

ФИО соискателя Уваров Денис Юрьевич

Название диссертации ***Новые BODIPY с карбо- и гетероциклическими фрагментами: синтез, фотофизические свойства и оценка возможности применения в биовизуализации***

Шифр специальности – 1.4.3. – органическая химия

Химические науки

Шифр диссертационного совета 24.1.092.01

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук

119991, Москва, Ленинский проспект, 47

Тел.:(499) 137-13-79

E-mail: sci-secr@ioc.ac.ru

Дата размещения полного текста диссертации на сайте Института <http://zioc.ru>

20 октября 2025 года

Дата приема к защите

22 октября 2025 года

Дата размещения автореферата на сайте ВАК <https://vak.minobrnauki.gov.ru>

23 октября 2025 года

на правах рукописи



УВАРОВ ДЕНИС ЮРЬЕВИЧ

**Новые BODIPY с карбо- и гетероциклическими фрагментами:
синтез, фотофизические свойства и оценка возможности
применения в биовизуализации**

1.4.3 – Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Лаборатории химии стероидных соединений №22
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ**Волкова Юлия Алексеевна**

кандидат химических наук, старший научный сотрудник
Лаборатории химии стероидных соединений (№22)
Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ**Бирин Кирилл Петрович**

доктор химических наук, профессор, ведущий научный
сотрудник Лаборатории Новых физико-химических
проблем Института физической химии и электрохимии
им. А.Н. Фрумкина РАН

Павлова Марина Александровна

кандидат химических наук, старший научный сотрудник
Лаборатории фотоактивных супрамолекулярных систем
Института элементоорганических соединений им. А.Н.
Несмеянова РАН

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ

ФГБУН Федеральный исследовательский центр
«Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского
Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ
ИрИХ СО РАН).

Защита диссертации состоится «24» декабря 2025 г. в 12³⁰ часов на заседании Диссертационного совета 24.1.092.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН по адресу: 119991 Москва, Ленинский проспект, 47. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН и на официальном сайте Института <http://zioc.ru>

Автореферат разослан «__» 2025 г.

Ваш отзыв в двух экземплярах, заверенный гербовой печатью, просим направлять по адресу: 119991 Москва, Ленинский проспект, 47, ученому секретарю Диссертационного совета ИОХ РАН.

Ученый секретарь диссертационного
совета 24.1.092.01 ИОХ РАН
доктор химических наук

Г.А. Газиева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В развитии современной биологии и биохимии ключевую роль играют синтетические органические красители, широко применяющиеся в качестве флуоресцентных маркеров. Флуоресцентная визуализация позволяет исследователям в реальном времени наблюдать динамику внутриклеточных взаимодействий, что невозможно при использовании традиционных методов микроскопии. Её преимуществом является возможность селективного мечения клеточных структур, таких как клеточные органеллы, белки или метаболиты. По сравнению с флуоресцентными белками и квантовыми точками флуоресцентные маркеры на основе синтетических органических красителей, как правило, характеризуются минимальным влиянием на функцию и локализацию целевых молекул/структур, а также высокой чувствительностью к параметрам микроокружения, таким как pH, вязкость, концентрация ионов или активность ферментов.

Флуоресцентные маркеры, как правило, состоят из сигнальной группы (флуорофор или хромофор) и рецепторного модуля, отвечающего за селективность накопления или связывания в клетке. Однако направленная разработка флуоресцентных маркеров, зачастую, затруднена низкой воспроизводимостью оптических характеристик красителей при переходе от исследований «в кювете» к экспериментам *in vivo*, что обусловлено гетерогенной природой клеточного микроокружения. Межмолекулярные взаимодействия, локальные изменения биохимических параметров (таких как pH и редокс-потенциал) или неспецифические взаимодействия с клеточными компонентами могут существенным образом влиять на отклик флуоресцентного маркера. В связи с чем актуальным в области разработки зондов с прогнозируемыми и улучшенными характеристиками для применения в живых системах остается систематическое изучение взаимосвязей структура-оптические свойства флуоресцентных красителей.

В последние годы было показано, что перспективной платформой для разработки флуоресцентных маркеров является флуорофор – 4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен (BODIPY). Помимо таких спектральных характеристик, как узкие полосы поглощения и испускания, высокие молярные коэффициенты экстинкции и квантовые выходы флуоресценции, этот класс соединений обладает широкими возможностями вариативности структур. Кроме того, важной особенностью BODIPY красителей является возможность направленной оптимизации их фотофизических характеристик за счет химической функционализации пиррольных фрагментов.

Цель работы. Синтез, исследование фотофизических свойств и оценка перспективности использования в качестве флуоресцентных маркеров новых производных BODIPY, модифицированных карбо- и гетероциклическими остатками, в том числе аза-макроциклическими, 1,3,4-тиадиазольными, бензаннелированными 1,3-азольными и стероидными.

Для достижения поставленных целей были сформулированы следующие **задачи исследования**:

- получение с использованием реакции восстановительного аминирования новых 2,6-замещённых аза-макроциклических производных BODIPY симметричного и асимметричного строения;
- получение с использованием реакции окислительного сочетания формил-BODIPY с биснуклеофилами широкой библиотеки производных BODIPY, замещённых по положениям 2 и 6 флуорофора 1,3,4-тиадиазольными и бензаннелированными 1,3-азольными остатками;

- изучение влияния функциональных групп, таких как циклен, 1,3,4-тиадиазол и бензаннелированный 1,3-азол, на фотофизические и сенсорные свойства 2(6)-замещённых BODIPY;
- изучение возможности создания на основе полученных цикленовых производных BODIPY флуоресцентных лизосомотропных маркеров, способных к агрегативно-индуцированной эмиссии;
- получение BODIPY производных нейростероида – аллопрегнанолонa, и изучение возможности их применения для флуоресцентной маркировки нейронов в тканях головного мозга.

Научная новизна и практическая значимость работы. Впервые проведено систематическое изучение влияния гетероциклических остатков, таких как аза-макроциклы, 1,3,4-тиадиазолы и бензаннелированные 1,3-азолы, в положениях 2 и 6 на оптические свойства красителя BODIPY. Впервые осуществлен синтез BODIPY, функционализированных через метиленовые мостики по положениям 2 и 6 флуорофора цикленовыми остатками, а также непосредственно замещённых по положению 2 бензоксазольным фрагментом. Путем рациональной модификации BODIPY аза-макроциклическими фрагментами были разработаны новые водорастворимые AIE-активные производные BODIPY. Впервые продемонстрирована общность метода синтеза BODIPY, модифицированных по положениям 2 и 6 флуорофора 1,3,4-тиадиазольными и бензаннелированными 1,3-азольными заместителями. Впервые продемонстрировано влияние функциональных заместителей в гетероциклических фрагментах, синтезированных производных BODIPY на сенсорные свойства красителей по отношению к pH, диэлектрической проницаемости и окислительно-восстановительным свойствам среды. Впервые показано, что введение флуорофора BODIPY в 21-положение нейростероидного ядра через аминокислотный линкер является эффективной стратегией создания флуоресцентных маркеров для визуализации нейронов головного мозга.

Предложен новый флуоресцентный маркер — 2-((1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-ил)метил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3a,4a-диаза-s-индацен, демонстрирующий избирательное накопление в лизосомах. Данный краситель обладает комплексом преимуществ, выделяющих его на фоне известных аналогов: высокой чувствительностью к параметрам микроокружения с линейным откликом на их изменения, сохранением стабильности в физиологическом диапазоне температур, биосовместимостью, хорошей водорастворимостью, а также устойчивостью к ионам металлов (K^+ , Na^+ и других), характерных для биологических сред. В ряду синтезированных конъюгатов аллопрегнанолонa с BODIPY идентифицировано соединение, выступающее в роли частичного агониста ГАМК_A-рецептора. Важным свойством данного производного является его способность к селективной визуализации клеток Пуркинье и нейрональных популяций в срезах гиппокампа, сохраняющаяся даже в условиях глиального окружения (астроциты). Это открывает перспективы для создания на его основе инструментов для изучения фундаментальных процессов поглощения, внутриклеточного транспорта и биотрансформации нейростероидов.

Публикации. По материалам исследования опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых Web of Science и Scopus и входящих в список ВАК, а также 4 тезиса докладов всероссийских и международных конференций.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на международных и российских научных конференциях: конференция «Динамические процессы в химии элементоорганических соединений» (Казань, 2022); X Научная конференция Института органической химии им. Зелинского (Москва, 2023); XXVII Российская молодёжная конференция

химиков (Нижний Новгород, 2024); XI Всероссийская молодежная школа-конференция «Химия, физика, биология: пути интеграции» (Москва, 2025); XI Молодежная конференция Института органической химии им. Зелинского (Москва, 2025).

Объем и структура работы. Диссертационная работа состоит из 7 разделов: введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка литературы и приложения. Материал диссертации изложен на 191 странице машинописного текста и содержит 67 рисунков, 12 схем, 7 таблиц. Список цитируемой литературы насчитывает 202 наименования.

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю с.н.с., к.х.н. Ю.А. Волковой за чуткое руководство, помощь и поддержку на всех этапах научной работы. Автор выражает признательность всем коллегам, принявшим участие в исследовании, а также особую благодарность к.б.н. Д.В. Самигуллину, к.б.н. А.М. Щербакову и к.ф.-м.н. С.Н. Колбаеву за проведение экспериментов по флуоресцентной визуализации. Диссертационное исследование частично выполнено при финансовой поддержке грантов РНФ (№ 22-13-00161, 22-13-00161-П, №25-23-00303).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В диссертации представлены результаты разработки методов синтеза, исследования фотофизических свойств и оценки перспектив применения в биовизуализации новых производных 4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-с-индацена (BODIPY) **I–III** (Рис. 1). В качестве “рецепторных модулей” в этих соединениях использованы следующие карбо- и гетероциклические фрагменты: макроциклический pH-чувствительный амин — циклен (структура **I**), замещённые 1,3,4-тиадиазолы и 1,3-бензазолы (структуры **II**), а также природный нейростероид — аллопрегнанолон (структура **III**).

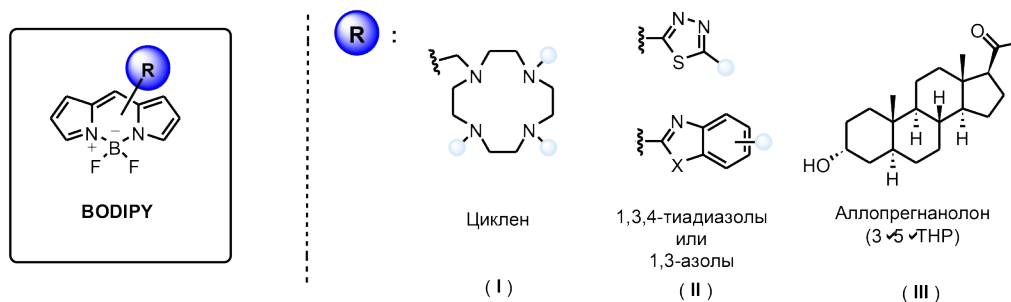


Рисунок 1. Производные BODIPY с карбо- и гетероциклическими фрагментами.

