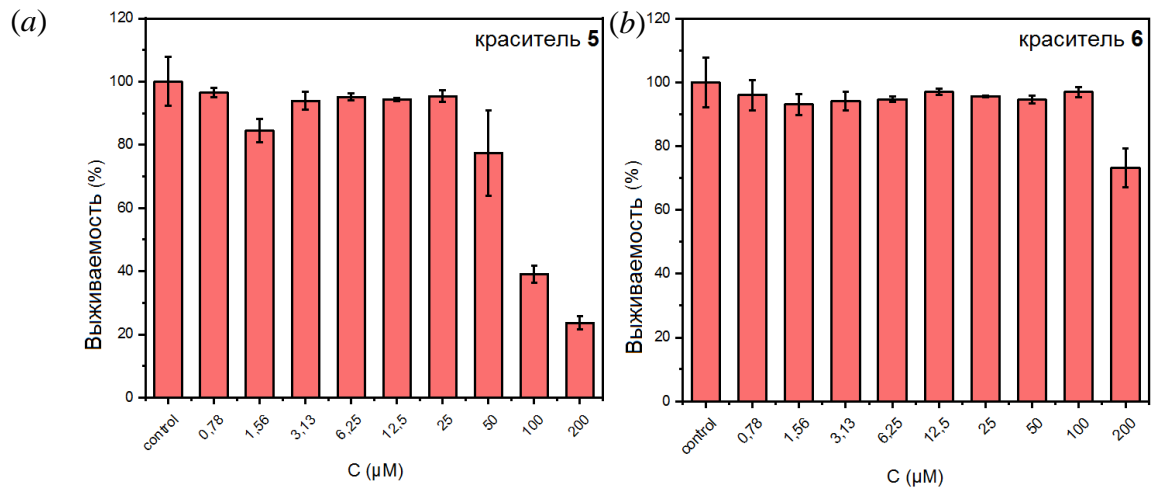


Рисунок 40. Выживаемость клеток A549 *in vitro* после 48 ч инкубации с разными концентрациями красителей **5** (a) и **6** (b).

4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C были зарегистрированы на спектрометрах Avance 400 и фирмы Bruker и Varian Inova 400 с использованием ампул диаметром 5 мм. Химические сдвиги для ядер ^1H и ^{13}C определялись с точностью 0.01 м.д. относительно остаточных сигналов растворителя и пересчитаны к внутреннему стандарту (TMS). Значения констант спин-спинового взаимодействия определялись с точностью 0.1 Гц. В качестве растворителей использовались $\text{DMCO-}d_6$, CD_3CN , CDCl_3 , D_2O . Для отнесения сигналов в спектрах ЯМР использовались двумерные методики gs-HSQC, gs-HMBS и gs-COSY с импульсными полевыми градиентами. Для структурных отнесений были использованы фазочувствительные gs-NOESY 2D-методики.

Контроль за ходом реакций осуществляли методом ТСХ на пластинках DC- Fertigfolien ALUGRAM 60 UV254 производства фирмы «Macherey-Nagel» и DC-Alufolien Aluminiumoxid 60 F254 neutral производства фирмы «Merck».

Для колоночной хроматографии применялась силикагель Silicagel 60 с размером частиц 0.045-0.100 мм и нейтральный оксид алюминия (Brockmann I, 50-200 мкм) производства фирмы «Acros Organics».

Температуры плавления измеряли в капиллярах на приборе Mel-temp II и не корректировали.

Элементный анализ был проведен в лаборатории микроанализа ИНЭОС им. А. Н. Несмеянова РАН.

Масс-спектры с ионизацией при электрораспылении (метод ИЭР) были получены на масс-спектрометре «Agilent 1100» серии LC/MSD с прямым вводом образца в область ионизации. Для снятия спектров использовались растворы исследуемых соединений в метаноле и воде с концентрацией 10^{-6} – $2 \cdot 10^{-5}$ М. Оптимальная скорость потока 400 мкл/ч. Потенциалы ионизации на входе и выходе были постоянны и составляли 3.5 кВ и 10 кВ, соответственно. Температура газовой фазы 150°C . Расчет изотопного состава комплексов производился с помощью Molecular Weight Calculator, Version 6.37 [Matthew Monroe, Molecular Weight Calculator, Version 6.37].

Электронные спектры поглощения измерялись на двухканальном спектрофотометре Varian-Cary 300. Регистрация спектров электронного поглощения при непрерывном облучении образцов проводилась с помощью высокоскоростного оптоволоконного спектрометра «AvaSpec-2048-USB2, Avantes BV».

Спектры флуоресценции были записаны на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse и FluoroLog-3-221 при температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$ в кварцевых кюветах ($l = 10$ мм). Наблюдаемая флуоресценция детектировалась под прямым углом относительно пучка возбуждения. Спектры флуоресценции были скорректированы по отношению к чувствительности измеряющего

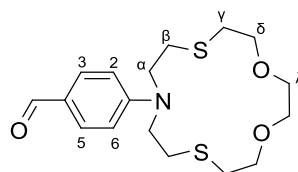
фотоэлектронного умножителя. Для снятия спектров поглощения и флуоресценции использовались спектроскопически чистые растворители фирм Aldrich, J.T.Baker и Acros. Приготовление растворов и все эксперименты с фоточувствительными соединениями проводились в темной комнате при красном свете.

Спектры кругового дихроизма регистрировались на автоматическом записывающем дихрографе СКД-2МУФ, при помещении исследуемых растворов в прямоугольную кювету размером 10 мм в кюветном отсеке прибора запись производилась со скоростью 20 нм/мин и со стандартной чувствительностью в разных диапазонах длин волн.

Исходные реагенты 2,2'-(этан-1,2-диилбис(окси))диэтантол, 4-(бис(2-хлорэтил)амино)бензальдегид, *n*-бис(бромометил)бензол, 4-метоксибензальдегид, 4-(диметиламино)бензальдегид, 1,3-дибромпропан, 1,4-дибромбутан, 4-гидроксибензальдегид, пиперидин, метилиодид, 3-бром-1-пропин, *N,N,N'N'*-тетраметилпропан-1,3-диамин, 1,4-диазабицикло[2.2.2]октан, карбонат цезия, карбонат калия, гидроксид калия, иодид меди являются коммерчески доступными препаратами (фирмы Aldrich, Acros и др) и были использованы без дополнительной очистки. Тозилат 1,4-диметилпиридиния и 4-пиколин, 2,3,5,6,8,9,11,12октагидробензо[*b*][1,4,7,10,13] пентаоксацикло-пентадецин-15-карбальдегид были синтезированы в лаборатории ранее. Использувавшиеся растворители ДМФА, хлороформ, дихлорметан, этилацетат, этанол, метанол, толуол, ацетонитрил, 2-этоксиэтанол также являются коммерчески доступными.

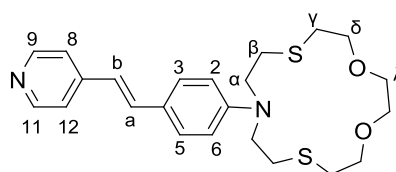
Использованные в работе соли $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ и $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ высушивали в вакууме при 240°C до постоянной массы. NaClO_4 , AgClO_4 , $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$, LiClO_4 , $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ использовались в виде кристаллогидратов.

4.1. Синтез соединений

4-(1,4-Диокса-7,13-дитиа-10-азациклопентадекан-10-ил)бензальдегид (9)

Взято из литературы [189]. К раствору EtOH (300 мл) и H₂O (300 мл) добавляли Cs₂CO₃ (9.3 г, 0.028 моль). Раствор доводили до кипения и далее в течение часа медленно прикапывали смесь 2,2'-(этан-1,2-диилбис(окси))диэтантиола (1.14 г, 6.25 ммоль) и 4-(бис(2-хлорэтил)амино)бензальдегида (1.4 г, 5.7 ммоль) в 75 мл EtOH. Реакционную смесь выдерживали при перемешивании при 60 °С в течение 24 ч. Затем растворитель упаривали, а к остатку добавляли 40 мл H₂O. Продукты реакции экстрагировали этилацетатом, органическую фракцию упаривали, а остаток очищали методом колоночной хроматографии на SiO₂ в системе гексан-этилацетат 1:2.

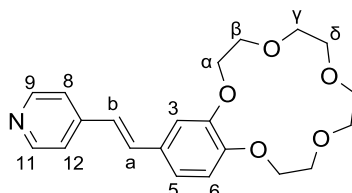
Выход соединения **9** 1 г (47%), т.пл. 85-87 °С (лит. [189]: т.пл. 86 °С). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ м.д., J Гц): 2.78 (т, 4Н, Н-β, J=4.6), 2.92 (т, 4Н, Н-γ, J=7.5), 3.66 (с, 4Н, Н-λ), 3.74 (т, 4Н, Н-δ, J=7.5), 3.82 (т, 4Н, Н-α, J=4.6), 6.68 (д, 2Н, Н-2, Н-6, J=8.3), 7.73 (д, 2Н, Н-3, Н-5, J=8.3), 9.74 (с, 1Н, СН=О).

(E)-10-(4-(2-(пиридин-4-ил)винил)фенил)-1,4-диокса-7,13-дитиа-10-азациклопента-декан (10)

Адаптировано из лит. [159]. Смесь 4-пиколина (0.078 г, 0.84 ммоль) и соединения **9** (0.15 г, 0.42 ммоль) растворяли в уксусном ангидриде (0.946 мл). К реакционной смеси добавляли 0.075 мл уксусной кислоты и 0.037 мл пиперидина и выдерживали в инертной атмосфере при температуре 130 °С в течение 6 ч. Затем реакционную массу охлаждали, промывали слабым 10%-ным водным раствором КОН и дистиллированной H₂O до pH = 7. Продукты реакции экстрагировали этилацетатом, органическую фракцию упаривали, а остаток очищали методом колоночной хроматографии на SiO₂ в системе дихлорметан – метанол с использованием градиентного элюирования (1:0→10:1).

Выход соединения **10** 0.06 г (33%). ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ м.д., J Гц): 2.73 (т, 4Н, Н- γ , $J = 5.2$), 2.81 (т, 4Н, Н- β , $J = 7.4$), 3.57 (с, 4Н, Н- λ), 3.61 (м, 4Н, Н- α), 3.70 (м, 4Н, Н- δ), 6.63 (д, 2Н, Н-3', Н-5', $J = 8.8$), 6.93 (д, 1Н, Н- b , $J_{trans} = 16.3$), 7.42 (д, 1Н, Н- a , $J_{trans} = 16.5$), 7.49 (м, 4Н, Н-3, Н-5, Н-2', Н-6'), 8.45 (д, 2Н, Н-2, Н-6, $J = 5.9$).

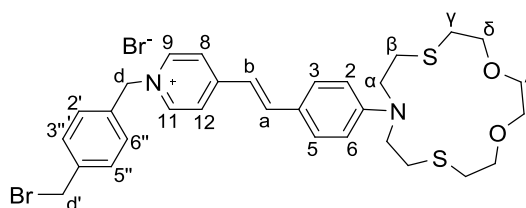
(E)-4-(2-(2,3,5,6,8,9,11,12-октагидробензо[b][1,4,7,10,13]пентаоксациклопентадецин-15-ил)винил)пиридин (11)



Адаптировано из лит [190]. Смесь 4-пиколина (0.98 мл, 10 ммоль) и 2,3,5,6,8,9,11,12октагидробензо[b][1,4,7,10,13]пентаоксацикло-пентадецин-15-карбальде-гида (0.59 г, 2 ммоль) растворяли в 20 мл сухого ДМФА, к полученному раствору добавляли *t*-BuOK и оставляли при перемешивании при комнатной температуре на 24 часа. Затем к реакционной смеси добавляли 30 мл дистиллированной воды, экстрагировали хлороформом, органический экстракт промывали дистиллированной водой до pH=6, растворитель упаривали, промывали петролейным эфиром и высушивали на фильтре.

Выход соединения **11** 0.3 г (40%), т. пл. 112-114 °С (лит. [190]: т.пл. 112-114 °С). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3 , δ м.д., J Гц): 3.79 (м, 8Н, Н- δ , Н- γ), 3.96 (м, 4Н, Н- β), 4.2 (м, 4Н, Н- α), 6.88 (д, 1Н, Н- a , $J_{trans} = 16.2$), 6.90 (д, 1Н, Н-6, $J = 8.9$), 7.10 (д, 1Н, Н-5, $J = 8.9$), 7.11 (с, 1Н, Н-3), 7.24 (д, 1Н, Н- b , $J_{trans} = 16.2$), 7.35 (д, 2Н, Н-8, Н-12, $J = 5.8$), 8.56 (д, 2Н, Н-9, Н-11, $J = 5.9$).

(E)-4-(4-(1,4-диокса-7,13-дитиа-10-азациклопентадекан-10-ил)стирил)-1-(4-(бромометил)бензил)пиридиния бромид (12)

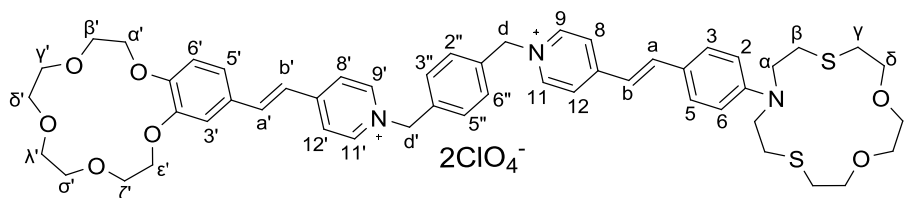


Взято из литературы [159]. К раствору *n*-бис(бромометил)бензола (0.108 г, 0.408 ммоль) в MeCN постепенно прикапывали раствор соединения **11** (0.088 г, 0.204 ммоль) в MeCN при постоянном перемешивании при 82 °С в инертной атмосфере. После окончания прикапывания

смесь выдерживали 5 ч при перемешивании при 82 °С. Затем растворитель упаривали, остаток промывали гексаном, этилацетатом и высушивали.

Выход соединения **12** 0.06 г (43%). ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆, δ м.д., *J* Гц): 2.75 (т, 4Н, Н-γ, *J* = 5.0), 2.83 (т, 4Н, Н-β, *J* = 7.3), 3.57 (с, 4Н, Н-λ), 3.69 (м, 8Н, Н-α, Н-δ), 4.71 (с, 2Н, Н-d'), 5.65 (с, 2Н, Н-d), 6.72 (д, 2Н, Н-2, Н-6, *J* = 8.5), 7.17 (д, 1Н, Н-a, *J*_{trans} = 16.0), 7.36-7.60 (м, 6Н, Н-2'', Н-3'', Н-5'', Н-6'', Н-3, Н-5), 7.92 (д, 1Н, Н-b, *J*_{trans} = 16.8), 8.08 (д, 2Н, Н-8, Н-12, *J* = 6.9), 8.86 (д, 2Н, Н-9, Н-11, *J* = 6.9).

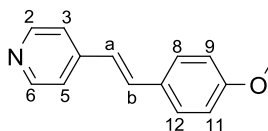
4-(4-(1,4-Диокса-7,13-дитиа-10-азациклопентадекан-10-ил)стирил)-1-(4-((*E*)-2-(2,3,5,6,8,9,11,12-октагидробензо[*b*][1,4,7,10,13]пентаоксациклопентадецин-15-ил винил)пиридиний-1-ил)метил)бензил)пиридиния перхлорат (1**)**



Взято из литературы [159]. Смесь моностирилового красителя **12** (0.06 г, 0.086 ммоль) и соединения **11** (0.0417 г, 0.112 ммоль) растворяли в сухом ацетонитриле. Реакционную массу выдерживали в инертной атмосфере при кипячении и перемешивании 7 ч. Реакционную массу охлаждали, растворитель упаривали. Полученный остаток растворяли в EtOH и добавляли расчетное количество концентрированного раствора NaClO₄ для замены противоиона на перхлорат. Выпавший осадок промывали спиртом и высушивали на фильтре.