Результаты работы изложены в трёх разделах. В первом разделе описан синтез и исследование фотофизических свойств первых AIE-активных цикленовых производных BODIPY **I**. Показана перспективность их применения в качестве флуоресцентных красителей для селективной визуализации лизосом в клетках HeLa. Во втором разделе приведены результаты синтеза и систематического изучения фотофизических свойств впервые полученных C2/C6-производных BODIPY **II**, модифицированных 1,3,4-тиадиазольными и бензаннелированными 1,3-азольными заместителями. В третьем разделе обсуждаются синтез, биологическая активность и применение для визуализации нейронов в срезах тканей головного мозга ранее неизвестного производного аллопрегнанолон **III**, меченного флуорофором BODIPY.

I. AIE-активные цикленовые производные BODIPY

Аза-макроциклические производные BODIPY **I** (далее AM-BODIPY) были впервые получены методом восстановительного аминирования формил-BODIPY **1**^{1,2} цикленами **3,4** (Схема 1). Показано, что варьирование соотношения реагентов и заместителей при атомах азота макроцикла позволяет получать обширный структурный ряд красителей, включая соединения симметричного, несимметричного, линейного, циклического, димерного и полимерного строения. Оптимальным было найдено использование избытка аза-макроцикла в присутствии триацетоксиборгидрида натрия и уксусной кислоты в дихлорэтано при комнатной температуре. С использованием отработанных условий серия красителей AM-BODIPY, включающая линейные структуры состава (циклен)_{1+n}(BODIPY)_{1+m} **5a-b**, **6**, **8a-d**, а также макроцикл **9** (Схема 1b,c), была синтезирована с выходами от 2 до 50%. Низкие выходы были связаны с образованием побочных продуктов, что затрудняло выделение целевых соединений в аналитически чистом виде. Все продукты были получены с использованием препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии в виде трифторацетатных солей.

¹ Нумерация соединений в автореферате соответствует нумерации, принятой в диссертационной работе.

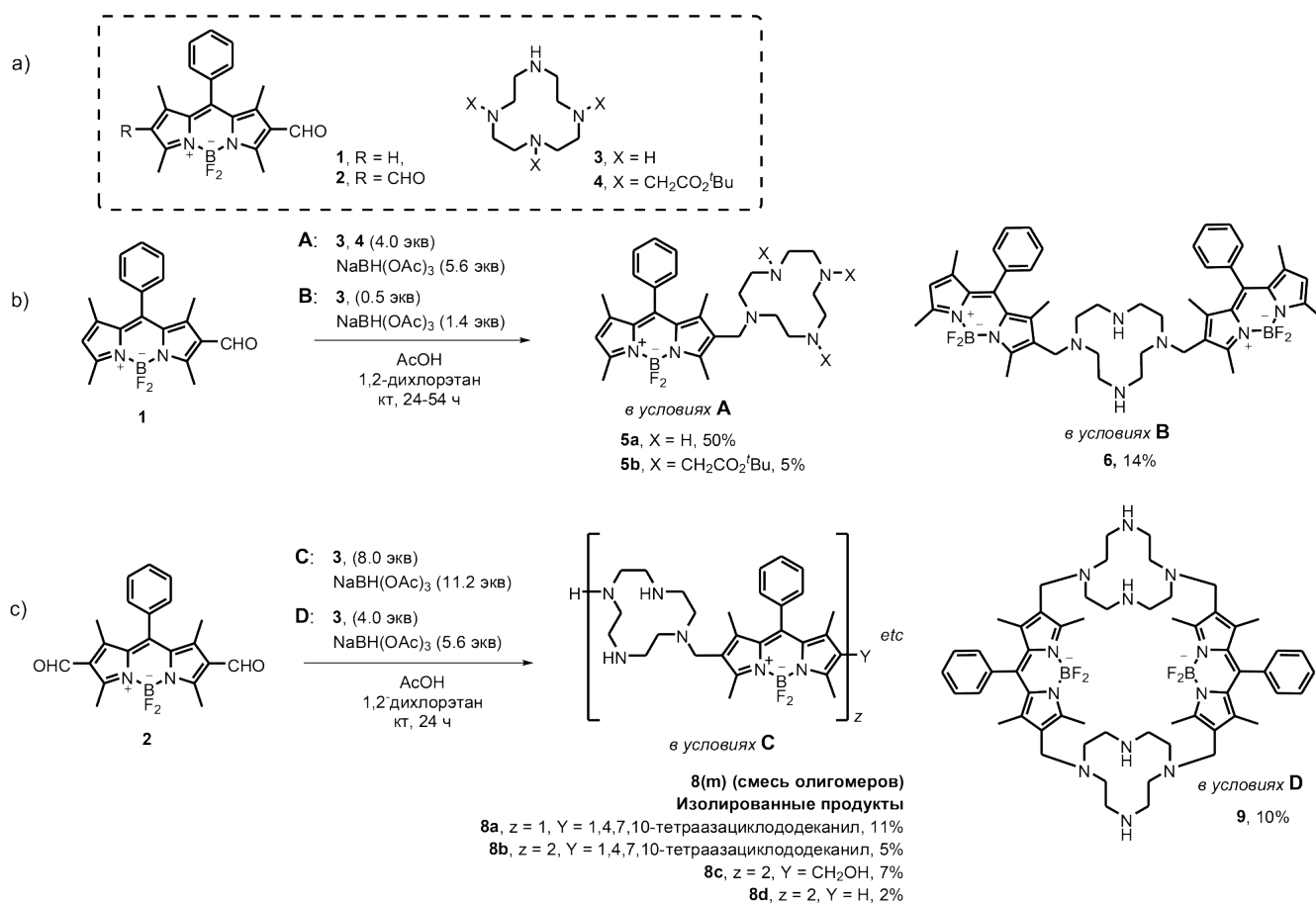


Схема 1. Синтез аза-макроциклических производных BODIPY **I** (AM-BODIPY)

Синтезированные AM-BODIPY **5a-b**, **6**, **8a-c** и **9** были исследованы с помощью комплекса фотофизических методов. Для выявления AIE-активных соединений исследования методами УФ- и флуоресцентной спектроскопии проводились в трёх средах: ацетонитриле, фосфатном буфере (PBS, pH = 7.4) и в воде. Спектры поглощения красителей **5a**, **6**, **8a-c** в ацетонитриле и буферных растворах характеризовались полосой π - π^* -перехода с максимумом поглощения ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$) при 504-510 нм. В отличие от них, краситель **5b** на основе *N*-замещённого циклена поглощал при 498 нм, что совпадало с $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ 1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифторборадиазиндацена (Таблица 1, строка 2). Макроцикл **9** характеризовался двухвершинным спектром поглощения с максимумами при 487 и 505 нм, что, вероятнее всего, было связано с экситонным взаимодействием между BODIPY-фрагментами через пространство. Коэффициенты экстинкции (ϵ_{abs}) AM-BODIPY в ацетонитриле были выше, чем в водных растворах. При этом найдено, что для линейных структур состава (циклен)_n(BODIPY)_m молярные коэффициенты хорошо коррелируют с соотношением n/m. Максимальное значение ϵ_{abs} , равное $14.5 \cdot 10^4$ моль⁻¹ л см⁻¹ (MeCN), было зафиксировано для красителя (AM)₂(BODIPY)₂ **8c** с максимальным относительным содержанием хромофорной единицы (Таблица 1, строка 7). Красители **5a**, **6**, **8a-c** и **9** с NH-группами проявляли слабую флуоресценцию в ацетонитриле ($\Phi_{\text{em}} = 3 - 11\%$). В отличие от них, *N*-замещённое производное **5b** демонстрировало высокий квантовый выход ($\Phi_{\text{em}} = 40\%$). Столь значительная разница между структурными аналогами **5a** и **5b**, вероятно, обусловлена тушением флуоресценции в **5a** за счёт фотоиндуцированного переноса электрона (PET) от NH-групп циклена к ядру BODIPY.

Таблица 1. Фотофизические свойства AM-BODIPY в ацетонитриле и водных растворах.^[a]

№	Соед. ^[b]	Растворитель	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$, нм	$\epsilon_{\text{abs}} [10^4$ моль ⁻¹ Л см ⁻¹]	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$, нм	СТОКСОВ СДВИГ [см ⁻¹]	$\Phi_{\text{em}}^{[c]}$ [%]
1	5a	MeCN	504	7.3	516	461	6
		PBS	504	6.2	513	348	56
		H ₂ O	504	-	513	348	60
2	5b	MeCN	498	7.8	512	549	40
		PBS ^[d]	498	3.9	512	549	50
3	6	MeCN	504	10.5	517	499	11
		PBS	507	4.5	511	163	7
4	8a	MeCN	510	9.5	524	524	3
		PBS	508	7.4	520	455	46
		H ₂ O	508	-	520	455	49
5	8b	MeCN	509	10.3	519	379	10
		PBS	509	9.6	519	379	11
6	8c	MeCN	509	14.5	523	526	7
		PBS	507	8.6	517	381	12
7	9	MeCN	504	8.9	530 (499)	-	3
			487	7.3			
		PBS	505	4.7	530 (500)	-	4
			487	4.7			

^[a] Спектры регистрировали в ацетонитриле (MeCN), фосфатном буферном растворе (PBS, pH 7.4) и в воде при 298 К. ^[b] Содержание трифторуксусной кислоты (TFA) в образцах, определенное методом ¹⁹F ЯМР представлено в экспериментальной части. ^[c] В качестве стандарта использовали флуоресцеин ($\Phi = 0.95$ в 0.1 М растворе КОН в этаноле, $\lambda_{\text{abs}} = 494$ нм). Значения квантовых выходов люминесценции (Φ_{em}) скорректированы с учетом изменения показателя преломления. ^[d] Спектры регистрировали с добавлением 20% MeCN.

При переходе от ацетонитрильных к буферным растворам (PBS) сделано важное наблюдение, что флуоресценция красителей AM-BODIPY **5a,b** и **8a–c**, усиливается. Красители состава (AM)₁(BODIPY)₁ (**5a**) и (AM)₂(BODIPY)₁ (**8a**) демонстрировали наибольшее увеличение флуоресценции — в 9 и 15 раз с Φ_{em} равными 56% (против 6% в ацетонитриле) и 46% (против 3% в ацетонитриле), соответственно. Аналогичные результаты получены для **5a** и **8a** в водных растворах (Таблица 1, строки 1,4), что исключило влияние ионов буфера на разгорание флуоресценции.

Кроме того, соединения AM-BODIPY обладали твердофазной люминесценцией. В качестве характеристичных примеров на Рисунке 2 представлены спектры поглощения и испускания для соединений **5a** и **8a**. Для всей серии AM-BODIPY **5a-b**, **6**, **8a-c**, **9** наблюдались более широкие полосы в спектрах поглощения с более выраженным плечом при ~470 нм и батохромным сдвигом $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ на ~4–11 нм по сравнению со спектрами поглощения, зафиксированными в растворах. Также в спектрах плёнок наблюдались батохромный сдвиг $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (15–42 нм), а также дополнительные максимумы испускания с длинами волн вплоть до ~660 нм. Уширение полос в спектрах поглощения/испускания и батохромные сдвиги как $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$, так и $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ для плёнок соединений **5a** и **8a** указывают на то, что изученные AM-BODIPY красители являются AIE-активными.