Выход соединения **1** 0.046 г (49%), т.пл. 131-134 °С (лит. [159]: т.пл. 133-136 °С). ¹Н ЯМР (400 МГц, CD₃CN, δ м.д., *J* Гц): 2.74 (т, 4Н, Н-γ, *J* = 5.1), 2.88 (т, 4Н, Н-β', Н-ζ', *J* = 7.7), 3.60 (с, 4Н, Н-λ), 3.62-3.73 (м, 16Н, Н-γ', Н-δ', Н-λ', Н-σ', Н-α, Н-δ), 3.82 (м, 4Н, Н-β', Н-ζ'), 4.15 (м, 4Н, Н-α', Н-ε'), 5.54 (с, 2Н, Н-d), 5.60 (с, 2Н, Н-d'), 6.73 (д, 2Н, Н-2, Н-6, *J* = 8.9), 7.00 (д, 1Н, Н-6', *J* = 8.3), 7.04 (д, 1Н, Н-a, *J*_{trans} = 16.0), 7.24 (д, 1Н, Н-a', *J*_{trans} = 16.2), 7.27 (дд, 1Н, Н-5', *J* = 8.2, *J* = 1.8), 7.31 (д, 1Н, Н-3', *J* = 1.8), 7.48 (м, 4Н, Н-2'', Н-3'', Н-5'', Н-6''), 7.55 (д, 2Н, Н-3, Н-5, *J* = 8.9), 7.74 (д, 1Н, Н-b, *J*_{trans} = 16.0), 7.76 (д, 1Н, Н-b', *J*_{trans} = 16.2), 7.84 (д, 2Н, Н-8, Н-12, *J* = 7.0), 7.95 (д, 2Н, Н-8', Н-12', *J* = 6.9), 8.37 (д, 2Н, Н-9, Н-11, *J* = 6.9), 8.50 (д, 2Н, Н-9', Н-11', *J* = 6.8).

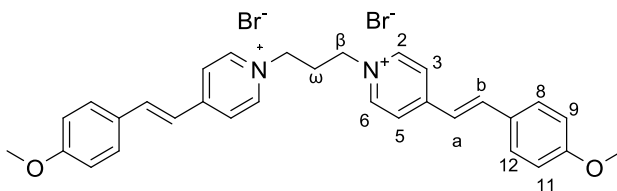
(*E*)-4-(4-метоксистирил)пиридин (13**)**



Взято из литературы [191]. Смесь 4-метоксибензальдегида (0.3 г, 2.2 ммоль) и 4-пиколина (0.205 г, 2.2 ммоль) растворяли в 3 мл сухого ДМФА. В реакционную массу добавляли *t*-BuOK (0.37 г, 3.3 ммоль), нагревали до 70 °С и выдерживали при перемешивании в течение 15 часов. Затем реакционную массу охлаждали и добавляли 20 мл воды. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой и сушили.

Выход соединения **13** 0.31 г (68%), т.пл. 94-96 °С (лит.[191]: т.пл. 95 °С). ¹Н ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ м.д., *J* Гц): 3.85 (с, 3Н, OCH₃), 6.89 (д, 1Н, Н-*b*, *J*_{trans}=16.3), 6.93 (д, 2Н, Н-9, Н-11, *J*=8.8), 7.27 (д, 1Н, Н-*a*, *J*_{trans}=16.8), 7.34 (д, 2Н, Н-3, Н-5, *J*=5.2), 7.49 (д, 2Н, Н-8, Н-12, *J*=8.4), 8.56 (д, 2Н, Н-2, Н-6, *J*=5.2).

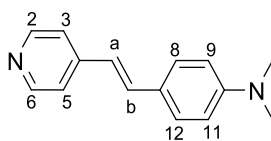
(*E*)-1,1'-(пропан-1,3-диил)бис(4-(4-метоксистирил)пиридиний) бромид (**2**)



Смесь (*E*)-4-(4-метоксистирил)пиридина (**13**) (0.1 г, 0.47 ммоль) и 1,3-дибромпропана (0.048 г, 0.235 ммоль) растворяли в ДМФА и выдерживали при 80 °С и перемешивании в течение 10 часов. Затем к реакционной массе приливали 10 мл этилацетата, убирали на ночь в холодильник, выпавший осадок отфильтровывали и сушили.

Выход соединения **2** 0.052 г (36%), т.пл. 256-258 °С. ¹Н ЯМР (400 МГц, CD₃CN, δ м.д., *J* Гц): 2.67 (м, 2Н, Н-ω), 3.84 (с, 6Н, OCH₃), 4.68 (т, 4Н, Н-β, *J* = 6.9, 6.8), 7.01 (д, 4Н, Н-9, Н-11, *J* = 8.8), 7.21 (д, 2Н, Н-*b*, *J*_{trans} = 16.2), 7.66 (д, 4Н, Н-8, Н-12, *J* = 8.8), 7.81 (д, 2Н, Н-*a*, *J*_{trans} = 16.2), 7.98 (д, 4Н, Н-3, Н-5, *J* = 6.9), 8.77 (д, 4Н, Н-2, Н-6, *J* = 6.9). ¹³С ЯМР (101 МГц, CD₃CN, δ / м.д.): 32.0 (С-ω), 55.3 (СН₃) 56.7 (С-β), 114.6 (С-9, С-11), 120.2 (С-*b*), 123.7 (С-3, С-5), 127.4(С-7), 130.2 (С-8, С-12), 141.8 (С-*a*), 143.9 (С-2, С-6), 154.6 (С-4), 162.0 (С-10). Найдено (%): С, 59.65; Н, 5.12; N, 4.45. С₃₁Н₃₂Вr₂Н₂О₂. Вычислено (%): С, 59.63; Н, 5.17; N, 4.49. Масс-спектр раствора **2** в Н₂О (ИЭР), вычислено *m/z*: 232.3; найдено *m/z*: 232.9 [**2**]²⁺. Спектральные данные полностью согласуются с данными, приведенными в лит. [192].

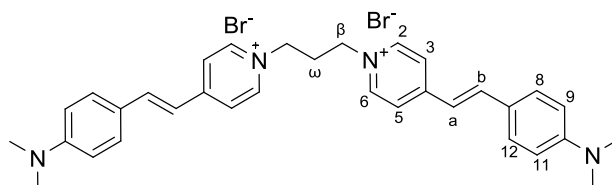
(*E*)-4-(4-диметиламино)стирил)пиридин (**14**)



Взято из литературы [193]. Смесь 4-пиколина (0.65 мл, 6.6 ммоль), 4-диметиламинобензальдегида (0.5 г, 3.3 ммоль) и гидроксида калия (0.196 г, 3.5 ммоль) нагревали при перемешивании и выдерживали при 125 °С в течение 2-х часов. Затем реакционную массу охлаждали и добавляли 20 мл воды. Выпавший осадок отфильтровывали и промывали водой и этилацетатом.

Выход соединения **14** 0.159 г (30%), т.пл. 240-243 °С (лит.[191]: т.пл. 245-246 °С). ¹Н ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ м.д., J Гц): 3.02 (с, 6Н, N(CH₃)₂), 6.72 (д, 2Н, Н-9, Н-11, J=7.8), 6.81 (д, 1Н, b, J_{trans}=16.4), 7.25 (д, 1Н, Н-а, J_{trans}=15.7), 7.33 (д, 2Н Н-3, Н-5, J=6.0), 7.45(д, 2Н, Н-8, Н-12, J=7.8), 8.52 (д, 2Н, Н-2, Н-6, J=6.0).

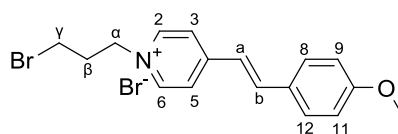
(E)-1,1'-(пропан-1,3-диил)бис(4-(4-(диметиламино)стирил)пиридиний) бромид (3)



Смесь (E)-4-(4-диметиламино)стирил)пиридина (**14**) (0.1 г, 0.45 ммоль) и 1,3-дибромпропана (0.045 г, 0.223 ммоль) растворяли в ДМФА и выдерживали при 80 °С и перемешивании 10 часов. Затем к реакционной массе приливали 10 мл этилацетата, убирали на ночь в холодильник, выпавший осадок отфильтровывали и сушили.

Выход соединения **3** 0.048 г (33 %), т. пл. 160-164 °С (лит. [160]: т.пл. 157-162 °С, лит. [194]: т.пл. 184 °С). ¹Н ЯМР (400 МГц, CD₃CN, δ м.д., J Гц): 2.55 (м, 2Н, Н-ω), 3.04 (с, 12Н, N(CH₃)₂), 4.44 (т, 4Н, Н-β, J = 7.6, 7.3), 6.76 (д, 4Н, Н-9, Н-11, J = 8.9), 7.02 (д, 2Н, Н-b, J_{trans} = 16.2), 7.57 (д, 4Н, Н-8, Н-12, J = 8.9), 7.77 (д, 2Н, Н-а, J_{trans} = 15.9), 7.85 (д, 4Н, Н-3, Н-5, J = 6.9), 8.33 (д, 4Н, Н-2, Н-6, J = 6.7). ¹³С ЯМР (101 МГц, CD₃CN, δ / м.д.): 31.2 (С-ω), 39.0 (СН₃), 56.2 (С-β), 111.6 (С-9, С-11), 116.2 (С-b), 122.0 (С-7), 122.4 (С-3, С-5), 130.2 (С-8, С-12), 142.7 (С-2, С-6), 143.1 (С-a), 152.4 (С-4), 154.9 (С-10). Найдено (%): С, 60.98; Н, 5.84; N, 8.58. C₃₃H₃₈Br₂N₄. Вычислено (%): С, 60.93; Н, 5.89; N, 8.61. Масс-спектр раствора **3** в Н₂О (ИЭР), вычислено m/z: 245.34; найдено m/z: 245.3 [**3**]²⁺.

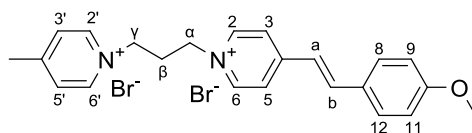
(E)-1-(3-бромпропил)-4-(4-метоксистирил)пиридиния бромид (15)



Смесь (E)-4-(4-метоксистирил)пиридина (**13**) (0.2 г, 0.947 ммоль) и 1,3-дибромпропана (1.915 г, 9.47 ммоль) растворяли в ДМФА и выдерживали при 80 °С и перемешивании в течение 18 часов. Растворитель упаривали на роторном испарителе. Чистый продукт выделяли методом колоночной хроматографии на нейтральном Al₂O₃ в системе дихлорметан – метанол с использованием градиентного элюирования (1:0→10:1).

Выход соединения **15** 0.226 г (56%). ¹H ЯМР (600 МГц, CD₃CN, δ м.д., J Гц): 2.43 (м., 2H, H-β); 3.69 (т, 2H, H-γ, J=6.4, 6.2), 3.84 (с, 3H, OCH₃), 4.68 (т, 2H, H-α, J=7.1, 7.1), 7.01 (д, 2H, H-9, H-11, J=8.7), 7.26 (д, 1H, H-a, J_{trans}=16.2), 7.69 (д, 2H, H-8, H-12, J=8.5), 7.88 (д, 1H, H-b, J_{trans}=16.2), 8.05 (д, 2H, H-3, H-5, J=6.4), 8.8 (д, 2H, H-2, H-6, J=6.4). ¹³C ЯМР (125 МГц, CD₃CN, δ / м.д.): 32.8 (C-β), 40.8 (C-γ), 54.9 (OCH₃), 57.3 (C-α), 114.3 (C-9, C-11), 120.1 (C-a), 123.4 (C-3, C-5), 127.5(C-7), 129.8 (C-8, C-12), 141.2 (C-b), 143.8 (C-2, C-6), 154.2 (C-4), 161.6 (C-10). Найдено (%): С, 49.51; Н, 4.53; N, 3.43. С₁₇H₁₉Br₂NO. Вычислено (%): С, 49.42; Н, 4.64; N, 3.39.

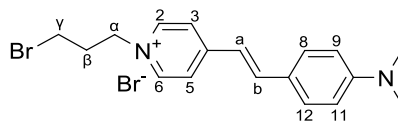
(E)-4-(4-метоксистирил)-1-(3-(4-метилпиридиний-1-ил)пропил)пиридиния бромид (16)



Смесь (E)-1-(3-бромпропил)-4-(4-метоксистирил)-1-пиридиния бромида (**15**) (0.1 г, 0.24 ммоль) и 4-метилпиридина (0.2 г, 2.15 ммоль) кипятили при перемешивании в абс. EtOH в течение 50 ч. Далее растворитель упаривали в вакууме, а остаток промывали ацетоном (3·по 10 мл), бензолом (3 по 10 мл) и CH₂Cl₂ (3·по 10 мл) и сушили в вакууме.

Выход соединения **16** 0.073 г (51%), т.пл. 138-140 °С. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆, δ м.д., J Гц): 2.59 (м, 2H, H-β), 2.61 (с, 3H, CH₃), 3.83 (с, 3H, OCH₃), 4.62 (т, 2H, H-γ, J=7.5, 7.5), 4.68 (т, 2H, H-α, J=7.8, 7.8), 6.72 (д, 2H, H-9, H-11, J=8.4), 7.29 (д, 2H, H-8, H-12, J=8.4), 7.41 (д, 1H, H-a, J_{trans}=16.2), 7.97 (д, 2H, H-3', H-5', J=6.2), 8.04 (д, 1H, H-b, J_{trans}=16.2), 8.46 (д, 2H, H-3, H-5, J=6.8), 8.98 (д, 2H, H-2', H-6', J=6.8), 9.0 (д, 2H, H-2, H-6, J=6.2). Найдено (%): С, 54.68; Н, 5.24; N, 5.29. С₂₃H₂₆Br₂N₂O. Вычислено (%): С, 54.56; Н, 5.18; N, 5.53.

(E)-1-(3-бромпропил)-4-(4-(диметиламино)стирил)пиридиния бромид (17)

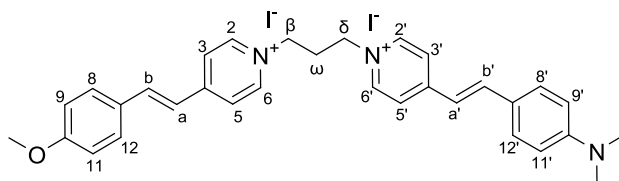


Смесь (E)-4-(4-диметиламино)стирил)пиридина (**14**) (0.119 г, 0.53 ммоль) и 1,3-дибромпропана (1.07 г, 5.3 ммоль) растворяли в ДМФА и выдерживали при 80 °С и перемешивании в течение

12 часов. Реакционную массу убирали на ночь в холодильник, выпавший осадок отфильтровывали, промывали горячим этилацетатом и холодным метанолом, сушили.

Выход соединения **17** 0.129 г (57%) т.пл. 168-172 °С (с разложением). ¹Н ЯМР (500 МГц, CD₃CN, δ / м. д., J / Гц): 2.48 (м., 2Н, Н-β); 3.04 (с, 6Н, N(CH₃)₂); 3.49 (т, 2Н, Н-γ, J=6.4, 6.4); 4.51 (т, 2Н, Н-α, J=7.1, 7.1); 6.79 (д, 2Н, Н-9, Н-11, J=8.9); 7.06 (д, 1Н, Н-а, J_{trans}=16.1); 7.58 (д, 2Н, Н-8, Н-12, J=8.9); 7.77 (д, 1Н, Н-б, J_{trans}=16.1); 7.88 (д, 2Н, Н-3, Н-5, J=6.9); 8.42 (д, 2Н, Н-2, Н-6, J=6.9). ¹³С ЯМР (126 МГц, CD₃CN, δ / м.д.): 28.6 (С-γ), 32.6 (С-β), 39.0 (СН₃), 57.8 (С-α), 111.7 (С-9, С-11), 116.3 (С-а), 122.1 (С-7), 122.5 (С-3, С-5), 130.1 (С-8, С-12), 142.7 (С-б), 143.1 (С-2, С-6), 152.3 (С-10), 154.7 (С-4). Найдено (%): С, 50.69; Н, 5.66; N, 6.61. С₁₈Н₂₂Br₂N₂. Вычислено (%): С, 50.73; Н, 5.2; N, 6.57. Масс-спектр раствора **15** в MeCN (ИЭР), вычислено m/z: 346.28; найдено m/z: 345.1 [**17**]⁺.

(E)-4-(4-(диметиламино)стирил)-1-(3-(4-(E)-4-метоксистирил)пиридиний-1-ил)пропил пиридиния иодид (4)

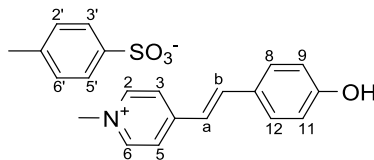


Смесь (E)-1-(3-бромпропил)-4-(4-(диметиламино)стирил)пиридиния бромида (**17**) (0.06 г, 0.14 ммоль), (E)-4-(4-метоксистирил)пиридина (**13**) (0.03 г, 0.14 ммоль) и KI (0.047 г, 0.28 ммоль) в MeCN выдерживали при кипячении и перемешивании при в течение 100 часов. После охлаждения реакционной массы растворитель выпаривали, полученный остаток перекристаллизовывали из метанола, осадок отфильтровывали, промывали горячим этилацетатом и сушили.

Выход соединения **4** 0.045 г (44 %), т.пл. 195-198 °С. ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆, δ м.д., J Гц): 2.59 (м, 2Н, Н-ω), 3.02 (с, 6Н, N(CH₃)₂), 3.83 (с, 3Н, OCH₃), 4.52 (т, 2Н, Н-δ, J = 7.6, 7.6), 4.58 (т, 2Н, Н-β, J = 7.3, 7.3), 6.78 (д, 2Н, Н-9', Н-11' J = 9.0), 7.06 (д, 2Н, Н-9, Н-11, J = 8.4), 7.2 (д, 1Н, Н-б', J_{trans} = 16.0), 7.39 (д, 1Н, Н-б, J_{trans} = 16.2), 7.59 (д, 2Н, Н-8', Н-12', J = 8.9), 7.71 (д, 2Н, Н-8, Н-12, J = 8.1), 7.95 (д, 1Н, Н-а', J_{trans} = 16.0), 8.03 (д, 1Н, Н-а, J_{trans} = 16.2), 8.09 (д, 2Н, Н-3', Н-5', J = 5.8), 8.21 (д, 2Н, Н-3, Н-5, J = 5.4), 8.75 (д, 2Н, Н-2', Н-6', J = 5.8), 8.88 (д, 2Н, Н-2, Н-6, J = 5.4). ¹³С ЯМР (101 МГц, ДМСО-d₆, δ / м.д.): 31.3 (С-ω), 39.5 (N(CH₃)₂), 55.4 (OCH₃) 56.0 (С-δ), 56.4 (С-β), 111.9 (С-9', С-11'), 114.7 (С-9, С-11), 117.1 (С-б'), 120.7 (С-б), 122.4 (С-3', С-5'), 123.3 (С-7'), 123.4 (С-3, С-5), 127.8 (С-7), 130.1 (С-8, С-12), 130.3 (С-8', С-12'), 141.2 (С-а), 142.5 (С-а'), 143.6 (С-2', С-6'), 144.2 (С-2, С-6), 152.0 (С-10'), 153.6 (С-4), 154.0 (С-4'), 161.3 (С-10). Найдено

(%): C, 51.1; H, 5.14; N, 5.67; I, 31.7; Br 2.9. $C_{32}H_{35}I_2N_3O$. Вычислено (%): C, 52.55; H, 4.82; N, 5.74, I, 34.7. Масс-спектр раствора **4** в MeCN (ИЭР), вычислено m/z : 238.82; найдено m/z : found 238.9 [**4**]²⁺.

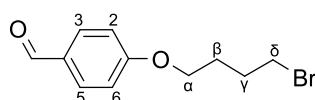
(E)-4-(4-гидроксистирил)-1-метилпиридиния тозилат (18)



Адаптировано из лит [195]. Смесь 4-гидроксибензальдегида (0.12 г, 0.98 ммоль), тозилат 4-метил-*N*-метил пиридиния (0.148 г, 0.53 ммоль) растворяли в абс. этаноле, добавляли пиперидин (52 μ л, 0.53 ммоль). Реакционную массу выдерживали при кипении и перемешивании в течение 10 часов. Затем реакционную массу остужали, приливали небольшое количество диэтилового эфира и убирали в холодильник. Выпавший осадок отфильтровывали и сушили.

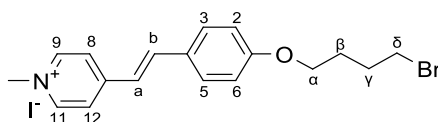
Выход соединения **18** 0.125 г (62%), т.пл. 186-192 °С. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆, δ м.д., *J* Гц): 2.28 (с, 3H, CH₃(TsO⁻)), 4.20 (с, 3H, CH₃-N⁺), 6.86 (д, 2H, H-9, H-11, *J*=8.27), 7.11 (д, 2H, H-2', H-6', *J*=7.63), 7.25 (д, 1H, H-b, *J*_{trans}=16.2), 7.47 (д, 2H, H-3', H-5', *J*=7.95), 7.61 (д, 2H, H-8, H-12, *J*=8.27), 7.93 (д, 1H, H-a, *J*_{trans}=16.2), 8.12 (д, 2H, H-3, H-5, *J*=6.36), 8.77 (д, 2H, H-2, H-6, *J*=6.36). Спектральные данные полностью согласуются с данными, приведенными в лит. [196].

4-(4-бромобутокс)бензальдегид (20)



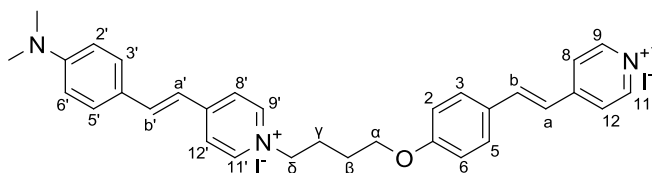
Адаптировано из лит. [114]. Смесь 4-гидроксибензальдегида (1.00 г, 8.19 ммоль), 1,4-дибромбутана (3.50 г, 16.2 ммоль) и K₂CO₃ (2.20 г, 16.2 ммоль) в ДМФА (50 мл) перемешивали в течение 50 ч при комнатной температуре. Затем растворитель выпаривали в вакууме, остаток растворяли в хлороформе и отфильтровывали осадок неорганической соли. Оставшийся раствор упаривали в вакууме. Остаток очищали методом колоночной хроматографии на SiO₂ с использованием хлороформа в качестве элюента.

Выход соединения **20** 0.475 г (23%). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ м.д., *J* Гц): 2.02 (м, 2H, H- γ), 2.09 (м, 2H, H- β), 3.5 (т, 2H, H- δ , *J* = 6.4), 4.09 (т, 2H, H- α , *J* = 6.4), 7.0 (д, 2H, H-2, H-6, *J* = 8.3), 7.84 (д, 2H, H-3, H-5, *J* = 8.3), 9.89 (с, 1H, HCO).

(E)-4-(4-(4-бромобутокс)стирил)-1-метилпиридиния иодид (21)

Адаптировано из лит. [114]. Смесь 4-(4-бромобутокс)бензальдегида (**20**) (0.3 г, 1.2 ммоль), 1,4-диметилпиридиния иодида (0.258 г, 1.1 ммоль) и пиперидина (108 μ л, 1.1 ммоль) в абс. этаноле перемешивали при кипячении в течение 6 ч, затем растворитель выпаривали и остаток очищали методом колоночной хроматографии на SiO_2 в системе дихлорметан – метанол с использованием градиентного элюирования (1:0 \rightarrow 5:1).

Выход соединения **21** 0.160 г (31%). ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ м.д., J Гц): 1.68 (м, 2Н, Н- γ), 1.79 (м, 2Н, Н- β), 3.44 (т, 2Н, Н- γ , $J = 6.9$), 4.08 (т, 2Н, Н- α , $J = 6.4$), 4.23 (с, 3Н, $\text{CH}_3\text{-N}^+$), 7.06 (д, 2Н, Н-2, Н-6, $J = 8.9$), 7.37 (д, 1Н, Н-b, $J_{trans} = 16.5$), 7.72 (д, 2Н, Н-3, Н-5, $J = 8.9$), 7.98 (д, 1Н, Н-a, $J_{trans} = 16.5$), 8.14 (д, 2Н, Н-8, Н-12, $J = 6.4$), 8.81 (д, 2Н, Н-9, Н-11, $J = 6.5$). Найдено (%): С, 45.56; Н, 4.44; N, 2.92. $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{IBrNO}$. Вычислено (%): С, 45.59; Н, 4.46; N, 2.95.

(E)-4-(4-(диметиламино)стирил)-1-(4-(4-((E)-2-(1-метилпиридиний-4-ил)винил)фенокси)бутил)пиридиния иодид (5)

Смесь (E)-4-(4-(4-бромобутокс)стирил)-1-метилпиридиния иодида (**21**) (0.081 г, 0.17 ммоль), (E)-4-(4-диметиламино)стирил)пиридина (**14**) (0.038 г, 0.17 ммоль) и йодида калия (0.056 г, 0.34 ммоль) в ацетонитриле выдерживали при кипячении и перемешивании в течение 30 ч, затем растворитель выпаривали и остаток очищали методом колоночной хроматографией на нейтральном Al_2O_3 в системе дихлорметан – метанол с использованием градиентного элюирования (1:0 \rightarrow 20:1).

Выход соединения **5** 0.028 г (22%), т.пл. 175–177 $^\circ\text{C}$. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ м.д., J Гц): 1.76 (м, 2Н, Н- β), 2.07 (м, 2Н, Н- γ), 3.02 (с, 6Н, N-(CH_3) $_2$), 4.09 (т, 2Н, Н- α , $J = 6.3$), 4.22 (с, 3Н, $\text{CH}_3\text{-N}^+$), 4.51 (т, 2Н, Н- δ , $J = 7.1$), 6.78 (д, 2Н, Н-2', Н-6', $J = 8.6$), 7.04 (д, 2Н, Н-2, Н-6, $J = 8.6$), 7.18 (д, 1Н, Н-a', $J_{trans} = 16.0$), 7.34 (д, 1Н, Н-a, $J_{trans} = 16.0$), 7.59 (д, 2Н, Н-3', Н-5', $J = 8.9$), 7.70 (д, 2Н, Н-3, Н-5, $J = 8.6$), 7.93 (д, 1Н, Н-b', $J_{trans} = 16.4$ Hz), 7.96 (д, 1Н, Н-b, $J_{trans} = 16.0$), 8.07 (д, 2Н, Н-8', Н-12', $J = 6.6$), 8.13 (д, 2Н, Н-8, Н-12, $J = 7.0$), 8.80 (д, 2Н, Н-9, Н-11, $J = 6.3$), 8.81 (д, 2Н, Н-9', Н-11', $J = 7.0$). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ / м.д.): 25.1 (С- β), 27.4 (С- γ), 39.1 (N-

(CH₃)₂, 46.0 (CH₃- N⁺), 58.6 (C-δ), 67.2 (C-α), 111.7 (C-2', C-6'), 115.0 (C-2, C-6), 116.9 (C-a'), 120.5 (C-a), 122.3 (C-8', C-12'), 122.7 (C-4'), 122.9 (C-8, C-12), 127.5 (C-4), 129.8 (C-3, C-5), 130.0 (C3', C-5'), 140.3 (C-b), 142.0 (C-b'), 143.4 (C-9', C-11'), 144.8 (C-9, C-11), 151.8 (C-1'), 152.9 (C-7), 154.0 (C-7'), 160.3 (C-1). Найдено (%): С, 53.24; Н, 4.95; N, 5.67; I, 32.15; Br, 1.78 C₃₃H₃₇I₂N₃O. Вычислено (%): С, 53.17; Н, 5.00; N, 5.64; I, 34.05. Масс-спектр раствора **5** в H₂O (ИЭР), вычислено *m/z*: 245.8; найдено *m/z*: 245.8 [**5**]²⁺.

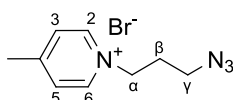
1-(3-Бромпропил)-4-метилпиридиния бромид (**22**)



Адаптировано из лит [197]. Смесь 1,3-дибромпропана (2.17 г, 10.7 ммоль) и 4-пиколина (0.2 г, 2.15 ммоль) в выдерживали при кипячении и перемешивании в течение 14 ч. Затем растворитель выпаривали, остаток очищали методом колоночной хроматографии на SiO₂, в системе этилацетат – метанол с использованием градиентного элюирования (1:0→10:1).

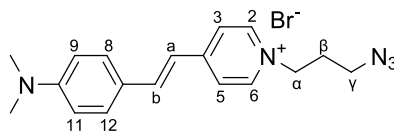
Выход соединения **22** 0.34 г (54%), т.пл. 139-142 °С (лит. [197]: т.пл. 141 °С). ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆, δ м.д., *J* Гц): 2.48 (м, 2Н, Н-β); 2.61 (с, 3Н, СН₃); 3.55 (т, 2Н, Н-γ, *J* = 6.8 Hz); 4.64 (т, 2Н, Н-α, *J* = 7.3 Hz); 8.0 (д, 2Н, Н-3, Н-5, *J* = 6.4 Hz); 8.93 (д, 2Н, Н-2, Н-6, *J* = 6.8 Hz).

1-(3-Азидопропил)-4-метилпиридиния бромид (**23**)



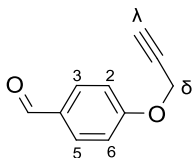
Адаптировано из лит. [198]. Смесь 1-(3-бромпропил)-4-метилпиридиния бромид (**22**) (0.341 г, 1.16 ммоль) и азид натрия (0.188 г, 2.9 ммоль) в ацетонитриле перемешивали при кипячении в течение 16 часов. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, неорганический осадок отфильтровывали, а органический раствор упаривали в вакууме с получением продукта.