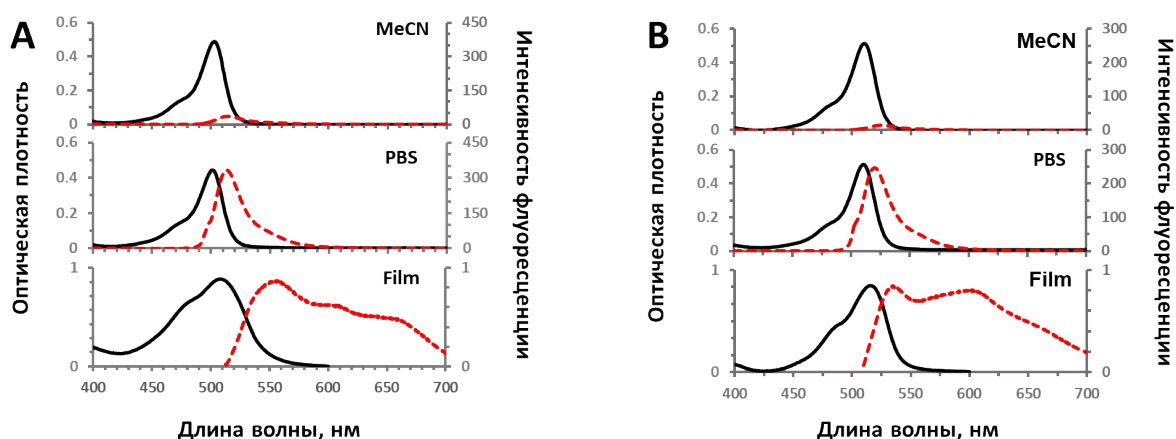


Рисунок 2. Спектры поглощения и испускания AM-BODIPY **5a** (A) и **8a** (B) в тонких плёнках и растворах ($[5a] = 7$ мкМ; $[8a] = 5.5$ мкМ для поглощения, $[5a] = 0.7$ мкМ; $[8a] = 0.55$ мкМ для эмиссии).

Поскольку образование агрегатов может быть вызвано увеличением содержания воды в среде, для AM-BODIPY **5a** и **8a** была проведена оценка влияния объёмной доли воды/PBS в ацетонитриле на интенсивность флуоресценции растворов красителей (F_w) (Рис. 3). Было показано, что флуоресцирующие агрегаты $(AM)_1(BODIPY)_1$ **5a** начинают образовываться в ацетонитриле при увеличении содержания воды свыше 25%, что сопровождается значительным увеличением интенсивности флуоресценции. Максимум флуоресценции для соединения **5a** был зафиксирован при 80% содержании водной фракции (для PBS-растворов см. Рис. 3A,B). Раствор более гидрофильного $(AM)_2(BODIPY)_1$ **8a** оставался слабо флуоресцирующим ($\Phi_{em} < 3\%$) вплоть до 40% объёмной доли воды, а максимальная интенсивность флуоресценции для него достигалась при 100% (для PBS-растворов – Рис. 3C,D). Стоит отметить, что красители **5a** (в диапазоне F_w 25–80%) и **8a** (в диапазоне F_w 40–99%) реагируют на изменение F_w в более широком диапазоне по сравнению с большинством известных AIE-активных BODIPY.

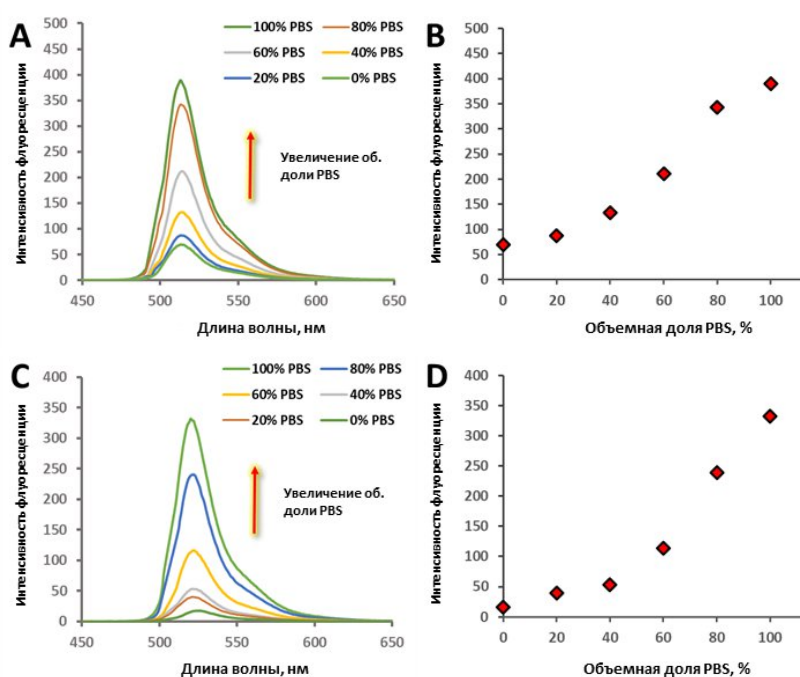


Рисунок 3. Спектры флуоресценции AM-BODIPY **5a** (A) и **8a** (C) ($[5a] = 0.7$ мкМ; $[8a] = 0.55$ мкМ) в смесях MeCN/PBS с различным содержанием воды. Соответствующие графики зависимости интенсивности флуоресценции от доли PBS (B и D).

Кроме того, было показано, что положение $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ и его интенсивность в спектрах испускания водных растворов АМ-BODIPY **5a** и **8a** зависят от концентрации красителей. При концентрациях 1.0×10^{-6} М $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ были зафиксированы при 513 нм для красителя **5a** и 520 нм для красителя **8a** (Рис. 4). По мере увеличения концентрации красителей вплоть до 1.0×10^{-4} М наблюдалось батохромное (примерно, на 10 нм смещение) $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ для обоих АМ-BODIPY. Кроме того, интенсивность флуоресценции достигала своего максимального значения при концентрациях АМ-BODIPY **5a** и **8a** 1.0×10^{-5} М и уменьшалась при более высоких концентрациях, что может быть связано с выпадением красителей в осадок, а также с образованием неизлучающих агрегатов.

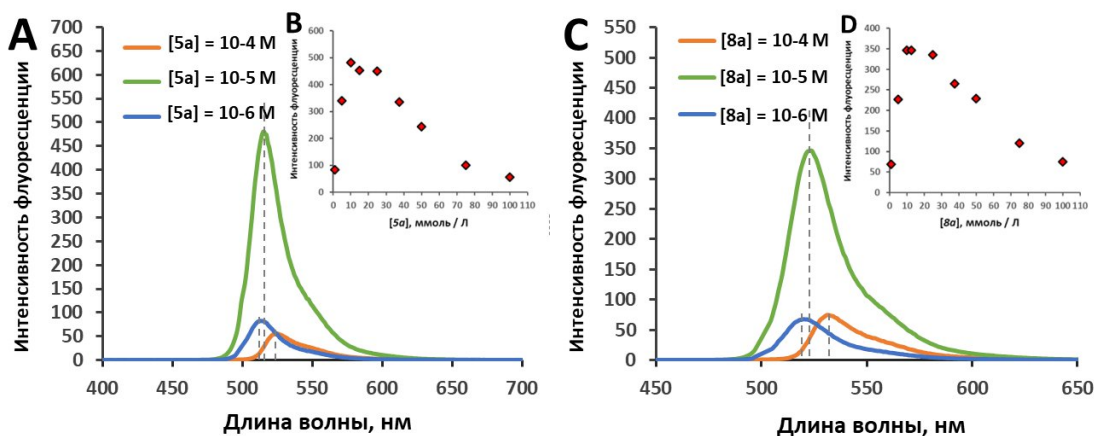


Рисунок 4. Спектры флуоресценции красителей АМ-BODIPY **5a** (A, B) и **8a** (C, D) в буферных растворах с различной концентрацией.

Гидродинамический диаметр агрегатов красителя **5a** в буферном растворе был определён с помощью метода динамического рассеяния света (ДРС) и составил 72 нм (Рис. 5А). По данным СЭМ-микроскопии частицы имеют сферическую форму со средним диаметром 56 нм (Рис. 5В). Превышение гидродинамического диаметра над данными СЭМ, вероятно, объясняется наличием сольватной оболочки из молекул воды в составе агрегатов.

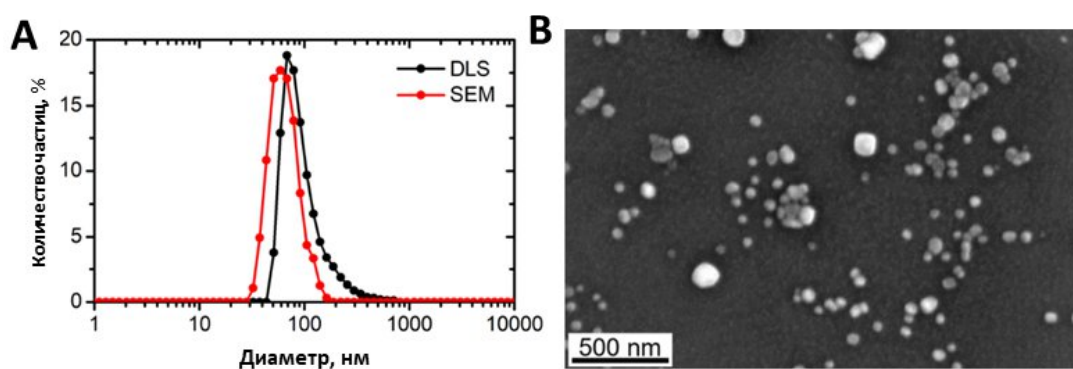


Рисунок 5. Морфология агрегатов красителя **5a**. (А) Распределение частиц по размерам в PBS растворе (10 мкМ), основанное на данных динамического рассеяния света (ДРС) и серии изображений сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). (В) Изображение частиц на кремнёвой подложке, полученное с помощью СЭМ.

На следующем этапе была проведена экспериментальная оценка перспективности использования производных АМ-BODIPY **5a** и **8a** для внутриклеточной флуоресцентной

маркировки лизосом. В качестве ключевых параметров в контексте биовизуализации рассматривались токсичность красителей и вид спектрального отклика, в первую очередь изменение интенсивности флуоресценции в зависимости от вязкости, температуры и pH среды, а также от присутствия катионов различных металлов.