Выход соединения **23** 0.288 г (97%). ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆, δ м.д., *J* Гц): 2.17 (м, 2Н, Н-β), 2.61 (с, 3Н, СН₃), 3.46 (т, 2Н, Н-γ, *J* = 6.8), 4.61 (т, 2Н, Н-α, *J* = 7.2), 8.0 (д, 2Н, Н-3, Н-5, *J* = 6.4), 8.94 (д, 2Н, Н-2, Н-6, *J* = 6.4). ¹³С ЯМР (101 МГц, ДМСО-*d*₆, δ / м.д.): 21.36 (СН₃), 29.57 (C-β), 47.54 (C-γ), 57.61 (C-α), 128.32 (C-3, C-5), 143.90 (C-2, C-6), 158.91 (C-4). Найдено (%): С, 42.10; Н, 5.15; N, 21.80. C₉H₁₃BrN₄. Вычислено (%): С, 42.04; Н, 5.10; N, 21.79. Масс-спектр раствора **23** в MeOH (ИЭР), вычислено *m/z*: 177.23; найдено *m/z*: 177.17 [**23**]⁺.

(E)-1-(3-азидопропил)-4-(4-(диметиламино)стирил)пиридиния бромид (24)

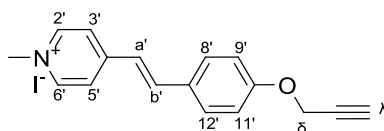
Адаптировано из лит. [199]. Смесь 1-(3-азидопропил)-4-метилпиридиния бромид (**23**) (0.286 г, 1.113 ммоль), 4-(диметиламино)бензальдегида (0.216 г, 1.450 ммоль), пиперидина (108 μ л, 1.1 ммоль) в абс. этаноле кипятили при перемешивании в течение 14 часов. Затем растворитель выпаривали, а остаток очищали методом колоночной хроматографии на SiO_2 в системе дихлорметан – метанол с использованием градиентного элюирования (1:0 \rightarrow 10:1).

Выход соединения **24** 0.243 г (57 %), т.пл. 173–175 $^{\circ}\text{C}$. ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO-}d_6$, δ м.д., J Гц): 2.16 (м, 2H, H- β); 3.02 (с, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3.47 (т, 2H, H- γ), $J = 6.4$), 4.48 (т, 2H, H- α), $J = 6.9$), 6.79 (д, 2H, H-9, H-11, $J = 8.9$), 7.18 (д, 1H, H-a, $J = 16.5$), 7.6 (д, 2H, H-8, H-12, $J = 8.9$), 7.94 (д, 1H, H-b, $J = 16.5$), 8.07 (д, 2H, H-3, H-5, $J = 6.4$), 8.77 (д, 2H, H-2, H-6, $J = 6.4$). ^{13}C ЯМР (101 МГц, $\text{DMSO-}d_6$, δ / м.д.): 29.51 (C- β), 39.30 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 47.63 (C- γ), 56.81 (C- α), 111.94 (C-9, C-11), 117.10 (C-a), 122.20 (C-7), 122.38 (C-5, C-3), 130.21 (C-8, C-12), 142.30 (C-b), 143.65 (C-2, C-6), 151.93 (C-10), 153.88 (C-4). Найдено (%): C, 55.72; H, 5.78; N, 18.06. $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{BrN}_5$. Вычислено (%): C, 55.68; H, 5.71; N, 18.0. Масс-спектр раствора **24** в MeOH (ИЭР), вычислено m/z : 308.40; найдено m/z : 308.30 [**24**] $^+$.

4-(проп-2-инилокси)бензальдегид (25)

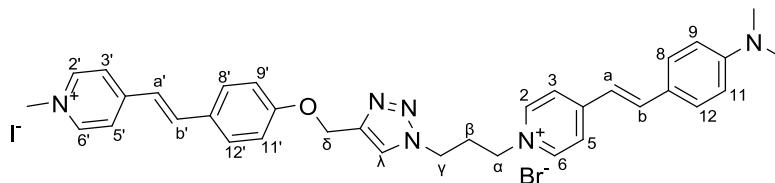
Взято из литературы [200]. Смесь 4-гидроксибензальдегида (0.25 г, 2 ммоль), 3-бром-1-пропина (0.952 г, 8 ммоль) и карбоната калия (1.104 г, 8 ммоль) в ацетоне выдерживали при кипячении и перемешивании в течение 4 часов. После остывания к реакционной массе добавляли 50 мл воды, затем водный слой экстрагировали дихлорметаном, объединенные органические фракции сушили над MgSO_4 , фильтровали и растворитель выпаривали.

Выход соединения **25** 0.31 г (97%), т.пл. 74-77 $^{\circ}\text{C}$ (лит. [200]: т.пл. 75-77 $^{\circ}\text{C}$). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3 , δ м.д., J Гц): 2.58 (т, 1H, H- λ , $J = 2.5$); 4.79 (д, 2H, H- δ , $J = 2.5$); 7.09 (д, 2H, H-2, H-6, $J = 8.9$); 7.86 (д, 2H, H-3, H-5, $J = 8.3$); 9.91 (с, 1H, HCO).

(E)-1-метил-4-(4-(проп-2-инилокси)стирил)пиридиния иодид (26)

Взято из литературы [201]. Смесь N-метил-4-пиколиния иодида (0.211 г, 0.9 ммоль), 4-(проп-2-инилокси)бензальдегида (**25**) (0.15 г, 0.94 ммоль) и пиперидина (88 μ л, 0.9 ммоль) в абс. этаноле выдерживали при кипячении и перемешивании в течение 7 часов. Затем растворитель упаривали, а полученный остаток перекристаллизовывали из метанола или чистили методом колоночной хроматографии на SiO₂ в системе дихлорметан – метанол с использованием градиентного элюирования (1:0→10:1).

Выход соединения **26** 0.218 г (64%). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆, δ м.д., *J* Гц): 3.63 (т, 1H, H- λ , *J* = 2.5), 4.25 (с, 3H, CH₃-N⁺), 4.89 (д, 2H, H- δ , *J* = 2.5), 7.11 (д, 2H, H-9', H-11', *J* = 8.9), 7.38 (д, 1H, H-a', *J*_{trans} = 15.9), 7.73 (д, 2H, H-8', H-12', *J* = 8.3), 7.97 (д, 1H, H-b', *J*_{trans} = 15.9), 8.14 (д, 2H, H-3', H-5', *J* = 6.3), 8.81 (д, 2H, H-2', H-6', *J* = 5.7).

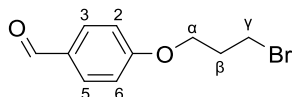
(E)-4-(4-(диметиламино)стирил)-1-(3-(4-((E)-2-(1-метилпиридиний-4-ил)винил)феноксиметил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)пропил)пиридиния бромид иодид (6)

Смесь (E)-1-(3-азидопропил)-4-(4-(диметиламино)стирил)пиридиния бромида (**24**) (0.063 г, 0.16 ммоль), (E)-1-метил-4-(4-(проп-2-инилокси)стирил)пиридиния иодид (**26**) (0.061 г, 0.016 ммоль), DIPEA (0.040 г, 0.32 ммоль) и иодида меди (0.005 г, 0.026 ммоль) в ДМФА выдерживали при кипячении и перемешивании в течение 25 ч, затем растворитель выпаривали и остаток очищали методом колоночной хроматографии на нейтральном Al₂O₃ в системе дихлорметан – метанол с использованием градиентного элюирования (1:0→20:1).

Выход соединения **6** 0.037 г (30 %), т.пл. 202–204 °С. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆, δ м.д., *J* Гц): 2.53 (м, 2H, H- β); 3.02 (с, 6H, N(CH₃)₂); 4.23 (с, 3H, CH₃-N⁺); 4.50 (т, 2H, H- γ); 4.51 (т, 2H, H- α); 5.20 (с, 2H, H- δ); 6.79 (д, 2H, H-9, H-11, *J* = 9.1); 7.16 (д, 2H, H-9', H-11', *J* = 8.7); 7.17 (д, 1H, H-a, *J*_{trans} = 16.4); 7.36 (д, 1H, H-a', *J*_{trans} = 16.4); 7.59 (д, 2H, H-8, H-12, *J* = 9.1); 7.71 (д, 2H, H-8', H-12', *J* = 9.1); 7.93 (д, 1H, H-b, *J*_{trans} = 16.0); 7.97 (д, 1H, H-b', *J*_{trans} = 16.0); 8.05 (д, 2H, H-3, H-5, *J* = 7.3); 8.15 (д, 2H, H-3', H-5', *J* = 6.9); 8.28 (с, 1H, H- λ); 8.74 (д, 2H, H-2, H-6, *J* = 6.9); 8.82 (д, 2H, H-2', H-6', *J* = 6.9). ¹³C ЯМР (101 МГц, ДМСО-*d*₆, δ / м.д.): 30.6 (C- β); 39.3 (N-(CH₃)₂); 46.6

(CH₃- N⁺); 46.9 (C-α); 56.8 (C-γ); 61.4 (C-δ); 112.0 (C-9, C-11); 115.5 (C-9', C-11'); 117.2 (C-a); 121.1 (C-a'); 122.4 (C-7); 122.5 (C-3, C-5); 123.2 (C-3', C-5'); 128.2 (C-7'); 130.1 (C-8', C-12'); 130.4 (C-8, C-12); 140.5 (C-b'); 142.5 (C-b); 143.7 (C-2, C-6); 145.1 (C-2', C-6'); 152.0 (C-10); 152.1 (C-4'); 154.0 (C-4); 160.0 (C-10'). Найдено (%): С, 54.93; Н, 4.98; N, 10.96. C₃₅H₃₈BrIN₆O. Вычислено (%): С, 54.81; Н, 5.00; N, 10.95. Масс-спектр раствора **6** в H₂O (ИЭР), вычислено *m/z*: 279.40; найдено *m/z*: 279.30 [6]²⁺.

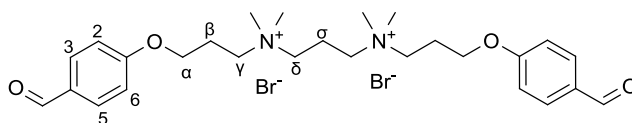
4-(3-Бромпропокси)бензальдегид (**27**)



Взято из литературы [114]. Смесь 4-гидроксибензальдегида (1.00 г, 8.19 ммоль), 1,3-дибромпропана (2.48 г, 12.2 ммоль) и K₂CO₃ (1.7 г, 12.3 ммоль) в ДМФА (100 мл) перемешивали в течение 50 ч при комнатной температуре. Затем растворитель выпаривали в вакууме, остаток растворяли в хлороформе и отфильтровывали осадок неорганической соли. Оставшийся раствор упаривали в вакууме. Остаток очищали методом колоночной хроматографии на SiO₂ с использованием хлороформа в качестве элюента.

Выход соединения **27** 1.1 г (58%). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ м.д., J Гц): 2.36 (м, 2H, H-β), 3.62 (т, 2H, H-γ, J = 6.4), 4.20 (т, 2H, H-α, J = 6.4), 7.02 (д, 2H, H-2, H-6, J = 8.3), 7.85 (д, 2H, H-3, H-5, J = 8.3), 9.89 (с, 1H, HCO). Спектральные данные полностью согласуются с данными, приведенными в лит. [114].

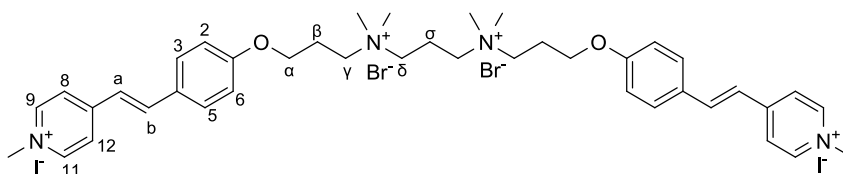
*N*¹,*N*³-бис(3-(4-формилфенокси)пропил)-*N*¹,*N*¹,*N*³,*N*³-тетраметилпропан-1,3-диаминия бромид (**28**)



Смесь 4-(3-бромпропилокси)- бензальдегида (**27**) (0.2 г, 0.823 ммоль) и *N,N,N,N'*-тетраметилпропан-1,3-диамина (0.0535 г, 0.411 ммоль) кипятили в толуоле в течение 120 часов в атмосфере аргона. Затем растворитель отгоняли на ротаторном испарителе. Остаток промывали гексаном и этилацетатом, перекристаллизовывали из этанола.

Выход соединения **28** 0.14 г (56%). ¹H ЯМР (400 МГц, D₂O, δ м.д., J Гц): 2.25 (м, 6H, H-σ, H-β), 3.13 (с, 12H, (CH₃)₄), 3.42 (м, 4H, H-δ), 3.55 (м, 4H, H-γ), 4.12 (т, 4H, H-α, J=5.1, J=5.1), 6.89 (д, 4H, H-2, H-6, J=8.6), 7.65 (д, 4H, H-3, H-5, J=8.6), 9.57 (с, 2H, HCO). Найдено (%): С, 47.46; Н, 6.85; N, 4.31; Br, 24.51. C₂₇H₄₀Br₂N₂O₄. Вычислено (%): С, 52.61; Н, 6.54; N, 4.54; Br, 25.92.

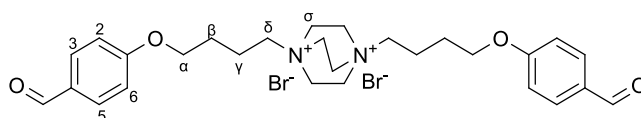
4,4'-(1*E*,1'*E*)-2,2'-(4,4'-(3,3'-(пропан-1,3-диилбис(диметиламмониядиил))бис(пропан-3,1-диил))бис(окси)бис(4,1-фенилен))бис(этен-2,1-диил)бис(1-метилпиридиния) дибромид диiodид (7)



Адаптировано из [202]. Смесь N^1, N^3 -бис(3-(4-формилфенокси)пропил)- N^1, N^1, N^3, N^3 -тетраметилпропан-1,3-диаминия бромида (**28**) (0.137 г, 0.24 ммоль), N-метил-4-пиколия иодида (0.113 г 0.48 ммоль) и пиперидина (47 μ л, 0.48 ммоль) в 2-этоксигэтанол (5 мл) выдерживали при кипячении и перемешивании в течение 1 часа. Выпавший в ходе реакции осадок отфильтровывали и промывали горячим этилацетатом, диэтиловым эфиром и сушили.

Выход соединения **7** 0.091 г (36%), т.пл. 240-242 °С. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ м.д., J Гц): 2.23 (м, 6H, H- β , H- σ), 3.15 (с, 12H, $(\text{CH}_3)_4$), 3.35 (м, 4H, H- δ), 3.56 (м, 4H, H- γ), 4.16 (т, 4H, H- α , $J=5.1$, $J=5.1$), 4.23 (с, 6H, CH_3N^+), 7.08 (д, 4H, H-2, H-6, $J=8.9$), 7.37 (д, 2H, H-a, $J_{trans}=16.0$), 7.73 (д, 4H, H-3, H-5, $J=8.9$), 7.98 (д, 2H, H-b, $J_{trans}=16.0$), 8.16 (д, 4H, H-8, H-12, $J=6.6$), 8.82 (д, 4H, H-9, H-11, $J=6.6$). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ / м.д.): 16.41 (C- σ), 22.43 (C- β), 46.96 (CH_3N^+), 50.61 ($(\text{CH}_3)_4$), 59.68 (C- δ), 61.29 (C- γ), 65.10 (C- α), 115.22 (C-2, C-6), 121.00 (C-a), 123.15 (C-8, C-12), 128.34 (C-4), 130.03 (C-3, C-5), 140.47 (C-b), 145.02 (C-9, C-11), 152.88 (C-7), 160.06 (C-1). Найдено (%): C, 46.37; H, 5.25; N, 5.31. $\text{C}_{41}\text{H}_{56}\text{Br}_2\text{I}_2\text{N}_4\text{O}_2$. Вычислено (%): C, 46.88; H, 5.37; N, 5.33.

1,4-Бис(4-(4-формилфенокси)бутил)-1,4-дизазониябицикло[2.2.2]октан бромид (29)

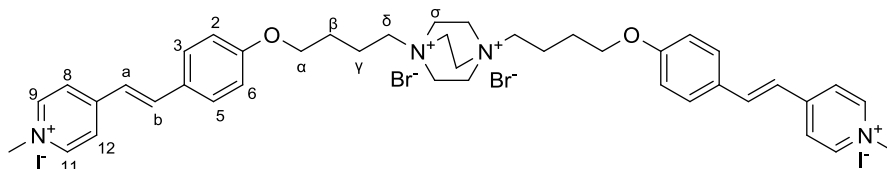


Смесь 4-(4-бромобутокс)бензальдегида (**20**) (0.15 г, 0.62 ммоль) и 1,4-дизабцикло[2.2.2]октана (0.035 г, 0.31 ммоль) кипятили в толуоле в течение 100 часов в атмосфере аргона. Затем растворитель отгоняли на роторном испарителе. Продукт очищали методом колоночной хроматографии на нейтральном Al_2O_3 в системе дихлорметан – метанол с использованием градиентного элюирования (1:0→4:1).

Выход соединения **29** 0.044 г (23%). ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ м.д., J Гц): 1.80 (м, 4H, H- β), 1.88 (м, 4H, H- γ), 3.65 (м, 4H, H- δ), 3.95 (с, 12H, $(\text{CH}_2)_6$), 4.16 (т, 4H, H- α , $J=5.4$, $J=5.4$), 7.15

(д, 4Н, Н-2, Н-6, $J=8.6$), 7.88 (д, 4Н, Н-3, Н-5, $J=8.6$), 9.88 (с, 2Н, НСО). Найдено (%): С, 52.88; Н, 6.20; N, 4.40. $C_{28}H_{38}Br_2N_2O_4$. Вычислено (%): С, 53.69; Н, 6.11; N, 4.47.

1,4-бис(4-(4-((*E*)-2-(1-метилпиридиния-4-ил)винил)фенокси)бутил)-1,4-дiazония бицикло [2.2.2]октан дибромид диiodид (8)



Адаптировано из [202]. Смесь 1,4-бис(4-(4-формилфенокси)бутил)-1,4-дiazониябицикло[2.2.2]октан бромид (29) (0.044 г, 0.07 ммоль), N-метил-4-пиколия иодида (0.033 г 0.14 ммоль) и пиперидина (14 μ л, 0.14 ммоль) в 2-этоксизтанолe (3 мл) выдерживали при кипячении и перемешивании в течение 1 часа. Затем реакционную массу упаривали и остаток очищали методом колоночной хроматографии на нейтральном Al_2O_3 в системе дихлорметан – метанол с использованием градиентного элюирования (1:0→2:1).

Выход соединения 8 0.025 г (33%). 1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ м.д., J Гц): 1.80 (м, 4Н, Н- β), 1.87 (м, 4Н, Н- γ), 3.62 (м, 4Н, Н- δ), 3.90 (с, 12Н, $(CH_2)_6$), 4.12 (т, 4Н, Н- α , $J=5.1$, $J=5.1$), 4.23 (с, 6Н, CH_3N^+), 7.08 (д, 4Н, Н-2, Н-6, $J=8.6$), 7.37 (д, 2Н, Н-а, $J_{trans}=16.0$), 7.73 (д, 4Н, Н-3, Н-5, $J=8.6$), 7.98 (д, 2Н, Н-б, $J_{trans}=16.0$), 8.16 (д, 4Н, Н-8, Н-12, $J=6.64$), 8.82 (д, 4Н, Н-9, Н-11, $J=6.6$). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ / м.д.): 18.73 (С- γ), 25.43 (С- β), 46.86 (CH_3N^+), 50.47 ($(CH_2)_6$), 63.31 (С- δ), 67.22 (С- α), 115.18 (С-2, С-6), 120.96 (С-а), 123.16 (С-8, С-12), 128.00 (С-4), 130.05 (С-3, С-5), 140.39 (С-б), 145.05 (С-9, С-11), 152.96 (С-7), 160.42 (С-1). Найдено (%): С, 47.34; Н, 5.20; N, 5.24. $C_{42}H_{54}Br_2I_2N_4O_2$. Вычислено (%): С, 47.57; Н, 5.13; N, 5.28.

4.2. Расчет квантовых выходов флуоресценции

Квантовые выходы флуоресценции определялись в насыщенных воздухом растворах при температуре 20 ± 1 °С по отношению к стандарту кумарину 343 в этаноле ($\varphi^{фл} = 0.63$) и кумарину 6 в этаноле ($\varphi^{фл} = 0.78$) [203]. Для расчета квантовых выходов использовалась формула (1) [204].

$$\varphi_i^{фл} = \varphi_R^{фл} \cdot \frac{(1-10^{-A_R}) \cdot S_i \cdot n_R^2}{(1-10^{-A_i}) \cdot S_R \cdot n_i^2}, \quad (1)$$

где $\varphi_i^{фл}$ и $\varphi_R^{фл}$ – квантовые выходы анализируемого раствора и стандарта соответственно, A_i и A_R

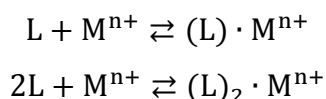
– поглощение анализируемого раствора и стандарта соответственно, S_i и S_R – площадь под кривой спектра флуоресценции анализируемого раствора и стандарта соответственно, n_i и n_R – показатели преломления растворителей исследуемого вещества и стандартного соединения соответственно.

Квантовые выходы флуоресценции комплексов состава $(L) \cdot M^{n+}$, $(L)_2 \cdot M^{n+}$ определялись в присутствии избытка катиона металла M^{n+} или ДНК/РНК в растворе лиганда L , при котором степень закомплексованности лиганда составляла 90 – 95 %. Необходимый избыток катиона рассчитывался исходя из известного значения константы устойчивости образующегося комплекса и значения общей аналитической концентрации лиганда в растворе с помощью программы SpecFit-32.

4.3. Спектрофотометрическое определение констант устойчивости комплексов бисстирилового красителя 1 с катионами металлов

Для определения констант устойчивости комплексов красителя **1** с катионами Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Na^+ , Li^+ , H^+ , Hg^{2+} и Ag^+ использовались методы спектрофотометрического и спектрофлуориметрического титрования [205,206]. В кварцевой кювете ($l = 1$ см) готовили раствор лиганда в выбранном растворителе с точно известной концентрацией ($10^{-5} - 10^{-6}$ М) путем разбавления более концентрированного раствора и записывали спектр поглощения (или флуоресценции). В полученный раствор далее небольшими порциями (5 – 20 μ л) прибавлялся раствор соли металла в том же растворителе (также с известной концентрацией). После каждой добавки записывался спектр поглощения (флуоресценции). Титрование считалось оконченным тогда, когда спектр переставал меняться при добавлении очередной порции титранта.

В присутствии катионов металлов в растворе устанавливается равновесие, результирующее поглощение или флуоресценция раствора определяются равновесными концентрациями присутствующих в нем частиц. При проведении анализа экспериментальных данных учитывалась возможность образования комплексов по следующим уравнениям (в расчет принималось или одно из двух, или оба равновесия),



где символ L обозначает лиганд, M^{n+} – катион металла.

Обработку результатов титрования и расчет констант устойчивости комплексов $K_{(L) \cdot M^{n+}}$ и $K_{(L)_2 \cdot M^{n+}}$, соответствующих представленным равновесиям и выражаемых через концентрации $[L]$, $[M^{n+}]$, $[(L) \cdot M^{n+}]$ и $[(L)_2 \cdot M^{n+}]$ по уравнениям (2) и (3),

$$K_{(L) \cdot M^{n+}} = \frac{[(L) \cdot M^{n+}]}{[L][M^{n+}]} \quad (2)$$

$$K_{(L)_2 \cdot M^{n+}} = \frac{[(L)_2 \cdot M^{n+}]}{[L]^2[M^{n+}]} \quad (3)$$

проводили с привлечением численных методов, с помощью которых итерационными приближениями удается получить необходимые параметры с заданной точностью для выбранной схемы комплексообразования. Такими возможностями обладает пакет программ SpecFit-32® (Spectrum Software Associates, PMB 361, 197M Boston Post Road, West Marlborough, MA 01752, USA) [207], с использованием которого были получены значения констант устойчивости комплексов, а также спектры поглощения и флуоресценции индивидуальных компонентов раствора, участвующих в комплексообразовании.

4.4. Исследование взаимодействия лигандов 2-6 с ДНК и РНК

ДНК тимуса теленка (Sigma, St. Louis, MO, USA) I типа, полимеризованная натриевая соль, и РНК печени теленка (Sigma) IV типа были использованы без дополнительной очистки. Для приготовления буферных растворов и спектральных измерений применялась очищенная вода с удельным сопротивлением $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$. ЭДТА-бифосфатный буфер ($6.0 \cdot 10^{-3} \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$, $2.0 \cdot 10^{-3} \text{ M NaH}_2\text{PO}_4$, $1.0 \cdot 10^{-3} \text{ M Na}_2\text{EDTA}$; общая концентрация ионов Na^+ $16.0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; pH 7.0) использовался для титрования ДНК и РНК.

ДНК растворяли в буферном растворе до получения концентрации $1\text{-}2 \text{ mg ml}^{-1}$, помещали в ультразвуковую баню на 2-3 мин и оставляли при $4 \text{ }^\circ\text{C}$ на ночь. Затем раствор фильтровали через PVDF мембранный фильтр (размер пор $0.45 \text{ }\mu\text{m}$) для удаления нерастворившегося остатка. Точные концентрации растворов ДНК были определены путем измерения поглощения раствора ДНК в буфере, полученного при разбавлении исходного раствора ДНК (1:20), учитывая, что $\epsilon_{260} = 12824 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ пар оснований [208–210]. Точные концентрации растворов РНК были определены по уравнению

$$C_{\text{RNA}} = \frac{20 \cdot A_{260} \cdot 40 \cdot 10^{-6}}{330}, \quad (4)$$

где A_{260} — поглощение при 260 нм исходного раствора РНК, разбавленного в 20 раз [211].

Спектрофотометрические измерения проводились в термостатируемых кварцевых кюветах ($l = 10 \text{ mm}$) при $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Растворы для анализа готовились непосредственно перед измерениями из стоковых растворов лигандов в ДМСО и воде. Чтобы избежать разбавления в процессе титрования, раствор ДНК/РНК с концентрацией 1-2 мМ (титрант) содержал лиганд в той же самой концентрации, что и анализируемый раствор. Аликвоты анализируемого раствора помещались в кварцевые кюветы, титрование проводилось с шагом 0.5-2 эквивалента. Время

выдерживания образца после каждой добавки, необходимое для установления равновесия, определялось экспериментально по отсутствию временных изменений в спектре поглощения. Титрование завершали, если в спектрах не наблюдалось изменений после добавления как минимум трех аликвот титранта по 2 эквивалента каждая. Флуориметрическое титрование проводилось согласно методике, описанной выше для спектрофотометрического титрования. Длина волны возбуждения соответствовала максимуму поглощения соответствующего хромофора красителя.

5. ВЫВОДЫ

1. Синтезированы и охарактеризованы гомо- и гетеро-димерные бисстирилпиридиниевые красители типа «голова к голове» **1, 2, 3, 4**, типа «голова к хвосту» **5, 6** и типа «хвост к хвосту» **7, 8**, содержащие в фенильном ядре алкокси- и диалкиламино-группы.
2. Показано, что с помощью бисстирилового красителя **1** возможно распознавание различных катионов металлов. Также бисстириловый краситель **1** может использоваться для ратиометрического детектирования катионов Hg^{2+} в живых клетках A549.
3. Показано, что бисстириловые красители типа «голова к голове» **2, 3, 4** демонстрируют способность к связыванию с ДНК. В случае симметричных бисстириловых красителей при больших избытках красителя процесс координации в малой бороздке ДНК сопровождается образованием агрегатов различного типа.
4. Показано, что бисстириловые красители типа «голова к хвосту» **5, 6** демонстрируют способность к связыванию с нуклеиновыми кислотами. Данные красители при взаимодействии с ДНК/РНК не агрегируют, проявляют интенсивное разгорание флуоресценции и демонстрируют большую селективность к ДНК.
5. Установлено, что при фотовозбуждении несимметричного бисстирилового красителя можно использовать коротковолновое облучение с получением флуоресцентного сигнала благодаря переносу энергии между хромофорными фрагментами красителя в комплексе с катионами металлов, в связанной с биомолекулой форме, а также во внутриклеточной среде.

Перспективы дальнейшей разработки темы диссертации заключаются в дальнейшем исследовании и применении бисхромофорных систем для биовизуализации. Поскольку структура краун-содержащего бисстирилового красителя с реализацией переноса энергии показала свою применимость для детекции катионов металлов, замена краун-эфира на другой рецепторный фрагмент позволила бы получить сенсор селективный на другие катионы металлов. Для флуоресцентного окрашивания биомолекул наиболее перспективными структурами оказались бисстириловые красители типа «голова к хвосту», поэтому дальнейший подбор хромофорных фрагментов в системе такого строения позволил бы получить красители с более высокими коэффициентами экстинкции и кратностью разгорания флуоресценции.

6. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Petit J.M., Denis-Gay M., Ratinaud M.H. Assessment of fluorochromes for cellular structure and function studies by flow cytometry // *Biol. Cell* – 1993. – Vol. 78. – № 1–2. – P. 1–13.
2. Waggoner A. Covalent labeling of proteins and nucleic acids with fluorophores // *Methods Enzymol.* – 1995. – Vol. 246. – P. 362–373.
3. Zhang J. et al. Creating new fluorescent probes for cell biology // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002 312 – 2002. – Vol. 3. – № 12. – P. 906–918.
4. Johnsson N., Johnsson K. Chemical tools for biomolecular imaging // *ACS Chem. Biol.* – 2007. – Vol. 2. – № 1. – P. 31–38.
5. Sadaghiani A.M., Verhelst S.H., Bogoyo M. Tagging and detection strategies for activity-based proteomics // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2007. – Vol. 11. – № 1. – P. 20–28.
6. Haugland R.P. et al. *The Handbook: A guide to fluorescent probes and labeling technologies.* – Invitrogen Corp, 2005. – 975 p.
7. Craig D.B., Dovichi N.J. Multiple labeling of proteins // *Anal. Chem.* – 1998. – Vol. 70. – № 13. – P. 2493–2494.
8. Iwaki T. et al. Antibodies for Fluorescent Molecular Rotors // *Biochemistry* – 1993. – Vol. 32. – № 29. – P. 7589–7592.
9. Simeonov A. et al. Blue-fluorescent antibodies // *Science.* – 2000. – Vol. 290. – № 5490. – P. 307–313.
10. Debler E.W. et al. Deeply inverted electron-hole recombination in a luminescent antibody-stilbene complex // *Science.* – 2008. – Vol. 319. – № 5867. – P. 1232–1235.
11. Adhikari A., Mahar A.S. DNA targeted anthraquinone derivatives: an important anticancer agents // *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* – 2016. – P. 17–25.
12. Smith P. J. et al. Characteristics of a novel deep red/infrared fluorescent cell-permeant DNA probe, DRAQ5, in intact human cells analyzed by flow cytometry, confocal and multiphoton microscopy // *Cytom., : j. Int. Soc. Anal. Cytol.* – 2000. – Vol. 40. – № 4. – P. 280-291.
13. Al-Otaibi J. S., Gogary T. M. E. L. Synthesis of novel anthraquinones: Molecular structure, molecular chemical reactivity descriptors and interactions with DNA as antibiotic and anti-cancer drugs // *J. Mol. Struct.* – 2017. – Vol. 1130. – P. 799-809.
14. Al-Otaibi J.S., Teesdale Spittle P., El Gogary T.M. Interaction of anthraquinone anti-cancer drugs with DNA: Experimental and computational quantum chemical study // *J. Mol. Struct.* – 2017. – Vol. 1127. – P. 751–760.
15. Gholivand M.B., Kashanian S., Peyman H. DNA-binding, DNA cleavage and cytotoxicity studies of two anthraquinone derivatives // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2012. – Vol. 87. – P. 232–240.