С использованием смеси метанол/глицерин ($\eta = 4.8\text{--}905$ сП) была проведена оценка влияния вязкости среды на спектры испускания красителей **5a** и **8a** (Рис. 6). Интенсивность их свечения монотонно возрастала с увеличением вязкости. Для соединения **5a** флуоресценция усилилась в 2.5 раза при доле глицерина (F_g) > 60%, тогда как для соединения **8a** максимальное усиление (в 2.0 раза) наблюдалось в чистом глицерине. Вероятно, данный эффект обусловлен механизмом RIM (ограничением внутримолекулярного движения) фрагментов молекулы вследствие агрегации.

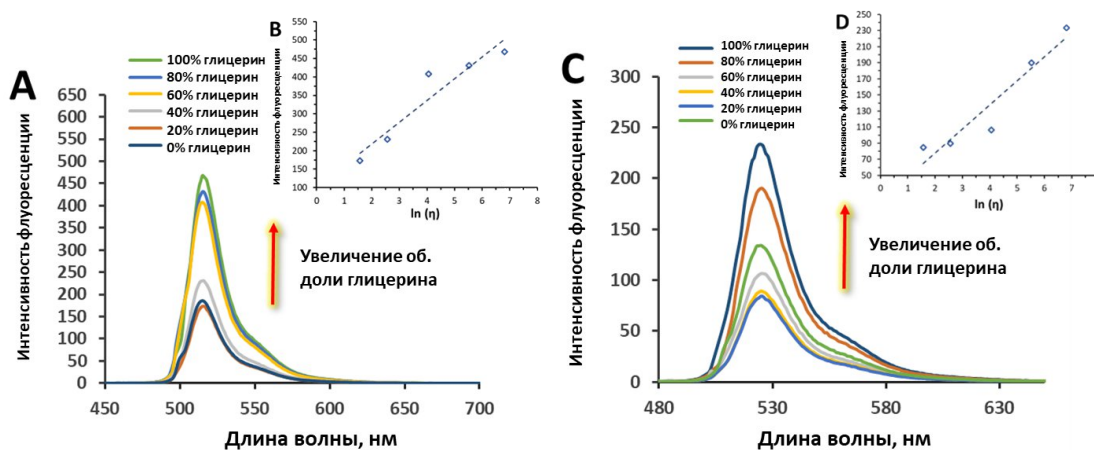


Рисунок 6. Спектры испускания красителей AM-BODIPY **5a** (A) и **8a** (B) ($[5a] = 0.7$ мкМ; $[8a] = 0.55$ мкМ) в метаноле с различным содержанием глицерина.

Было найдено, что водные растворы красителей AM-BODIPY **5a** и **8a** реагируют на изменение температуры. При нагревании растворов **5a** и **8a** с 25 °C до 50 °C наблюдалось уменьшение интенсивности флуоресценции (примерно в три раза), что можно наблюдать невооружённым глазом (для **5a** — Рис. 7A). Кроме того, охлаждение растворов красителей AM-BODIPY **5a** и **8a** с 50 °C до 25 °C сопровождалось линейным увеличением интенсивности флуоресценции также примерно в три раза (для **5a** — Рис. 7A,B). Кроме того, было показано, что соединения AM-BODIPY **5a** и **8a** проявляют свойства pH-чувствительных красителей. Их водные растворы были высоко-флуоресцентными при $\text{pH} \leq 5$ (для **5a**) / 6 (для **8a**) и практически не излучали при $\text{pH} \geq 10$ (для **5a**) / 11 (для **8a**), при этом интенсивность флуоресценции линейно изменялась в диапазоне pH 6–10. Значения констант протонирования, полученные методом спектрофлуориметрического титрования, составили $\text{pK}_{a1} = 10.5687$, $\text{pK}_{a2} = 6.8103$ и $\text{pK}_{a3} = 3.1895$, и согласовались с литературными данными для монозамещённых производных циклена.

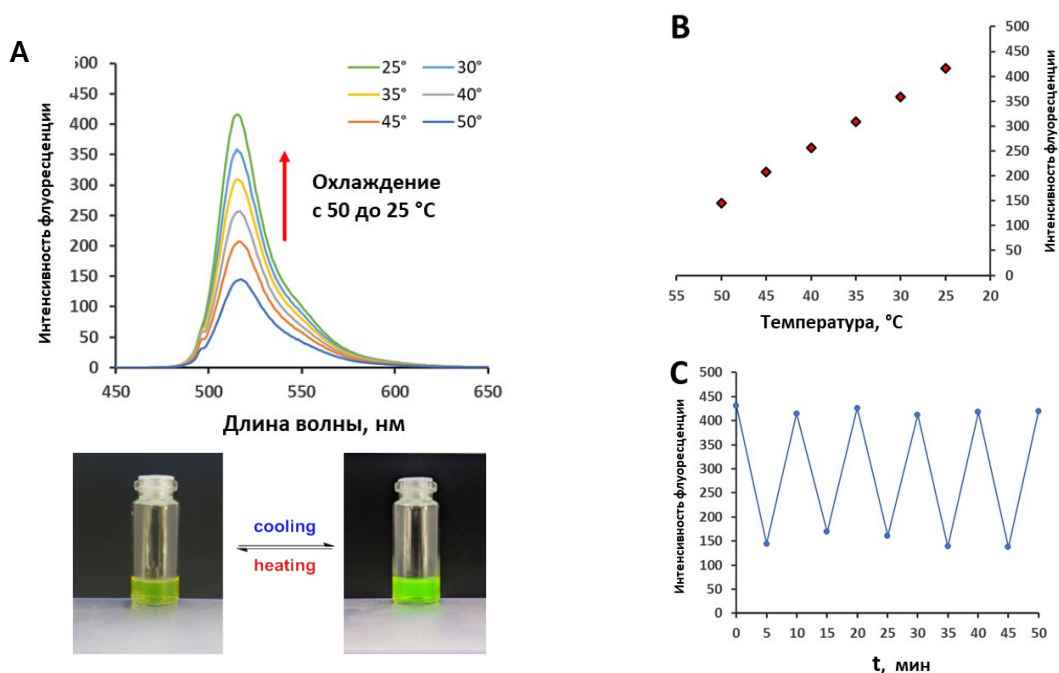


Рисунок 7. (А) Спектры флуоресценции и фотографии растворов АМ-BODIPY **5a** (7 мкМ; PBS) при 25 °C - 50 °C. (В) Кривые зависимости интенсивности $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ красителей от температуры растворов. (С) Тест на обратимость «тушения-разгорания» флуоресценции в пределах 5 циклов изменения температуры растворов от 25 °C до 50 °C.

Дополнительно, была проведена оценка влияния катионов металлов на фотофизические свойства красителей **5a** и **8a** (Рис. 8). Было показано, что Li^+ , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} и Hg^{2+} в количествах 10 экв. не оказывают заметного влияния на спектры поглощения и излучения водных растворов красителей (Рис. 8А,В). Добавление 1 экв. Co^{2+} и Cd^{2+} к растворам красителей приводило к снижению интенсивности их флуоресценции (Co^{2+} : на 10% для **5a** и 15% для **8a**; Cd^{2+} : на 40% для **5a** и **8a**). В присутствии 1 экв. Cu^{2+} было зафиксировано почти полное тушение флуоресценции красителей (Рис. 8А,В).

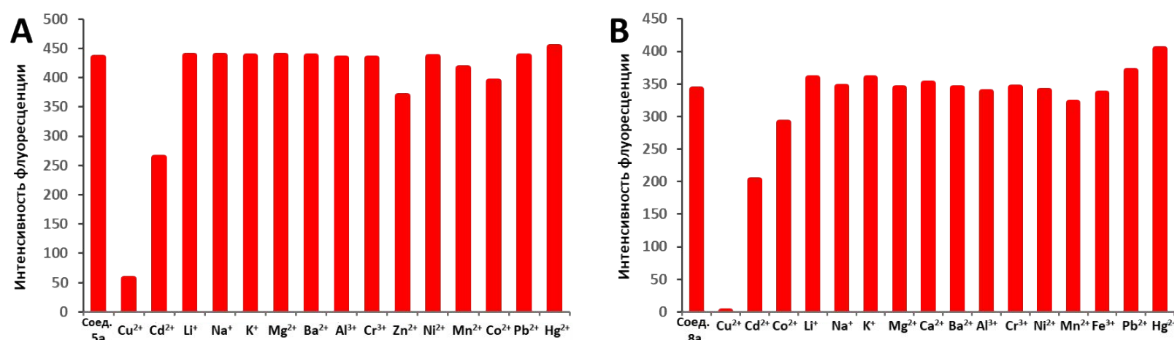


Рисунок 8. Флуоресцентные отклики красителей АМ-BODIPY **5a** (А) **8a** и (В) на различные катионы металлов в водной среде.

Поскольку соединения **5a** и **8a** демонстрировали чувствительность к pH и вязкости среды — ключевым параметрам, используемым при разработке лизосом-специфичных меток, мы предположили, что АМ-BODIPY **5a** и **8a** могут обладать свойствами лизосотропных флуоресцентных маркеров. Последующие опыты выполняли на клетках HeLa, которые являются

общепризнанной модельной системой для изучения лизосом. Селективность локализация в лизосомах оценивалась сравнением с результатами для флуоресцентного краситель LysoTracker-Red, который используется для визуализации лизосом и других кислых компартментов в живых клетках. Полученные изображения клеток HeLa, окрашенных AM-BODIPY **5a**, **8a** и LysoTracker-Red представлены на Рисунке 9. Для соединения **5a** коэффициент корреляции Пирсона (PCC) составил 0.76, что указывает на его высокую лизосомальную локализацию. В то же время, соединение **8a** обладало более низкой специфичностью и продемонстрировало менее выраженную колокализацию (PCC = 0.42). Значение PCC для AM-BODIPY **5a** хорошо коррелирует с данными для других лизосом-направленных BODIPY-зондов, включая AIE-активный CarBDP (PCC = 0.71) и NPB (PCC = 0.60–0.88)

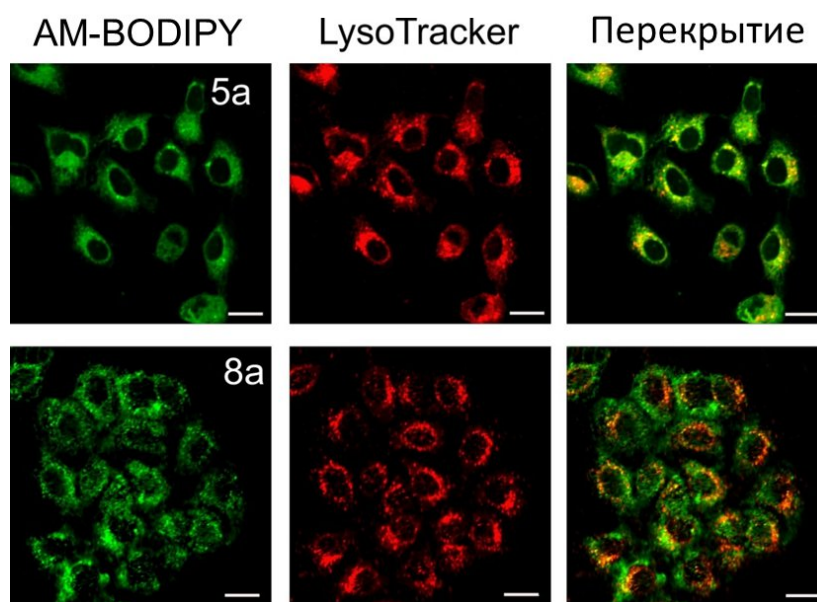


Рисунок 9. Локализация AM-BODIPY **5a** (5 мкМ) и AM-BODIPY **8a** (15 мкМ) в лизосомах клеток М-HeLa. Линейная шкала: 20 мкм.