16. Chang I.Y., Miller I.K. Photostability of Anthraquinone and Azo Dyes in N-Ethylacetamide (Nylon Model) // *J. Soc. Dye. Colour.* – 1986. – Vol. 102. – № 2. – P. 46–53.
17. Wang Y. et al. Binding Mechanism of Fluorescent Dyes to DNA Characterized by Magnetic Tweezers // *Mater. Today Proc.* – 2017. – Vol. 4. – P. S218–S225.
18. Smith P.J. et al. A novel cell permeant and far red-fluorescing DNA probe, DRAQ5, for blood cell discrimination by flow cytometry // *J. Immunol. Methods* – 1999. – Vol. 229. – № 1–2. – P. 131–139.
19. Edward R. Use of DNA-specific anthraquinone dyes to directly reveal cytoplasmic and nuclear boundaries in live and fixed cells // *Mol. Cells* 2009 274 – 2009. – Vol. 27. – № 4. – P. 391–396.
20. Wojcik K., Dobrucki J.W. Interaction of a DNA intercalator DRAQ5, and a minor groove binder SYTO17, with chromatin in live cells—Influence on chromatin organization and histone—DNA interactions // *Cytom. Part A* – 2008. – Vol. 73. – № 6. – P. 555–562.
21. Akagi J. et al. Real-time cell viability assays using a new anthracycline derivative DRAQ7® // *Cytom. Part A* – 2013. – Vol. 83. – № 2. – P. 227–234.
22. DRAQ7™ (ab109202) | Abcam [Electronic resource]. URL: <https://www.abcam.com/draq7-ab109202.html> (accessed: 19.07.2022).
23. DRAQ7™ Dye [Electronic resource]. URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D15106?us&en#/D15106?us&en> (accessed: 19.07.2022).
24. Errington R. J. et al. CyTRAK™ probes: novel nuclear and cytoplasm discriminators compatible with GFP-based HCS and HTS assays //Poster presentation: Society for Biomolecular Sciences Annual Conference, USA. – 2006.
25. Monks T.J. et al. Quinone chemistry and toxicity // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1992. – Vol. 112. – № 1. – P. 2–16.
26. Fox E.J. Mechanism of action of mitoxantrone // *Neurology* – 2004. –Vol. 63. – № 12 suppl 6. – P. S15–S18.
27. Abu Saleh M. et al. Inhibition of DNA Topoisomerase Type II α (TOP2A) by Mitoxantrone and Its Halogenated Derivatives: A Combined Density Functional and Molecular Docking Study // *Biomed Res. Int.* – 2016. – Vol. 2016.
28. Bell D.H. Characterization of the fluorescence of the antitumor agent, mitoxantrone // *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* – 1988. – Vol. 949. – № 1. – P. 132–137.
29. Faulds D. et al. Mitoxantrone. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in the chemotherapy of cancer // *Drugs* – 1991. – Vol. 41. – № 3. – P. 400–449.

30. Comini L.R. et al. Antibacterial activity of anthraquinone derivatives from *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae) // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* – 2011. – Vol. 102. – № 2. – P. 108–114.
31. Sevgili Ö. et al. The current transformer mechanism and structural properties of novel Al/BODIPY/pSi and Au/BODIPY/pSi heterojunctions // *Mater. Sci. Semicond. Process.* – 2021. – Vol. 130. – P. 105805.
32. Agazzi M.L. et al. BODIPYs in antitumoral and antimicrobial photodynamic therapy: An integrating review // *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* – 2019. – Vol. 40. – P. 21–48.
33. Kowada T., Maeda H., Kikuchi K. BODIPY-based probes for the fluorescence imaging of biomolecules in living cells // *Chem. Soc. Rev.* – 2015. – Vol. 44. – № 14. – P. 4953–4972.
34. Zhao C. et al. Development of BODIPY-based fluorescent DNA intercalating probes // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* – 2013. – Vol. 264. – P. 41–47.
35. Keleş T. et al. Synthesis of water-soluble BODIPY dyes and investigation of their DNA interaction properties and cytotoxicity/phototoxicity // *Appl. Organomet. Chem.* – 2021. – Vol. 35. – № 11. – P. e6410.
36. Sunahara H. et al. Design and synthesis of a library of BODIPY-based environmental polarity sensors utilizing photoinduced electron-transfer-controlled fluorescence ON/OFF switching // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007. – Vol. 129. – № 17. – P. 5597–5604.
37. Vodyanova O.S. et al. BODIPY dyes in bio environment: Spectral characteristics and possibilities for practical application // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* – 2018. – Vol. 350. – P. 44–51.
38. Marfin Y.S. et al. Effect of π -Extended Substituents on Photophysical Properties of BODIPY Dyes in Solutions // *J. Fluoresc.* – 2016. – Vol. 26. – № 6. – P. 1975–1985.
39. Li Q., Wang C., Qian Y. BODIPY-Triphenylamine with conjugated pyridines and a quaternary pyridium salt: Synthesis, aggregation-induced red emission and interaction with bovine serum albumin // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* – 2017. – Vol. 346. – P. 311–317.
40. Zheng Q., Xu G., Prasad P.N. Conformationally restricted dipyrromethene boron difluoride (BODIPY) dyes: Highly fluorescent, multicolored probes for cellular imaging // *Chem. - A Eur. J.* – 2008. – Vol. 14. – № 19. – P. 5812–5819.
41. Jiao L. et al. Long wavelength red fluorescent dyes from 3,5-diiodo-BODIPYs // *Org. Biomol. Chem.* – 2010. – Vol. 8. – № 11. – P. 2517–2519.
42. Uppal T. et al. Synthesis, computational modeling, and properties of benzo-appended BODIPYs // *Chem. - A Eur. J.* – 2012. – Vol. 18. – № 13. – P. 3893–3905.
43. Jiang X.D. et al. A NIR BODIPY dye bearing 3,4,4a-trihydroxanthene moieties // *Org. Biomol.*

- Chem. – 2012. – Vol. 10. – № 34. – P. 6861–6865.
44. Courtis A.M. et al. Monoalkoxy BODIPYs-A fluorophore class for bioimaging // *Bioconjug. Chem.* – 2014. – Vol. 25. – № 6. – P. 1043–1051.
 45. Hendricks J.A. et al. Synthesis of [¹⁸F]BODIPY: Bifunctional reporter for hybrid optical/positron emission tomography imaging // *Angew. Chemie - Int. Ed.* – 2012. – Vol. 51. – № 19. – P. 4603–4606.
 46. Ni Y. et al. Meso-ester and carboxylic acid substituted BODIPYs with far-red and near-infrared emission for bioimaging applications // *Chem. - A Eur. J.* – 2014. – Vol. 20. – № 8. – P. 2301–2310.
 47. Zhang S. et al. A BODIPY-based fluorescent dye for mitochondria in living cells, with low cytotoxicity and high photostability // *Org. Biomol. Chem.* – 2013. – Vol. 11. – № 4. – P. 555–558.
 48. Jiang N. et al. A near-infrared dye based on BODIPY for tracking morphology changes in mitochondria // *Chem. Commun.* – 2013. – Vol. 49. – № 90. – P. 10620–10622.
 49. Gao T. et al. BODIPY-based fluorescent probes for mitochondria-targeted cell imaging with superior brightness, low cytotoxicity and high photostability // *Dye. Pigment.* – 2017. – Vol. 141. – P. 530–535.
 50. Shen B. et al. Construction of a red emission BODIPY-based probe for tracing lysosomal viscosity changes in culture cells // *Sensors Actuators, B Chem.* – 2020. – Vol. 304. – P. 127271.
 51. LysoTracker™ Green DND-26 - Special Packaging [Electronic resource]. URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L7526> (accessed: 27.07.2022).
 52. LysoTracker™ Red DND-99 - Special Packaging [Electronic resource]. URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L7528> (accessed: 27.07.2022).
 53. ER-Tracker™ Green (BODIPY™ FL Glibenclamide), for live-cell imaging [Electronic resource]. URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/E34251> (accessed: 27.07.2022).
 54. ER-Tracker™ Red (BODIPY™ TR Glibenclamide), for live-cell imaging [Electronic resource]. URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/E34250> (accessed: 27.07.2022).
 55. Boens N., Leen V., Dehaen W. Fluorescent indicators based on BODIPY // *Chem. Soc. Rev.* – 2012. – Vol. 41. – № 3. – P. 1130–1172.
 56. Liu Y. et al. Fluorescence behavior of a unique two-photon fluorescent probe in aggregate and solution states and highly sensitive detection of RNA in water solution and living systems // *Chem. Commun.* – 2016. – Vol. 52. – № 57. – P. 8838–8841.

57. Liu Y. et al. Simultaneous Imaging of Ribonucleic Acid and Hydrogen Sulfide in Living Systems with Distinct Fluorescence Signals Using a Single Fluorescent Probe // *Adv. Sci.* – 2018. – Vol. 5. – № 7. – P. 1700966.
58. Hao G., Sun J., Wei C. Studies on interactions of carbazole derivatives with DNA, cell image, and cytotoxicity // *Bioorganic Med. Chem.* – 2018. – Vol. 26. – № 1. – P. 285–294.
59. Zhang X.F. et al. The binding modes of carbazole derivatives with telomere G-quadruplex // *J. Mol. Struct.* – 2010. – Vol. 982. – № 1–3. – P. 133–138.
60. Chang C.C., Wu J.Y., Chang T.C. A Carbazole Derivative Synthesis for Stabilizing the Quadruplex Structure // *J. Chinese Chem. Soc.* – 2003. – Vol. 50. – № 2. – P. 185–188.
61. Zhu L.N. et al. A new cationic porphyrin derivative (TMPipEOPP) with large side arm substituents: A highly selective G-quadruplex optical probe // *PLoS One* – 2012. – Vol. 7. – № 5. – P. e35586.
62. Gao F. et al. An Off-On Two-Photon Carbazole-Based Fluorescent Probe: Highly Targeting and Super-Resolution Imaging of mtDNA // *Anal. Chem.* – 2019. – Vol. 91. – № 5. – P. 3336–3341.
63. Ashley N., Poulton J. Anticancer DNA intercalators cause p53-dependent mitochondrial DNA nucleoid re-modelling // *Oncogene* 2009 2844 – 2009. – Vol. 28. – № 44. – P. 3880–3891.
64. Jean S.R. et al. Peptide-Mediated Delivery of Chemical Probes and Therapeutics to Mitochondria // *Acc. Chem. Res.* – 2016. – Vol. 49. – № 9. – P. 1893–1902.
65. Zhou K. et al. Development of a viscosity sensitive fluorescent probe for real-time monitoring of mitochondria viscosity // *New J. Chem.* – 2017. – Vol. 41. – № 20. – P. 11507–11511.
66. Wang M.Q. et al. Development of a carbazole-based fluorescence probe for G-quadruplex DNA: The importance of side-group effect on binding specificity // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2018. – Vol. 199. – P. 441–447.
67. Li J. et al. Carbazole derivative as an effective telomeric G-quadruplex DNA binder // *Tetrahedron Lett.* – 2021. – Vol. 70. – P. 153004.
68. Yu L., Li L., Fei X. Spectral study, stability and protein labeling of two Carbazole-Benzothiazole derivatives // *J. Lumin.* – 2014. – Vol. 149. – P. 28–34.
69. Yin J., Peng M., Lin W. Visualization of Mitochondrial Viscosity in Inflammation, Fatty Liver, and Cancer Living Mice by a Robust Fluorescent Probe // *Anal. Chem.* – 2019. – Vol. 91. – № 13. – P. 8415–8421.
70. Ge J. et al. A two-photon ratiometric fluorescent probe for effective monitoring of lysosomal pH in live cells and cancer tissues // *Sensors Actuators, B Chem.* – 2018. – Vol. 262. – P. 913–921.
71. Zhu H. et al. Imaging of lysosomal pH changes with a fluorescent sensor containing a novel lysosome-locating group // *Chem. Commun.* – 2012. – Vol. 48. – № 96. – P. 11766–11768.
72. Yin J. et al. A versatile small-molecule fluorescence scaffold: Carbazole derivatives for

- bioimaging // *Coord. Chem. Rev.* – 2020. – Vol. 412. – P. 213257.
73. Borges F. et al. Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity // *Curr. Med. Chem.* – 2005. – Vol. 12. – № 8. – P. 887–916.
74. Witaicenis A. et al. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives // *Phytomedicine* – 2014. – Vol. 21. – № 3. – P. 240–246.
75. Gacche R.N., Jadhav S.G. Antioxidant Activities and Cytotoxicity of Selected Coumarin Derivatives: Preliminary Results of a Structure–Activity Relationship Study Using Computational Tools // *J. Exp. Clin. Med.* – 2012. – Vol. 4. – № 3. – P. 165–169.
76. Kostova I. et al. Coumarins as Antioxidants // *Curr. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 18. – № 25. – P. 3929–3951.
77. Sarwar T. et al. Interaction of coumarin with calf thymus DNA: Deciphering the mode of binding by in vitro studies // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2015. – Vol. 73. – № 1. – P. 9–16.
78. Bayraktutan T., Onganer Y. Spectral-luminescent study of coumarin 35 as fluorescent “light-up” probe for BSA and DNA monitoring // *Dye. Pigment.* – 2017. – Vol. 142. – P. 62–68.
79. Chemchem M. et al. Substituent dependent selectivity of fluorescent chemosensors derived from coumarin for biologically relevant DNA structures and anions // *Sensors Actuators B Chem.* – 2020. – Vol. 305. – P. 127316.
80. Akbay N. et al. Fluorescence study on the interaction of bovine serum albumin with two coumarin derivatives // *J. Anal. Chem.* – 2010. – Vol. 65. – № 4. – P. 382–387.
81. Zhong X. et al. A mitochondria-targeted fluorescent probe based on coumarin-pyridine derivatives for hypochlorite imaging in living cells and zebrafish // *J. Mater. Chem. B* – 2019. – Vol. 7. – № 46. – P. 7332–7337.
82. Sun X.Y. et al. Synthesis and application of coumarin fluorescence probes // *RSC Adv.* – 2020. – Vol. 10. – № 18. – P. 10826–10847.
83. Carneiro A. et al. Trending Topics on Coumarin and Its Derivatives in 2020 // *Mol.* – 2021. – Vol. 26. – № 2. – P. 501.
84. Ortega-Forte E. et al. COUPY Coumarins as Novel Mitochondria-Targeted Photodynamic Therapy Anticancer Agents // *J. Med. Chem.* – 2021. – Vol. 64. – № 23. – P. 17209–17220.
85. Belmont L.D. et al. Real-time visualization of cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in cytoplasmic extracts // *Cell* – 1990. – Vol. 62. – № 3. – P. 579–589.
86. Chen X. et al. Fluorescent chemosensors based on spiroring-opening of xanthenes and related derivatives // *Chem. Rev.* – 2012. – Vol. 112. – № 3. – P. 1910–1956.
87. Wysocki L.M. et al. Facile and General Synthesis of Photoactivatable Xanthene Dyes // *Angew. Chemie* – 2011. – Vol. 123. – № 47. – P. 11402–11405.
88. Beija M., Afonso C.A.M., Martinho J.M.G. Synthesis and applications of Rhodamine

- derivatives as fluorescent probes // *Chem. Soc. Rev.* – 2009. – Vol. 38. – № 8. – P. 2410–2433.
89. Shi W. et al. Imaging different interactions of mercury and silver with live cells by a designed fluorescence probe rhodamine b selenolactone // *Inorg. Chem.* – 2010. – Vol. 49. – № 3. – P. 1206–1210.
90. Moon K.S. et al. Aminoxy-linked rhodamine hydroxamate as fluorescent chemosensor for Fe³⁺ in aqueous media // *Tetrahedron Lett.* – 2010. – Vol. 51. – № 25. – P. 3290–3293.
91. Islam M.M. et al. Binding of DNA with Rhodamine B: Spectroscopic and molecular modeling studies // *Dye. Pigment.* – 2013. – Vol. 99. – № 2. – P. 412–422.
92. Masum A. Al et al. Thermodynamic study of rhodamine 123-calf thymus DNA interaction: Determination of calorimetric enthalpy by optical melting study // *J. Phys. Chem. B* – 2014. – Vol. 118. – № 46. – P. 13151–13161.
93. Al Masum A. et al. Biochemical activity of a fluorescent dye rhodamine 6G: Molecular modeling, electrochemical, spectroscopic and thermodynamic studies // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* – 2016. – Vol. 164. – P. 369–379.
94. Chen H. et al. Chemiluminescence determination of ultramicro DNA with a flow-injection method // *Anal. Chim. Acta* – 2003. – Vol. 478. – № 1. – P. 31–36.
95. Hasegawa T. et al. A highly sensitive probe detecting low pH area of HeLa cells based on rhodamine B modified β -cyclodextrins // *Bioorg. Med. Chem.* – 2009. – Vol. 17. – № 16. – P. 6015–6019.
96. Bucki R. et al. Antibacterial Activities of Rhodamine B-Conjugated Gelsolin-Derived Peptides Compared to Those of the Antimicrobial Peptides Cathelicidin LL37, Magainin II, and Melittin // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2004. – Vol. 48. – № 5. – P. 1526–1533.
97. Emaus R.K., Grunwald R., Lemasters J.J. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* – 1986. – Vol. 850. – № 3. – P. 436–448.
98. Perrière N. et al. A functional in vitro model of rat blood–brain barrier for molecular analysis of efflux transporters // *Brain Res.* – 2007. – Vol. 1150. – № 1. – P. 1–13.
99. Troutman M.D., Thakker D.R. Rhodamine 123 Requires Carrier-Mediated Influx for Its Activity as a P-Glycoprotein Substrate in Caco-2 Cells // *Pharm. Res.* 2003 208 – 2003. – Vol. 20. – № 8. – P. 1192–1199.
100. Gupta R.S., Dudani A.K. Species-specific differences in the toxicity of rhodamine 123 toward cultured mammalian cells // *J. Cell. Physiol.* – 1987. – Vol. 130. – № 3. – P. 321–327.
101. Timtcheva I. et al. New asymmetric monomethine cyanine dyes for nucleic-acid labelling: Absorption and fluorescence spectral characteristics // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* – 2000. – Vol. 130. – № 1. – P. 7–11.

102. Deligeorgiev T.G. et al. Preparation of intercalating dye thiazole orange and derivatives // *Dye. Pigment.* – 1995. – Vol. 29. – № 4. – P. 315–322.
103. Massey M. et al. Challenges in the Design of Optical DNA Biosensors // *Front. Chem. Sensors* – 2005. – Vol. 3. – P. 227–260.
104. Yarmoluk S.M. et al. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids: XXVI. Intercalation of the trimethine cyanine dye Cyan 2 into double-stranded DNA: Study by spectral luminescence methods // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2002. – Vol. 58. – № 14. – P. 3223–3232.
105. Bordelon J.A. et al. Viscometry and atomic force microscopy studies of the interactions of a dimeric cyanine dye with DNA // *J. Phys. Chem. B* – 2002. – Vol. 106. – № 18. – P. 4838–4843.
106. Harvey B.J., Perez C., Levitus M. DNA sequence-dependent enhancement of Cy3 fluorescence // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2009. – Vol. 8. – № 8. – P. 1105–1110.
107. Yarmoluk S.M. et al. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. XII. β -substituted carbocyanines as possible fluorescent probes for nucleic acids detection // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* – 1999. – Vol. 9. – № 12. – P. 1677–1678.
108. Peng X. et al. An Effective Minor Groove Binder as a Red Fluorescent Marker for Live-Cell DNA Imaging and Quantification // *Angew. Chemie Int. Ed.* – 2011. – Vol. 50. – № 18. – P. 4180–4183.
109. Zhang S. et al. A bright red fluorescent cyanine dye for live-cell nucleic acid imaging, with high photostability and a large Stokes shift // *J. Mater. Chem. B* – 2014. – Vol. 2. – № 18. – P. 2688–2693.
110. Kawabe Y., Kato S. Spectroscopic study of cyanine dyes interacting with the biopolymer, DNA // *Dye. Pigment.* – 2012. – Vol. 95. – № 3. – P. 614–618.
111. Kaloyanova S. et al. Synthesis and fluorescence characteristics of novel asymmetric cyanine dyes for DNA detection // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* – 2011. – Vol. 217. – № 1. – P. 147–156.
112. Glavaš-Obrovac L. et al. Minor structural differences of monomethine cyanine derivatives yield strong variation in their interactions with DNA, RNA as well as on their in vitro antiproliferative activity // *Bioorg. Med. Chem.* – 2009. – Vol. 17. – № 13. – P. 4747–4755.
113. Deligeorgiev T. et al. Styryl dyes—synthesis and applications during the last 15 years // *Color. Technol.* – 2010. – Vol. 126. – № 2. – P. 55–80.
114. Berdnikova D. V. et al. Governing the DNA-binding mode of styryl dyes by the length of their alkyl substituents—from intercalation to major groove binding // *Org. Biomol. Chem.* – 2018. – Vol. 16. – № 4. – P. 545–554.

115. Botti V. et al. Fine structural tuning of styryl-based dyes for fluorescence and CD-based sensing of various ds-DNA/RNA sequences // *Org. Biomol. Chem.* – 2019. – Vol. 17. – № 35. – P. 8243–8258.
116. Abeywickrama C.S. et al. NIR-emitting benzothiazolium cyanines with an enhanced Stokes shift for mitochondria imaging in live cells // *Org. Biomol. Chem.* – 2018. – Vol. 16. – № 18. – P. 3382–3388.
117. Bertman K.A., Abeywickrama C.S., Pang Y. A NIR Emitting Cyanine with Large Stokes' Shift for Mitochondria and Identification of their Membrane Potential Disruption // *ChemBioChem* – 2022. – Vol. 23. – № 2. – P. e202100516.
118. Abeywickrama C.S. et al. Synthesis of highly selective lysosomal markers by coupling 2-(2'-hydroxyphenyl)benzothiazole (HBT) with benzothiazolium cyanine (Cy): the impact of substituents on selectivity and optical properties // *J. Mater. Chem. B* – 2019. – Vol. 7. – № 47. – P. 7502–7514.
119. Abeywickrama C.S., Baumann H.J., Pang Y. Simultaneous Visualization of Mitochondria and Lysosome by a Single Cyanine Dye: The Impact of the Donor Group (-NR₂) Towards Organelle Selectivity // *J. Fluoresc.* – 2021. – Vol. 31. – № 5. – P. 1227–1234.
120. Zhou J. et al. A Lysosome-Targeting Fluorescence Off-On Probe for Imaging of Nitroreductase and Hypoxia in Live Cells // *Chem. – An Asian J.* – 2016. – Vol. 11. – № 19. – P. 2719–2724.
121. Yapici N.B. et al. Highly stable and sensitive fluorescent probes (LysoProbes) for lysosomal labeling and tracking // *Sci. Rep.* – 2015. – Vol. 5. – № 1. – P. 1-8.
122. Abeywickrama C.S. Large Stokes shift benzothiazolium cyanine dyes with improved intramolecular charge transfer (ICT) for cell imaging applications // *Chem. Commun.* – 2022. – Vol. 58. – № 71. – P. 9855–9869.
123. Abeywickrama C.S. et al. The Unexpected Selectivity Switching from Mitochondria to Lysosome in a D- π -A Cyanine Dye // *Biosens.* – 2022. – Vol. 12. – № 7. – P. 504.
124. Abeywickrama C.S. et al. Albumin-induced large fluorescence turn ON in 4-(diphenylamino)benzothiazolium dyes for clinical applications in protein detection // *Sensors Actuators B Chem.* – 2022. – Vol. 368. – P. 132199.
125. Čipor I. et al. Structure-dependent mitochondria or lysosome-targeting styryl fluorophores bearing remarkable Stokes shift // *Dye. Pigment.* – 2022. – Vol. 206. – P. 110626.
126. Terpetschnig E., Szmecinski H., Lakowicz J.R. An investigation of squaraines as a new class of fluorophores with long-wavelength excitation and emission // *J. Fluoresc.* – 1993. – Vol. 3. – № 3. – P. 153–155.
127. Yagi S., Nakazumi H. Squarylium Dyes and Related Compounds // *Heterocycl. Polymethine Dye.* – 2008. – Vol. 14. – P. 133–181.

128. Welder F. et al. Symmetric and asymmetric squarylium dyes as noncovalent protein labels: a study by fluorimetry and capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. B* – 2003. – Vol. 793. – № 1. – P. 93–105.
129. Lin X. et al. Asymmetric Mono- and Bis-Squarylium Dyes as Pre-Column and On-Column Labels for Protein Analysis by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection // *J. Anal. Bioanal. Tech.* – 2012. – Vol. 6. – № 13. – P. 1–7.
130. Li J. et al. A Difunctional Squarylium Indocyanine Dye Distinguishes Dead Cells through Diverse Staining of the Cell Nuclei/Membranes // *Small* – 2014. – Vol. 10. – № 7. – P. 1351–1360.
131. Mahmood T., Paul A., Ladame S. Synthesis and spectroscopic and DNA-binding properties of fluorogenic acridine-containing cyanine dyes // *J. Org. Chem.* – 2010. – Vol. 75. – № 1. – P. 204–207.
132. Ji C. et al. An amphiphilic squarylium indocyanine dye for long-term tracking of lysosomes // *J. Mater. Chem. B* – 2015. – Vol. 3. – № 38. – P. 7494–7498.
133. Rasmussen S.C., Evenson S.J., McCausland C.B. Fluorescent thiophene-based materials and their outlook for emissive applications // *Chem. Commun.* – 2015. – Vol. 51. – № 22. – P. 4528–4543.
134. Cheng X. et al. Fluorescent and colorimetric probes for mercury(II): Tunable structures of electron donor and π -conjugated bridge // *Chem. - A Eur. J.* – 2012. – Vol. 18. – № 6. – P. 1691–1699.
135. Barbarella G., Melucci M., Sotgiu G. The versatile thiophene: An overview of recent research on thiophene-based materials // *Adv. Mater.* – 2005. – Vol. 17. – № 13. – P. 1581–1593.
136. Fernandes R.S. et al. A Comprehensive Review on Thiophene Based Chemosensors // *J. Fluoresc.* – 2022. – Vol. 32. – № 1. – P. 19–56.
137. Deng K. et al. A nucleic acid-specific fluorescent probe for nucleolus imaging in living cells // *Talanta* – 2019. – Vol. 192. – P. 212–219.
138. López-Duarte I. et al. Thiophene-based dyes for probing membranes // *Org. Biomol. Chem.* – 2015. – Vol. 13. – № 12. – P. 3792–3802.
139. Tian X. et al. Mild acidic-enhanced mitochondrial-targeting by a neutral thiophene based terpyridine molecule with large two-photon action cross-section // *Dye. Pigment.* – 2017. – Vol. 139. – P. 431–439.
140. Capodilupo A.L. et al. Thiophene-based fluorescent probes with low cytotoxicity and high photostability for lysosomes in living cells // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* – 2015. – Vol. 1850. – № 2. – P. 385–392.
141. Baek Y. et al. A viscosity sensitive fluorescent dye for real-time monitoring of mitochondria

- transport in neurons // *Biosens. Bioelectron.* – 2016. – Vol. 86. – P. 885–891.
142. Yang Z. et al. Macro-/micro-environment-sensitive chemosensing and biological imaging // *Chem. Soc. Rev.* – 2014. – Vol. 43. – № 13. – P. 4563–4601.
143. Tian R. et al. Development of chromenoquinoline-fused coumarin dyes and their application in bioimaging // *Dye. Pigment.* – 2022. – Vol. 205. – P. 110530.
144. Eserci H. et al. Naphthalimide-BODIPY dyads: Synthesis, characterization, photophysical properties, live cell imaging and antimicrobial effect // *J. Mol. Struct.* – 2022. – Vol. 1265. – P. 133440.
145. Poddar M. et al. 1,8-Naphthalimide-Substituted BODIPY Dyads: Synthesis, Structure, Properties, and Live-Cell Imaging // *Chem. - An Asian J.* – 2018. – Vol. 13. – № 19. – P. 2881–2890.
146. Ordóñez-Hernández J. et al. A series of dual-responsive Coumarin-Bodipy probes for local microviscosity monitoring // *Dye. Pigment.* – 2018. – Vol. 157. – P. 305–313.
147. Yang Z. et al. A self-calibrating bipartite viscosity sensor for mitochondria // *J. Am. Chem. Soc.* – 2013. – Vol. 135. – № 24. – P. 9181–9185.
148. Ren M. et al. Construction of a ratiometric two-photon fluorescent probe to monitor the changes of mitochondrial viscosity // *Sensors Actuators, B Chem.* – 2018. – Vol. 262. – P. 452–459.
149. Jiménez-Sánchez A., Lei E. K., Kelley S. O. A multifunctional chemical probe for the measurement of local micropolarity and microviscosity in mitochondria // *Angew. Chem., Int. Ed.* – 2018. – Vol. 57. – № 29. – P. 8891–8895.
150. Xu X. et al. Photophysical properties of polyphenylphenyl compounds in aqueous solutions and application of their nanoparticles for nucleobase sensing // *J. Mater. Chem.* – 2008. – Vol. 18. – № 22. – P. 2555.
151. Liu X., Xu Z., Cole J.M. Molecular Design of UV–vis Absorption and Emission Properties in Organic Fluorophores: Toward Larger Bathochromic Shifts, Enhanced Molar Extinction Coefficients, and Greater Stokes Shifts // *J. Phys. Chem. C* – 2013. – Vol. 117. – № 32. – P. 16584–16595.
152. Rin Jean S. et al. Molecular vehicles for mitochondrial chemical biology and drug delivery // *ACS Chem. Biol.* – 2014. – Vol. 9. – № 2. – P. 323–333.
153. Wang M.Q. et al. Synthesis, G-Quadruplex DNA binding and cytotoxic properties of naphthalimide substituted styryl dyes // *Bioorg. Med. Chem.* – 2020. – Vol. 28. – № 5. – P. 115325.
154. Wei A.P., Herron J.N. Bifluorophoric molecules as fluorescent beacons for antibody–antigen binding // *J. Mol. Recognit.* – 2002. – Vol. 15. – № 5. – P. 311–320.
155. Ustimova M.A. et al. FRET-based metal ion sensing by a crown-containing bisstyryl dye // *New*