Таким образом, в рамках первой части работы путём рациональной модификации хромофора BODIPY аза-макроциклическими (AM) фрагментами были разработаны новые водорастворимые AIE-активные флуоресцентные красители. Серия AM-BODIPY линейной и циклической структуры была впервые получена методом восстановительного аминирования 2(6)-формил-BODIPY цикленами. Исследование взаимосвязи структура-функция показало, что AIE-поведение AM-BODIPY зависит от соотношения AM-фрагментов и хромофорных единиц. Наиболее выраженный AIE-эффект наблюдался для моно- и бис-циклен замещённых производных **5a** и **8a**. Последние продемонстрировали чувствительность к параметрам микроокружения, включая содержание воды, вязкость, pH и температуру. Данные DLS и SEM свидетельствуют о существовании производных **5a** и **8a** в водных растворах в виде наноразмерных агрегатов. Было также показано, что красители **5a** и **8a** биосовместимы, устойчивы к физиологическим концентрациям клеточных ионов металлов и избирательно накапливаются в лизосомах, что делает их перспективными для биологических применений. Все эти свойства позволяют рассматривать AM-BODIPY как перспективные структуры для создания флуоресцентных off-on зондов для биовизуализации.

II. Синтез и изучение фотофизических свойств 2(6)-производных BODIPY, модифицированных 1,3,4-тиадиазольными и бензаннелированными 1,3-азольными заместителями

Во второй части работы в качестве стратегии синтеза общей для 2(6)-производных BODIPY II, модифицированных 1,3,4-тиадиазольными и бензаннелированными 1,3-азольными заместителями, была использована конденсация 2(6)-формил-замещённых BODIPY с биснуклеофилами, такими как функционализированные тиогидразиды, *орто*-фенилендиамины, *орто*-аминотиофенолы, *орто*-аминофенолы, в окислительных условиях. Данный подход за счёт варьирования биснуклеофильной компоненты обеспечил широкую структурную вариативность получаемых красителей, что было использовано для установления закономерностей взаимосвязи структура-фотофизические свойства и выявления красителей, перспективных в контексте флуоресцентной биовизуализации.

II.1. 1,3,4-Тиадиазольные производные BODIPY

Фосфорилзамещённые 1,3,4-тиадиазольные производные BODIPY **11a-d** и **12a,b** были получены с использованием двухстадийной *one-pot* методики, включающей на первой стадии выдерживание формил-BODIPY **1,2** с гидразидами фосфорилтиомуравьиной кислоты **10** в присутствии кислотного катализатора и обработку окислителем - 2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохиноном (DDQ) на второй стадии (Схема 2). Оптимальным было найдено проведение гетероциклизации в ДМФА в присутствии 10 мол.% TsOH при 80°C в течение 1 часа с последующим добавлением DDQ и выдерживанием при той же температуре в течение дополнительных 30 минут. Было показано, что метод носит общий характер для производных с фосфиноксидными и фосфамидными заместителями. Выходы продуктов **11,12** варьировались в диапазоне 50-81%. (PhNH)₂PO-замещённое производное **11d** было выделено с выходом лишь 16%, что было связано с высокой лабильностью гидразида фосфорилтиомуравьиной кислоты **10d**.

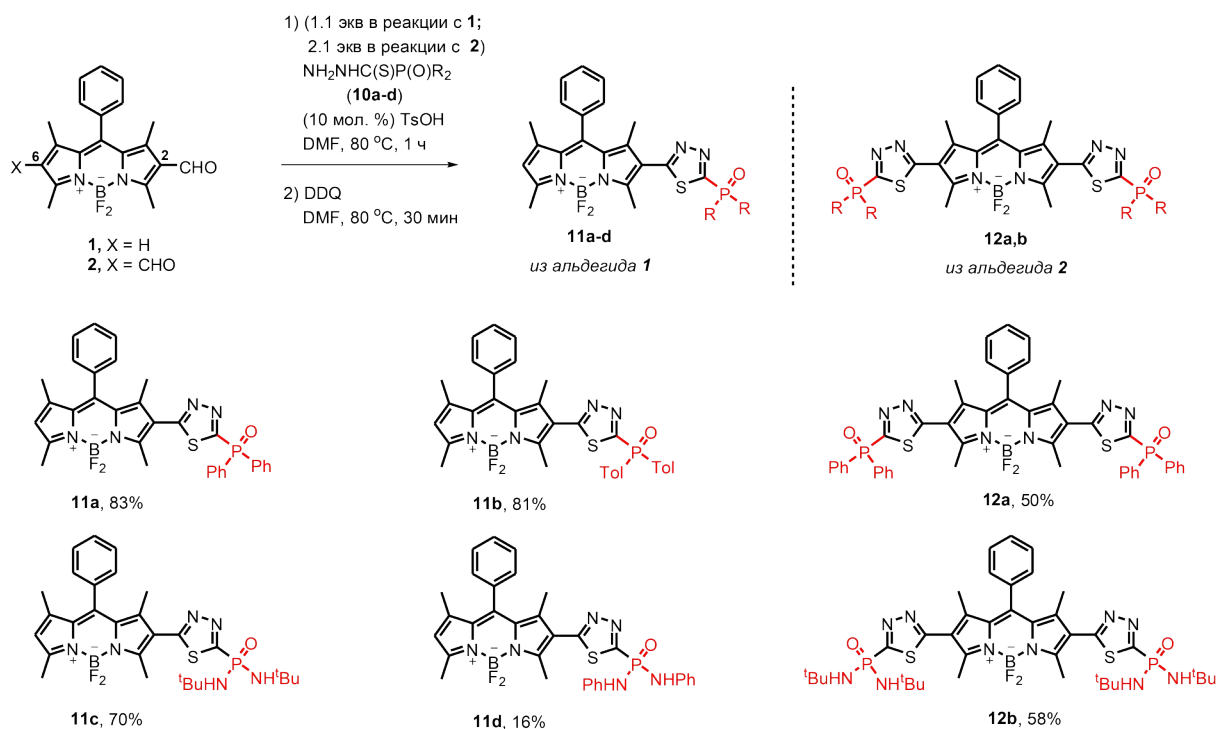


Схема 2. Синтез фосфорилзамещённых 1,3,4-тиадиазольных производных BODIPY

Соединения **11** и **12** были охарактеризованы методами УФ- и флуоресцентной спектроскопии в различных растворителях, в том числе в метаноле, ацетонитриле, хлористом метиле и 1,2-дихлорбензоле (Таблица 2).

Таблица 2. Фотофизические данные для соединений **11a-d** и **12a,b**.^[a]

№	Соединение	Растворитель	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$, нм	ε_{abs} [моль ⁻¹ л см ⁻¹]	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$, нм	FWHM [см ⁻¹]	СТОКСОВ СДВИГ [см ⁻¹]	$\Phi_{\text{em}}^{\text{[b]}}$ [%]
1	11a	MeOH	504	78381	524	1234	758	87
		MeCN	505	74833	525	1229	754	84
		CH ₂ Cl ₂	510	87494	528	1241	669	78
		1,2-DCB	517	82788	535	1247	725	84
2	11b	MeOH	504	102063	524	1192	758	83
		MeCN	504	99402	526	1210	830	88
		CH ₂ Cl ₂	509	113227	530	1164	779	84
		1,2-DCB	516	87023	535	1172	688	89
3	11c	MeOH	503	85725	526	1276	942	82
		MeCN	505	83019	528	1266	862	87
		CH ₂ Cl ₂	509	86157	530	1282	778	62
		1,2-DCB	516	82144	537	1212	758	83
4	11d	MeOH	504	49113	525	1187	794	72
		MeCN	505	51678	526	1145	790	80
		CH ₂ Cl ₂	509	54233	528	1064	706	87
		1,2-DCB	517	52617	536	1070	686	87
5	12a	MeOH	523	84165	546	1407	805	87
		MeCN	523	85475	547	1367	839	99
		CH ₂ Cl ₂	528	84645	551	1358	790	85
		1,2-DCB	540	80647	560	1324	662	91
6	12b	MeOH	520	106591	547	1418	949	79
		MeCN	522	103080	550	1447	876	95
		CH ₂ Cl ₂	527	98872	552	1419	859	88
		1,2-DCB	538	81725	562	1404	793	87

^[a] Спектры регистрировали при 298 К. ^[b] В качестве стандарта использовали флуоресцеин ($\Phi = 0.95$ в 0.1 М растворе КОН в этаноле, $\lambda_{\text{abs}} = 494$ нм). Все значения квантового выхода люминесценции (Φ_{em}) скорректированы с учетом изменения показателя преломления.

Было показано, что 2-замещённые BODIPY **11** характеризуются интенсивной полосой поглощения с $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ 504-505 нм, соответствующей переходу S0 → S1, с плечом при 480-490 нм. 2,6-Бис-замещённые BODIPY **12** обладали сходными спектрами поглощения, однако их полосы поглощения были сдвинуты батохромно на ~20 нм ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 522$ -523 нм). Коэффициенты экстинкции соединений **11** и **12** варьировались от 5.2×10^4 (соединение **11d**) до 10.3×10^4 (соединение **12b**). Растворы соединений **11** демонстрировали интенсивную флуоресценцию с одной широкой полосой испускания ($\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 525$ -528 нм, FWHM = 29-33 нм) и квантовыми выходами флуоресценции ($\Phi_{\text{em}} = 80$ -88%). Соединения **12** обладали более высокой флуоресценцией с Φ_{em} в 95% для **12a** и в 99% для **12b**, а их $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ был сдвинут к 547-550 нм. Тип фосфорильного заместителя (P=O или P(NR₂)), как и растворитель, не оказывали существенного влияния на фотофизические характеристики красителей.

Электрохимическое поведение соединений **11** и **12** было исследовано методом циклической вольтамперометрии. Вольтамперограмма фосфиноксидного производного **11a** характеризовалась

обратимой волной восстановления ($E_{red}^{1/2} = -1.14$ В), что соответствует одноэлектронному восстановлению фосфиноксидной группы (Рис. 10А). Для бис-замещённого аналога **12a** наблюдались две обратимые волны восстановления ($E_{red}^{1/2} = -0.9$ В и $E_{red}^{1/2} = -1.09$ В), указывающие на последовательное восстановление двух фосфиноксидных фрагментов (Рис. 10В). В исследованном потенциометрическом окне иных электрохимически активных процессов в вольтамперограммах соединений **11-12** не наблюдалось.

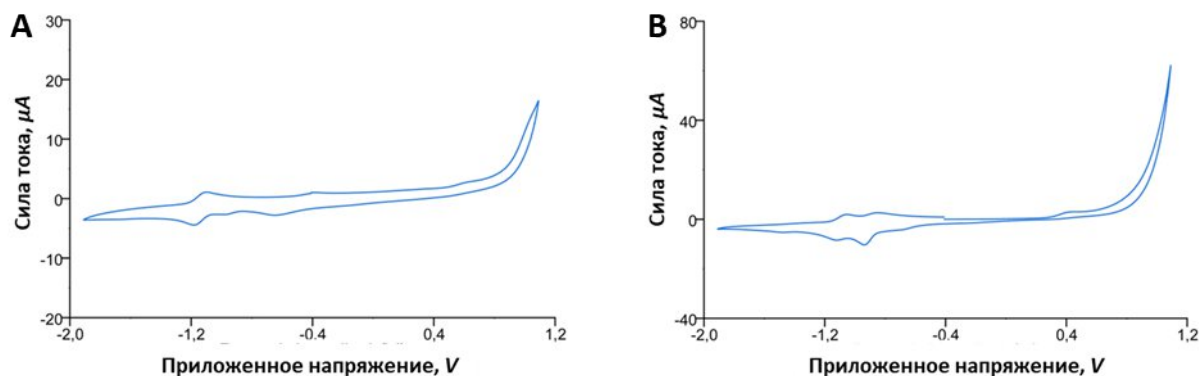


Рисунок 10. Характерная циклическая вольтамперограмма соединения **11a** (А) **12a** (В).
Условия: 100 мМ ТВАРF₆ в ДМСО; электрод Pt; относительно пары Fc/Fc⁺.

Карбоксамидамещённые 1,3,4-тиадиазольные производные BODIPY **14a-g** были синтезированы по аналогии с фосфорилзамещёнными аналогами посредством реакции окислительного циклизирования формил-BODIPY **1,1'** с тиогидразидами оксиминовых кислот **13a-g** (Схема 3).

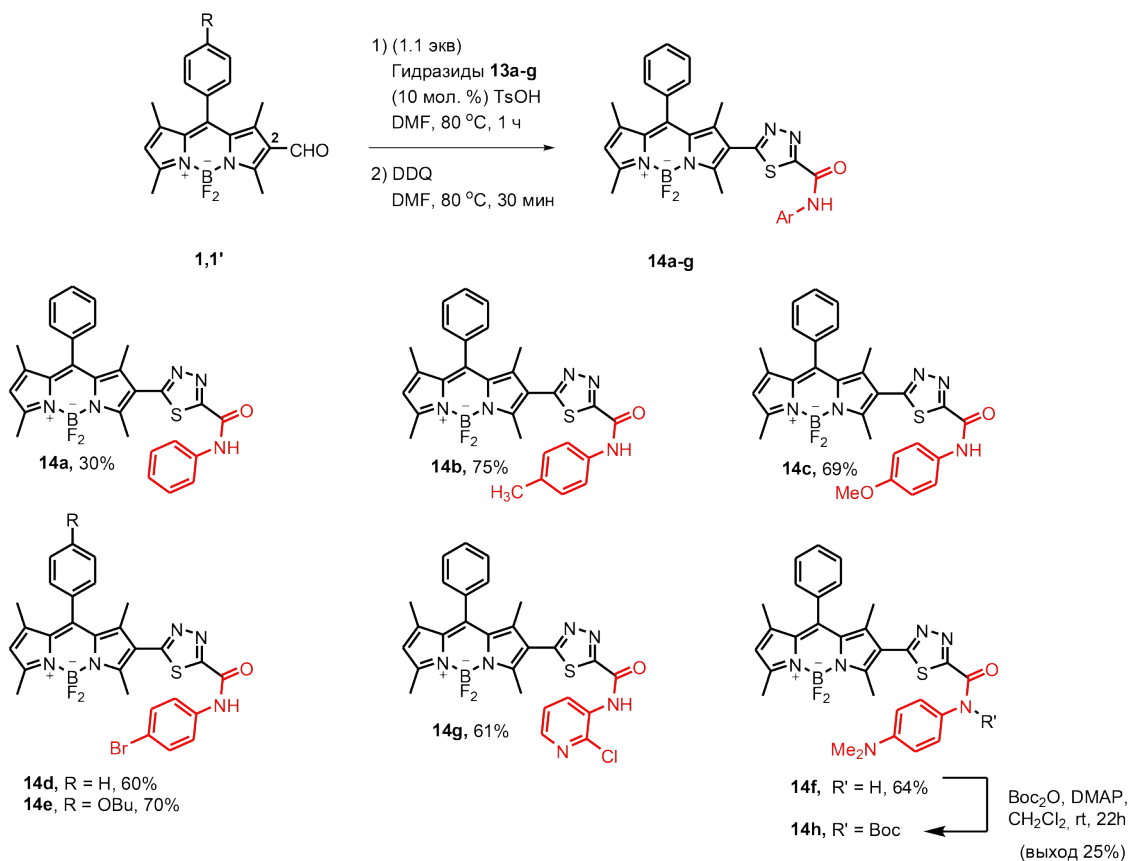


Схема 3. Синтез карбоксамидамещённых 1,3,4-тиадиазольных производных BODIPY

Выходы продуктов **14a-g** (60-75%) существенным образом не зависели от электронных свойств арильного заместителя. Низкий выход соединения **14a**, составивший 30%, был обусловлен сложностями его хроматографической очистки. На примере производного **14f** была продемонстрирована возможность функционализации карбоксамидного фрагмента. Обработка последнего Woc_2O в присутствии каталитического количества DMAP в среде хлористого метилена при комнатной температуре привела к *N*-Woc-производному **14h** с выходом 25%.

Спектральные характеристики (коэффициенты молярной экстинкции, максимумы поглощения и флуоресценции) карбоксамидзамещённого ряда тиадиазолов **14a-h** оказались сопоставимы с характеристиками монофосфорильных аналогов (Таблица 3). Коэффициенты экстинкции (ϵ) составили $(6.7 - 11.5) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Максимумы полос поглощения и испускания были локализованы в областях 504–506 нм и 526–528 нм, соответственно. Установлено, что производные **14c,f,h**, содержащие π -донорные заместители (*para*-OMe, *para*-NMe₂) в арильном фрагменте карбоксамидного остатка, практически не флуоресцируют ($\Phi_{\text{em}} < 0.01$). В отличие от них, соединения **14a,b,d,e,g** характеризовались высокими квантовыми выходами флуоресценции, близкими к единице ($\Phi_{\text{em}} = 95 - 100\%$).

Таблица 3. Фотофизические данные для соединений **14a-h**. ^[a]

№	Соед.	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$, нм	ϵ_{abs} [моль ⁻¹ л см ⁻¹]	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$, нм	FWHM [см ⁻¹]	Стоксов сдвиг [см ⁻¹]	$\Phi_{\text{em}}^{\text{[b]}}$ [%]
1	14a	505	69987	527	1107	827	~100
2	14b	505	88949	528	1140	863	~100
3	14c	505	83200	526	1174	791	6
4	14d	505	86931	528	1140	863	95
5	14g	505	115212	526	1073	791	~100
6	14e	505	66698	526	1073	791	~100
7	14f	506	92046	_[c]	_[c]	_[c]	<1
8	14h	504	92422	526	_[c]	830	<1

^[a] Спектры регистрировали при 298 К в MeCN ^[b] В качестве стандарта использовали флуоресцеин ($\Phi = 0.95$ в 0.1 М растворе КОН в этаноле, $\lambda_{\text{abs}} = 494$ нм). Все значения квантового выхода люминесценции (Φ_{em}) скорректированы с учетом изменения показателя преломления. ^[c] Максимумы испускания не идентифицированы из-за низкой интенсивности сигнала.

Оценка влияния природы растворителей на спектры поглощения и испускания в серии красителей **14a-h**, проведённая с использованием ДМСО, ДМФА, анизола, метанола и 1,2-дихлорбензола, позволила выявить для соединения **14c** зависимость Φ_{em} от диэлектрической проницаемости среды (ξ) (Рис. 11). Было показано, что Φ_{em} красителя **14c** линейно увеличивается с 1% до 83% в интервале $\xi = 47 - 9$, достигая максимума в 1,2-дихлорбензоле. Спектральные характеристики ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$, ϵ_{abs} , $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$, Φ_{em}) соединений **14a,b,d-h** существенным образом от растворителя не зависели.

Растворитель	ξ	$\Phi_{em}^{[b]}$ [%]
1,2-DCB	7.5	85
CH ₂ Cl ₂	8.93	83
MeOH	32.6	13
MeCN	38.8	6
DMSO	46.68	<1

[a] Спектры регистрировали при 298 К. [b] В качестве стандарта использовали флуоресцеин ($\Phi = 0.95$ в 0.1 М растворе КОН в этаноле, $\lambda_{abs} = 494$ нм). Все значения квантового выхода люминесценции (Φ_{em}) скорректированы с учетом изменения показателя преломления.

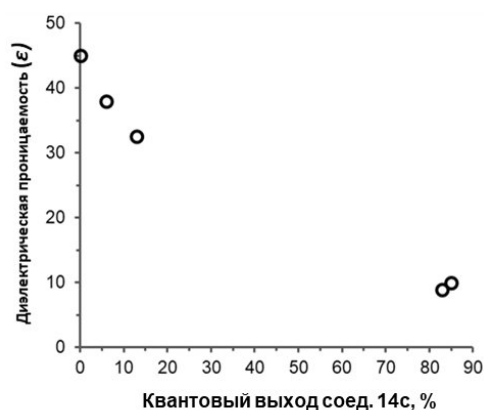


Рисунок 11. Зависимость Φ_{em} красителя **14с** от ξ растворителя.

Анализ влияния pH на спектрально-люминесцентные свойства синтезированных красителей выявил производные **14f** и **14h**, содержащие *N,N*-диметиламиногруппу, в качестве pH-чувствительных сенсоров. В присутствии эквимольных количеств трифторуксусной кислоты для растворов соединений **14f** и **14h** было зафиксировано 37-ми и 59-ти кратное увеличение интенсивности λ_{em}^{max} , что вероятнее всего, было связано с блокированием фотоиндуцированного переноса электронов NMe₂-фрагмента в результате его протонирования.

Таким образом, предложена эффективная стратегия синтеза новых производных BODIPY, функционализированных по 2(6)-положениям флуорофора фосфор(V)- и карбоксамид-замещёнными 1,3,4-тиадиазольными фрагментами. Продемонстрировано, что введение различных 1,3,4-тиадиазольных остатков открывает возможности для создания новых pH- и редокс-чувствительных флуоресцентных зондов, а также красителя чувствительного к полярности среды.