- J. Chem. – 2018. – Vol. 42. – № 10. – P. 7908–7913.
156. Panchenko P.A. et al. Ratiometric detection of mercury (II) ions in living cells using fluorescent probe based on bis(styryl) dye and azadithia-15-crown-5 ether receptor // *Sensors (Switzerland)* – 2021. – Vol. 21. – № 2. – P. 1–15.
157. Ustimova M.A. et al. Helical aggregates of bis(styryl) dyes formed by DNA templating // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* – 2021. – Vol. 418. – P. 113378.
158. Ustimova M.A. et al. Fluorescence turn-on probes for intracellular DNA/RNA distribution based on asymmetric bis(styryl) dyes // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2022. – Vol. 279. – P. 121446.
159. Berdnikova D. V. et al. Supramolecular tuning of energy transfer efficiency and direction in a bis(styryl) dye–crown ether conjugate // *Dye. Pigment.* – 2018. – Vol. 151. – P. 227–232.
160. Jedrzejewska B., Kabatc J., Paczkowski J. 1,3-Bis[4-(p-aminostyryl)-pyridinyl]-propane dibromide derivatives: Synthesis and spectroscopic investigation // *Dye. Pigment.* – 2007. – Vol. 73. – № 3. – P. 361–367.
161. Stewart J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: More modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters // *J. Mol. Model.* – 2013. – Vol. 19. – № 1. – P. 1–32.
162. Lakowicz J. R. Principles of fluorescent spectroscopy. – New York: Springer Science & Business Media, 2006. – 954 p.
163. Tulyakova E. V. et al. Effect of arrangement of the styryl fragment on the optical properties and complexation of mono- and bis(styryl)-substituted N-methylpyridinium perchlorates containing benzo-15-crown-5 ether moieties // *Russ. Chem. Bull.* – 2007. – Vol. 56. – № 11. – P. 2166–2174.
164. Tulyakova E. et al. Multimodal metal cation sensing with bis(macrocyclic) dye // *Chem. - A Eur. J.* – 2011. – Vol. 17. – № 38. – P. 10752–10762.
165. Berdnikova D. V., Fedorov Y. V., Fedorova O.A. Azadithiacrown ether based ditopic receptors capable of simultaneous multi-ionic recognition of Ag^+ and Hg^{2+} // *Dye. Pigment.* – 2013. – Vol. 96. – № 1. – P. 287–295.
166. Maeder M., Zuberbühler A.D. Nonlinear least-squares fitting of multivariate absorption data // *Anal. Chem.* – 2002. – Vol. 74. – № 20. – P. 2220–2224.
167. Gampp H. et al. Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data—II32, 95.: Specfit: two user-friendly programs in basic and standard fortran 77 // *Talanta* – 1985. – Vol. 32. – № 4. – P. 257–264.
168. Hou H. et al. Single-cell pH imaging and detection for pH profiling and label-free rapid identification of cancer-cells // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 1–8.

169. Efremenko A. V. et al. Chlorin e6 fused with a cobalt-bis(dicarbollide) nanoparticle provides efficient boron delivery and photoinduced cytotoxicity in cancer cells // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2014. – Vol. 13. – № 1. – P. 92–102.
170. Panchenko P.A. et al. A novel bacteriochlorin-styrylnaphthalimide conjugate for simultaneous photodynamic therapy and fluorescence imaging // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2017. – Vol. 19. – № 44. – P. 30195–30206.
171. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R. Y. A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties // *J. Biol. Chem.* – 1985. – Vol. 260. – P. 3440–3450.
172. Loock H.-P., Wentzell P. D. Detection limits of chemical sensors: Applications and misapplications // *Sens. Actuators B.* – 2012. – Vol. 173. – P. 157–163.
173. Chen G.-H., Chen W.-Y., Yen Y.-C., Wang C.-W., Chang H.-T., Chen C.-F. Detection of Mercury(II) Ions Using Colorimetric Gold Nanoparticles on Paper-Based Analytical Devices // *Anal. Chem.* – 2014. – Vol. 86. – P. 6843–6849.
174. Zhao M. et al. A reaction-type receptor for the multi-feature detection of Hg²⁺ in water and living cells // *New J. Chem.* – 2020. – Vol. 44. – № 29. – P. 12538–12545.
175. Sahoo D., Bhattacharya P., Chakravorti S. Quest for mode of binding of 2-(4-(dimethylamino)styryl)-1-methylpyridinium iodide with calf thymus DNA // *J. Phys. Chem. B* – 2010. – Vol. 114. – № 5. – P. 2044–2050.
176. Nordén B., Kurucsev T. Analysing DNA complexes by circular and linear dichroism // *Journal of Molecular Recognition* 1994. – Vol. 7. – № 2. – P. 141–155.
177. Eriksson M., Nordén B. Linear and circular dichroism of drug-nucleic acid complexes // *Methods Enzymol.* – 2001. – Vol. 340. – P. 68–98.
178. Rodger A. et al. Multiple DNA binding modes of anthracene-9-carbonyl-N1-spermine // *Bioorganic Med. Chem.* – 1995. – Vol. 3. – № 6. – P. 861–872.
179. Seifert J.L. et al. Spontaneous assembly of helical cyanine dye aggregates on DNA nanotemplates // *J. Am. Chem. Soc.* – 1999. – Vol. 121. – № 13. – P. 2987–2995.
180. Snatzke G. Circular Dichroism: An Introduction // *Circ. Dichroism Princ. Appl.* – 2000. – Vol. 2. – P. 1–35.
181. Kim S.K., Nordén B. Methyl green // *FEBS Lett.* – 1993. – Vol. 315. – № 1. – P. 61–64.
182. Pjura P.E., Grzeskowiak K., Dickerson R.E. Binding of Hoechst 33258 to the minor groove of B-DNA // *J. Mol. Biol.* – 1987. – Vol. 197. – № 2. – P. 257–271.
183. Sirajuddin M. et al. Synthesis, characterization, biological screenings and interaction with calf thymus DNA of a novel azomethine 3-((3,5-dimethylphenylimino)methyl) benzene-1,2-diol // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2012. – Vol. 94. – P. 134–142.
184. Khan E. et al. Discovery of a potent small molecule inhibiting Huntington's disease (HD)

- pathogenesis via targeting CAG repeats RNA and Poly Q protein // *Sci. Reports* – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 1–15.
185. Hare D.R. et al. Assignment of the non-exchangeable proton resonances of d(C-G-C-G-A-A-T-T-C-G-C-G) using two-dimensional nuclear magnetic resonance methods // *J. Mol. Biol.* – 1983. – Vol. 171. – № 3. – P. 319–336.
186. Lai H. et al. Symmetric cyanovinyl-pyridinium triphenylamine: a novel fluorescent switch-on probe for an antiparallel G-quadruplex // *Analyst* – 2014. – Vol. 139. – № 8. – P. 1834–1838.
187. Zheng B.X. et al. Rational design of Red fluorescent and selective G-quadruplex DNA sensing probes: The study of interaction signaling and the molecular structural relationship achieving high specificity // *Sensors Actuators B Chem.* – 2020. – Vol. 314. – P. 128075.
188. Krishan A., Dandekar P.D. DAPI fluorescence in nuclei isolated from tumors // *J. Histochem. Cytochem.* – 2005. – Vol. 53. – № 8. – P. 1033–1036.
189. Tulyakova E. V. et al. Synthesis, complexation, and E-Z photoisomerization of azadithiacrown-containing styryl dyes as new optical sensors for mercury cations // *Russ. Chem. Bull.* – 2007. – Vol. 56. – № 3. – P. 513–526.
190. Andryukhina E.N. et al. Synthesis and structures of azine-based crown-containing hetarylphenylethenes // *Russ. Chem. Bull.* 2005 547 – 2005. – Vol. 54. – № 7. – P. 1700–1709.
191. Brasselet S. et al. New octupolar star-shaped structures for quadratic nonlinear optics // *Chem. Mater.* – 1999. – Vol. 11. – № 7. – P. 1915–1920.
192. Li S.H. et al. Reversibly Tunable White-Light Emissions of Styrylpyridiniums with Cucurbiturils in Aqueous Solution // *Org. Lett.* – 2017. – Vol. 19. – № 24. – P. 6650–6653.
193. Pepitone M.F. et al. Synthesis and characterization of donor-acceptor chromophores for unidirectional electron transfer // *Org. Lett.* – 2007. – Vol. 9. – № 5. – P. 801–804.
194. Huang Y. et al. Photophysical studies on the mono- and dichromophoric hemicyanine dyes I. Photoelectric conversion from the dye modified ITO electrodes // *J. Phys. Chem. B* – 2002. – Vol. 106. – № 39. – P. 10020–10030.
195. Niu W. et al. Highly Selective Two-Photon Fluorescent Probe for Ratiometric Sensing and Imaging Cysteine in Mitochondria // *Anal. Chem.* – 2016. – Vol. 88. – № 3. – P. 1908–1914.
196. Lakshmanaperumal C.K. et al. Synthesis, crystal growth and characterisation of novel NLO material: 4-Hydroxy benzaldehyde-N-methyl-4-stilbazolium tosylate // *J. Cryst. Growth* – 2004. – Vol. 265. – № 1–2. – P. 260–265.
197. Kabatc J., Jędrzejewska B., Pączkowski J. New heterobicationic hemicyanine dyes: Synthesis, spectroscopic properties, and photoinitiating ability // *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* – 2006. – Vol. 44. – № 21. – P. 6345–6359.
198. Kele P. et al. Dual Labeling of Biomolecules by Using Click Chemistry: A Sequential Approach

- // *Angew. Chemie Int. Ed.* – 2009. – Vol. 48. – № 2. – P. 344–347.
199. Kele P. et al. Clickable fluorophores for biological labeling—with or without copper // *Org. Biomol. Chem.* – 2009. – Vol. 7. – № 17. – P. 3486–3490.
200. González-Olvera R. et al. Multicomponent Synthesis and Evaluation of New 1,2,3-Triazole Derivatives of Dihydropyrimidinones as Acidic Corrosion Inhibitors for Steel // *Mol.* – 2016. – Vol. 21. – № 2. – P. 250.
201. Bojtár M. et al. Supramolecular FRET modulation by pseudorotaxane formation of a ditopic stilbazolium dye and carboxylato-pillar[5]arene // *Dye. Pigment.* – 2016. – Vol. 133. – P. 415–423.
202. Tropcheva R. et al. Novel cyanine dyes and homodimeric styryl dyes as fluorescent probes for assessment of lactic acid bacteria cell viability // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* – 2015. – Vol. 143. – P. 120–129.
203. Reynolds G.A., Drexhage K.H. New coumarin dyes with rigidized structure for flashlamp-pumped dye lasers // *Opt. Commun.* – 1975. – Vol. 13. – № 3. – P. 222–225.
204. Renschler C.L., Harrah L.A. Determination of Quantum Yields of Fluorescence by Optimizing the Fluorescence Intensity // *Anal. Chem.* – 1983. – Vol. 55. – № 4. – P. 798–800.
205. Connors K.A. Binding constants: the measurement of molecular complex stability. – New York: John Wiley and Sons, 1987. – 411 p.
206. Beck M.T., Nagypál I. Chemistry of complex equilibria. – New York: John Wiley and Sons, 1990. – 402 p.
207. Федоров Ю. В., Федорова О. А., Панченко П. А. Современные фотометрические методы анализа органических веществ: учебно-методическое пособие. – Москва: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2015. – 36 с.
208. Ren J., Chaires J.B. Sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands // *Biochemistry* – 1999. – Vol. 38. – № 49. – P. 16067–16075.
209. Chaires J.B. Competition dialysis: an assay to measure the structural selectivity of drug-nucleic acid interactions // *Curr. Med. Chem. Agents* – 2005. – Vol. 5. – № 4. – P. 339–352.
210. Chaires J.B. Structural selectivity of drug-nucleic acid interactions probed by competition dialysis // *DNA Bind. Relat. Subj.* – 2005. – P. 33–53.
211. Parakhia M. V. Molecular biology & biotechnology : microbial methods. – NIPA, 2010. – 360 p.

7. СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ustimova M.A., Lebedeva A.Yu., Fedorov Yu.V., Berdnikova D.V., Fedorova O.A. FRET-based metal ion sensing by a crown-containing bisstyryl dye // *New J. Chem.* – 2018. – Vol. 42. – № 10. – P. 7908–7913.
2. Ruleva A.Y., Fedorov Yu.V., Aliev T.M., Novikov V.V., Shepel N.E., Ustimova M.A., Fedorova O.A. Multi-component interaction between bisstyryl dyes and cucurbit[7]uril // *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* – 2020. – Vol. 98. – № 3–4. – P. 249–259.
3. Ustimova M.A., Chernikova P.A., Shepel N.E., Fedorov Yu.V., Fedorova O.A. Effect of N-substituent in 4-styrylpyridinium dyes on their binding to DNA // *Mendeleev Commun.* – 2020. – Vol. 30. – № 2. – P. 217–219.
4. Ustimova M.A., Fedorov Yu.V., Tsvetkov V.I.B., Tokarev S.D., Shepel N.A., Fedorova O.A. Helical aggregates of bis(styryl) dyes formed by DNA templating // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* – 2021. – Vol. 418. – P. 113378.
5. Panchenko P.A., Efremenko A.V., Feofanov A.V., Ustimova M.A., Fedorov Yu.V., Fedorova O.A. Ratiometric Detection of Mercury (II) Ions in Living Cells Using Fluorescent Probe Based on Bis(styryl) Dye and Azadithia-15-Crown-5 Ether Receptor // *Sensors.* – 2021. – Vol. 21. – P. 470.
6. Ustimova M.A., Fedorov Yu.V., Chmelyuk N.S., Abakumov M.A., Fedorova O.A. Fluorescence turn-on probes for intracellular DNA/RNA distribution based on asymmetric bis(styryl) dyes // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2022. – Vol. 279. – P. 121446.
7. УСТИМОВА М.А., Федорова О.А. Синтез новых моностириловых красителей для получения пленок Ленгмюра-Блоджетт // *Успехи в химии и химической технологии.* – 2019. – Т. 33. – С. 27-29.
8. Грачев А.И., УСТИМОВА М.А., Черникова Е.Ю., Федоров Ю.В. Синтез N-замещенных стириловых красителей, содержащих фрагмент азадитиакраун-эфира // *Успехи в химии и химической технологии.* – 2018. – Т. 32. – С. 70-72.
9. УСТИМОВА М.А., Лебедева А.Ю., Федорова О.А. Синтез новых бисстириловых красителей // *Успехи в химии и химической технологии.* – 2017. – Т. 31. – С. 72-74.