II.2. BODIPY, модифицированных бензаннелированными 1,3-азольными остатками

Введение 2-формил-BODIPY **1** в реакцию с *орто*-фенилендиаминами **15a-i**, *орто*-аминофенолами **17a-c** и *орто*-аминотиофенолами **19a-d** в окислительных условиях позволило получить бензаннелированные 1,3-азольные производные BODIPY **16a-i**, **18a-c** и **20a-d** (Схема 4). Установлено, что синтез бензимидазолов **16** эффективно протекает в мягких условиях под действием атмосферного кислорода в качестве окислителя, в то время как для циклизации в ряду бензоксазолов **18** и бензтиазолов **20** требуются использование DDQ. Выходы целевых продуктов составили: 11-58% для ряда соединений **16**, 25-48% для ряда соединений **18** и 33-47% для ряда соединений **20**.

Растворы соединений **16**, **18** и **20** в ацетонитриле были охарактеризованы методами УФ- и флуоресцентной спектрофотометрии. Обобщённые данные представлены в Таблице 4. Было найдено, что максимумы в спектрах поглощения соединений **16,18** и **20** находятся в интервале 507-511 нм (λ_{abs}). Коэффициенты молярной экстинкции (ϵ) варьировались от 4.00×10^4 до 8.75×10^4 Л моль⁻¹см⁻¹, при этом наиболее интенсивное поглощение наблюдалось для бромзамещённого бензотиазольного производного **20d**. Максимумы в спектрах испускания (λ_{em}) большинства красителей лежали в области 536–549 нм. Введение электронодонорных заместителей в 1,3-азольную систему приводило к батохромному сдвигу λ_{em}^{max} в область ~ 600 нм и увеличению Стоксовых сдвигов до 2941-2980 см⁻¹ (соединения **16b**, **16c** и **20b**).

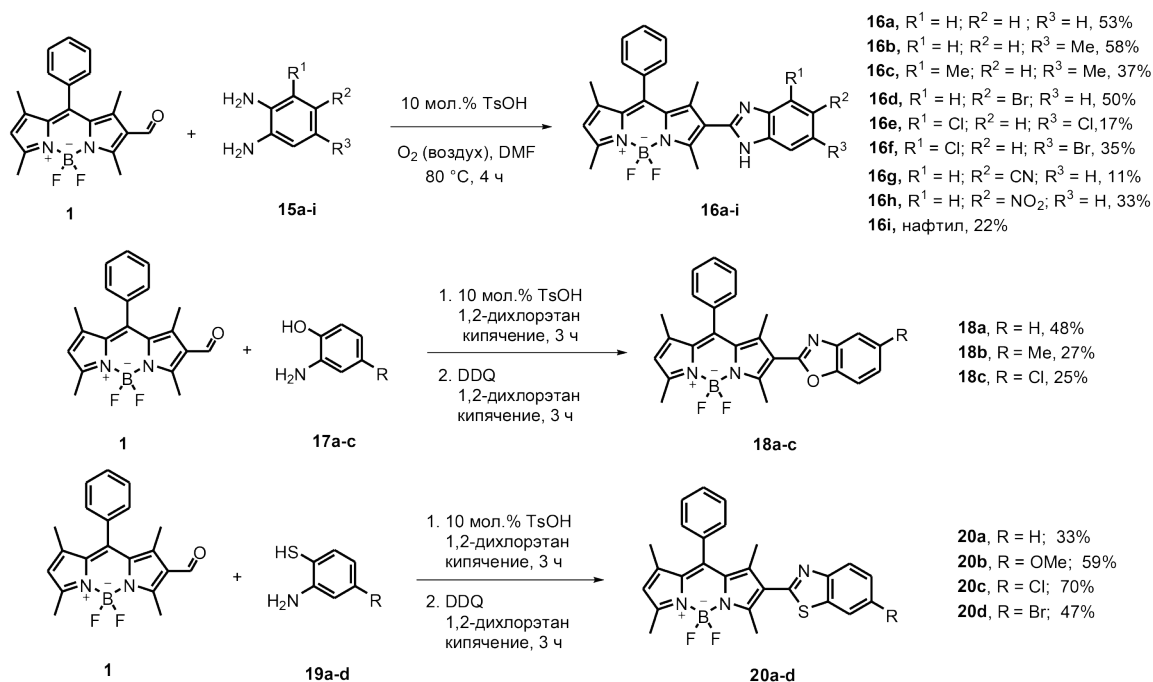


Схема 4. Синтез BODIPY, модифицированных бензаннелированными 1,3-азольными остатками

Таблица 4. Фотофизические данные для соединений **16**, **18** и **20**.^[a]

№	Соед.	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$, нм	ϵ_{abs} [моль ⁻¹ Л см ⁻¹]	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$, нм	FWHM [см ⁻¹]	СТОКСОВ СДВИГ [см ⁻¹]	$\Phi_{\text{em}}^{\text{[b]}}$ [%]
1	16a	508	63730	549	2684	1470	14
2	16b	510	55960	600	2825	2941	5
3	16c	509	62229	600	3144	2980	3
4	16d	509	66727	566	2431	1979	34
5	16e	507	40006	547	2158	1442	55
6	16f	509	69669	546	2129	1331	63
7	16g	509	57717	544	1789	1264	77
8	18a	511	61262	544	1656	1187	62
9	18b	511	58682	549	1868	1355	48
10	18c	509	69207	536	1400	990	86
11	20a	509	65113	547	1632	1365	64
12	20b	509	55172	600	2709	2980	5
13	20c	510	61097	547	1608	1326	84
14	20d	509	87547	547	1578	1365	87

^[a] Спектры регистрировали при 298 К в ацетонитриле. ^[b] В качестве стандарта использовали флуоресцеин ($\Phi = 0.95$ в 0.1 М растворе КОН в этаноле, $\lambda_{\text{abs}} = 494$ нм). Все значения квантового выхода люминесценции (Φ_{em}) скорректированы с учетом изменения показателя преломления.

Было найдено, что природа бензаннелированного 1,3-азольного остатка влияет на квантовые выходы флуоресценции (Φ_{em}) красителей. Для незамещённых производных **16a**, **18a** и **20a** наблюдалась тенденция к увеличению значения Φ_{em} при переходе от бензимидазольного производного **16a** к бензотиазольному **20a**. Низкий квантовый выход имидазольного производного

16a, (14%) относительно бензооксазольного (**18a**; 62%) и бензотиазольного (**20a**, 64%) производных могут быть объяснены эффектом фотоиндуцированного переноса электрона (PET), приводящего к безызлучательной дезактивации возбужденного состояния. В то же время, красители с электронодонорными заместителями в арильном остатке 1,3-азольных систем **16b,c**, **18b** и **20b** демонстрировали низкие Φ_{em} вплоть до 5% для метокси-замещённого бензотиазольного производного **20b**. Производные с электроакцепторными заместителями **16e-g**, напротив характеризовались высокими значениями Φ_{em} вплоть до 77% для нитрил-замещённого бензимидазола **16g**.

Оценка влияния pH среды на спектры поглощения и испускания бензимидазольных производных **16a-c**, показала, что в кислых средах для них наблюдается гипсохромное смещение λ_{abs}^{max} наряду с увеличением интенсивности λ_{em}^{max} . Было найдено, что добавление перхлорной кислоты ($HClO_4$, 100 экв.) к растворам красителей **16a-c** в ацетонитриле приводит к смещению максимумов в синюю область λ_{abs}^{max} на ~ 16 нм и λ_{em}^{max} на 37 нм для **16a**, на 86 нм для **16b** и **16c**. Квантовые выходы флуоресценции в присутствии $HClO_4$ составили 80% для **16a**, 83% для **16b** и 89% для **16c**.

Таким образом, нами впервые показано, что окислительная конденсация 2-формил-BODIPY с *орто*-функционализированными анилинами позволяет эффективно вводить 1,3-азольные бензаннелированные остатки во 2-е положение ядра BODIPY. Общность метода была продемонстрирована для бензимидазольных, бензооксазольных и бензотиазольных производных. Фотофизические исследования выявили ключевые закономерности, связывающие структуру соединений с их спектральными характеристиками.

III. Флуоресцентные конъюгаты аллопрегнанолона и BODIPY для селективного окрашивания нейронов

В заключительной, третьей, части работы мы обратились к разработке флуоресцентных конъюгатов на основе аллопрегнанолона и BODIPY. Эндогенный нейростероид аллопрегнанолон (3 α 5 α TNP) обладает седативным, анксиолитическим, противосудорожным действием и является одним из наиболее мощных позитивных аллостерических модуляторов рецепторов *гамма*-аминомасляной кислоты типа A (ГАМК_A). В связи с этим, изучение молекулярных механизмов действия 3 α 5 α TNP критически значимо для прогресса в нейростероидной биологии, понимания механизмов передачи сигналов с участием γ -аминомасляной кислоты (ГАМК), а также для разработки новых фармакологических средств, влияющих на передачу нервных импульсов через ГАМК-зависимые системы. Мы предположили, что эффективной стратегией получения флуоресцентных красителей на основе 3 α 5 α TNP может стать введение флуорофора BODIPY в C21-е положение нейростероида с использованием аминокислотного линкера варьiruемой длины (Рис. 12).

Синтез целевых соединений BODIPY-3a5aTHP проводили согласно Схеме 5. На первом этапе получали *N*-гидроксисукцинимидные эфиры аминокислот **23a,b** (строка а). Для этого аминогруппы соединений **21a,b** защищали обработкой Woc_2O , получая *Woc*-защищенные производные **22a,b**. Затем карбоксильные группы соединений **22a,b** активировали в присутствии *N*-гидроксисукцинимид в стандартных условиях.



Далее были получены производные 3α,5α-ТНР **28a,b**, содержащие линкерные фрагменты (строка б). Синтез проводили из предшественника **24** через последовательное бромирование (бромид **25**), нуклеофильное замещение в присутствии азид-иона (азид **26**), восстановление (амин **27**), ацилирование *N*-гидроксисукцинимидными эфирами **23a,b** с последующим удалением *Boc*-

защитных групп трифторуксусной кислотой (соединения **28**). Последняя стадия сопровождалась трифторацелированием 3 α -гидроксильной группы стероида.

Заключительная стадия синтеза конъюгатов BODIPY-3 α 5 α ТНР **I** и **II** включала активацию карбоксильной группы BODIPY-красителя **29** *N*-гидроксисукцинимидом с последующей обработкой аминами **28a,b** (строка с). Соединение BODIPY-3 α 5 α ТНР **III**, содержащее концевую гидроксильную группу в С3-положении, было получено щелочным гидролизом трифторацетатного фрагмента в конъюгате **II**. Выходы BODIPY-3 α 5 α ТНР с учётом всех синтетических стадий составили 13% для **I**, 12% для **II** и 7% для **III**.

Соединения BODIPY-3 α 5 α ТНР **I-III** демонстрировали типичные для ряда BODIPY спектры поглощения с интенсивной полосой при 524 нм. Коэффициенты экстинкции для них составили $4.6 \times 10^4 - 5.5 \times 10^4$ л моль⁻¹ см⁻¹. В спектрах испускания красителей наблюдалась полоса излучения при 537-538 нм, а величина Стоксова сдвига составляет 462-497 см⁻¹. Квантовые выходы флуоресценции BODIPY-3 α 5 α ТНР варьировались в диапазоне 72-79%.

С использованием метода patch-clamp была проведена оценка способности конъюгатов BODIPY-3 α 5 α ТНР **I-III** оказывать модулирующее действие на ГАМК-индуцированные токи в клетках Пуркинью. BODIPY-3 α 5 α ТНР **II** и **III** демонстрировали четкую дозозависимость с монотонным усилением ГАМК-эргических токов. Максимальный эффект BODIPY-3 α 5 α ТНР **II** при 10 мкМ составил $220 \pm 25\%$ ($n = 6$), а для BODIPY-3 α 5 α ТНР **III** $380 \pm 26\%$ ($n = 6$). Расчетные значения EC₅₀ составили ~0.2 мкМ для BODIPY-3 α 5 α ТНР **II** и ~3 мкМ для BODIPY-3 α 5 α ТНР **III**. Таким образом, для конъюгатов BODIPY-3 α 5 α ТНР наличие трифторацетатной группы при С3-положении стероидного ядра снижало способность модулировать ГАМК-индуцированные токи. Было обнаружено, что при совместном применении 0.1 мкМ 3 α 5 α ТНР и 10 мкМ BODIPY-3 α 5 α ТНР **III** амплитуда ответа значительно снижалась до $77 \pm 2\%$ ($n = 7$, $p < 0.001$) по сравнению с применением только 3 α 5 α ТНР. Наблюдаемое ингибирование можно объяснить перекрыванием сайтов связывания BODIPY-3 α 5 α ТНР **III** и 3 α 5 α ТНР в ГАМК_A-рецепторах.

Последующие эксперименты проводили на срезах мозжечка и гиппокампа мозга крыс, поскольку эти области мозга не только участвуют в нейростероид-зависимой регуляции физиологических процессов, но и содержат нейроны, способные к самостоятельному синтезу нейростероидов. Конъюгат BODIPY-3 α 5 α ТНР **III** продемонстрировал диффузное окрашивание с общими закономерностями распределения в нейрональных тканях мозжечка и гиппокампа. Внутри нейронов наблюдалось преимущественное накопление красителя в примембранной области. Такая картина указывает на накопление BODIPY-3 α 5 α ТНР **III** в липидных мембранах при минимальном проникновении в цитоплазму и ядерные структуры. Внеклеточное пространство и области, свободные от тел нейронов, характеризовались равномерным слабым флуоресцентным фоном. Оценка фотостабильности флуоресцентного отклика BODIPY-3 α 5 α ТНР **III** проведённая для слоя клеток Пуркинью, показала, что время полураспада флуоресцентного сигнала красителя ($\tau_{1/2}$) составляет 1200 ± 36 с ($n=5$).

Для оценки распределения соединения BODIPY-3 α 5 α ТНР **III** в тканях гиппокампа был применён подход на основе колокализационного анализа с селективным маркером астроцитарной глиии — сульфородамином 101 (SR101). Конфокальная микроскопия ключевых областей гиппокампа (субикулум, поля CA1-CA3, зубчатая извилина) не выявила значимого перекрытия сигналов BODIPY-3 α 5 α ТНР **III** и SR101 (для CA1 см. Рис. 13). Количественный анализ подтвердил отсутствие колокализации: коэффициент корреляции Пирсона (PCC) достоверно отличался от нуля

($p < 0.01$), но не превышал 0.3, что соответствовало фоновому уровню накопления соединения в астроцитах. Данные результаты свидетельствуют в пользу избирательности BODIPY-3 α 5 α THP III в отношении нейронов по сравнению с астроцитарными клетками.

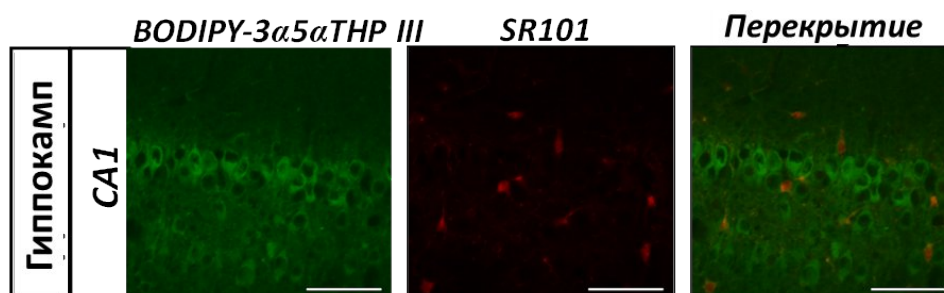


Рисунок 13. Конфокальные микрофотографии распределения BODIPY-3 α 5 α THP III и SR101 в области CA1 гиппокампа на нефиксированном срезе мозга крысы. Слева показано распределение BODIPY-3 α 5 α THP III, в центре - флуоресцентный сигнал SR101, справа представлено совмещенное изображение. Масштабная линейка соответствует 50 мкм.

Таким образом, нами впервые показано, что введение флуорофора в C21-положение 3 α 5 α THP может быть использовано для создания флуоресцентных маркеров для нейронов в тканях головного мозга. Впервые синтезированные BODIPY-производные 3 α 5 α THP - BODIPY-3 α 5 α THP, продемонстрировали значимую способность модулировать ГАМК-индуцированные токи в изолированных клетках Пуркинье мозжечка.

Подводя общий итог выполнения работы, можно отметить, что нами впервые разработаны синтетические подходы к C2/C6-производным BODIPY, модифицированным цикленовыми, 1,3,4-тиадиазольными, бензоксазольными остатками, а также к BODIPY-производным аллопрегнанолонa. Показано, что восстановительное аминирование 2(6)-формил-BODIPY цикленом позволяет получать красители линейного/циклического и симметричного/асимметричного строения. Впервые продемонстрирована общность метода синтеза C2/C6-производных BODIPY, модифицированных 1,3,4-тиадиазольными и бензаннелированными 1,3-азольными заместителями на основе реакции сочетания в окислительных условиях 2(6)-формил-BODIPY с биснуклеофилами, такими как тиогидразиды и *орто*-замещённые анилины. Отработан многостадийный метод синтеза первых конъюгатов аллопрегнанолонa и BODIPY, в которых фрагменты нейростероида и флуорофора связаны линкерами на основе природных аминокислот. Проведено систематическое изучение фотофизических свойств синтезированных красителей. Показано, что цикленовые производные BODIPY являются биосовместимыми AIE-активными красителями, реагирующими на изменение таких параметров среды как, вязкость, температура и pH. Продemonстрировано, что введение 1,3,4-тиадиазольных и бензаннелированных 1,3-азольных остатков в C2/C6-положения BODIPY открывает возможности для создания новых pH- и редокс-чувствительных флуоресцентных зондов. По совокупности, предложены новые флуоресцентные маркеры, перспективные для визуализации лизосом в раковых клетках и нейронов в тканях головного мозга.

ВЫВОДЫ

1. Разработан эффективный метод синтеза новых цикленовых производных BODIPY, основанный на реакции восстановительного аминирования 2(6)-формил-BODIPY с цикленом. Синтезирована серия новых аза-макроциклических производных BODIPY.
2. Впервые показано, что 2(6)-циклензамещённые BODIPY обладают свойствами биосовместимых AIE-активных красителей, реагирующих на изменение таких параметров среды, как вязкость, температура и pH. Полученные соединения успешно использованы как селективные маркеры для флуоресцентной визуализации лизосом в раковых клетках.
3. Разработан общий подход к синтезу производных BODIPY, 2(6)-замещённых 1,3,4-тиадиазольными/бензаннелированными 1,3-азольными остатками, основанный на реакции окислительного сочетания 2(6)-формил-BODIPY с тиогидрамидами/*орто*-замещёнными анилинами. Синтезированы серии новых гетероциклических производных BODIPY.
4. Показано, что фотофизические свойства 1,3,4-тиадиазольных и 1,3-азольных производных BODIPY зависят от функциональных заместителей в гетероциклических фрагментах. Среди синтезированных соединений обнаружены редокс- и pH-чувствительные производные.
5. Впервые синтезированы конъюгаты аллопрегнанолонa и BODIPY. Продемонстрировано, что эффективной стратегией создания флуоресцентных маркеров для визуализации нейронов в тканях головного мозга является введение флуорофорного фрагмента в 21-положение нейростероидного ядра через аминокислотный линкер.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

1. **Uvarov D.Y.**, Sapoletova N.A., Kushnir S.E., Selektor S.L., Golovanov I.S., Chursin A.Y., Scherbakov A.M., Salnikova D.I., Kopnin P.B., Kolotyrykina N.G., Fakhrutdinov A., Malakhova V., Sibgatullina G., Samigullin D., Zavarzin I.V., Goze C., Denat F., Volkova Y.A. AIE-active Cyclen-BODIPYs as multiresponsive fluorescent probes for imaging in biological samples: Design and comprehensive study // *Talanta*. – 2025. – Vol. 295 – P. 128283.
2. **Uvarov D.Y.**, Lesnikov V.K., Golovanov I.S., Burikov S.A., Salnikova D.I., Scherbakov A.M., Zavarzin I.V., Volkova Y.A. Effects of phosphorus(V)-substituted 1,3,4-thiadiazoles on electronic properties of BODIPY fluorophore // *New Journal of Chemistry*. – 2025. – Vol. 49, – P. 15885-15894.
3. **Uvarov D.Y.**, Gorbato S.A., Kolokolova M.K., Kozlov M.A., Kolotyrykina N.G., Zavarzin I.V., Goze C., Denat F., Volkova Y.A. A Straightforward Strategy for the Preparation of Diverse BODIPY Functionalized with Polyamines and Polyoxyethylenes // *ChemistrySelect*. – 2022. – Vol. 7, No. 6. – P. e202104210.
4. **Уваров Д.Ю.**, Волкова Ю.А., Заварзин И.В. Дизайн и синтез новых 1,3,4-тиадиазол-модифицированных красителей BODIPY // *Динамические процессы в химии элементоорганических соединений: [сборник тезисов]*. – Казань, Россия, 2022. – С. 178.
5. **Уваров Д.Ю.**, Волкова Ю.А., Goze C., Denat F. Процесс восстановительного аминирования для синтеза аза-макроциклических производных BODIPY // *X Научная конференция «Зелинский институт»*: [сборник тезисов]. – Москва, 2023. – С. 247.
6. **Уваров Д.Ю.**, Колбаев С.Н., Смирнова Н.В., Goze C., Denat F., Волкова Ю.А., Заварзин И.В. Визуализация нейронов с использованием новой флуоресцентной метки на основе аллопрегнанолона // *XXVII Российская молодежная конференция химиков: [сборник тезисов]*. – Нижний Новгород, Россия, 2024. – С. 228.
7. **Уваров Д.Ю.**, Саполетова Н.А., Щербаков А.М., Самигуллин Д.В., Заварзин И.В., Волкова Ю.А. Новые цикленовые производные BODIPY для флуоресцентной визуализации лизосом // *XI Всероссийская научная молодежная школа-конференция «Химия, Физика, Биология: Пути интеграции»*: [сборник тезисов]. – Москва, Россия, 2025. – С. 117.