

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ им. Н.Д. ЗЕЛИНСКОГО
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ИОХ РАН)**

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
к.х.н. Ю. А. Волкова

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. ВВЕДЕНИЕ.....	4
II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
«Синтез и применение производных BODIPY в флуоресцентной визуализации биологических объектов».....	9
II.1. Внутриклеточные органеллы.....	11
II.1.1. Лизосомы.....	11
II.1.2. Митохондрии.....	18
II.1.3. Липидные капли и эндоплазматический ретикулум.....	23
II.1.4. Эндоцитозные везикулы.....	30
II.1.5. Аппарат Гольджи.....	32
II.2. Белки.....	34
II.2.1. Эстрогеновые рецепторы α	34
II.2.2. Белки HER2.....	35
II.2.3. Рецепторы GPR54.....	37
II.2.4. Белки SOD1(V31A)-Halo.....	38
II.2.5. Рецепторы ST2.....	41
II.2.6. g4-ДНК.....	43
II.2.7. Агрегаты бета-амилоидов.....	44
II.2.8. Ферменты ЦОГ.....	45
II.3. Биорегуляторы.....	48
II.4. Параметры клеточной микросреды.....	56
III. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	63
III.I. AIE-активные цикленовые производные BODIPY.....	66
III.I.1. Синтез цикленовых производных BODIPY.....	68
III.I.2. Фотофизические свойства цикленовых производных BODIPY.....	72
III.I.3. Флуоресцентная маркировка лизосом.....	80
III.II. Синтез и изучение фотофизических свойств 2(6)-производных BODIPY, модифицированных 1,3,4-тиадиазольными и бензаннелированными 1,3-азольными заместителями.....	89
III.II.1. 1,3,4-Тиадиазольные производные BODIPY.....	91
III.II.1.1. Синтез и свойства фосфорилзамещенных 1,3,4-тиадиазольных производных BODIPY.....	91
III.II.1.2. Синтез и свойства карбоксамидзамещенных 1,3,4-тиадиазольных производных BODIPY.....	99
III.II.2. Синтез и свойства BODIPY, модифицированных бензаннелированными 1,3-азольными остатками.....	104
III.III. Флуоресцентные конъюгаты аллопрегнанолона и BODIPY для селективного окрашивания нейронов.....	109

III. III.1. Синтез конъюгатов BODIPY-3 α 5 α THP	110
III. III.2. Фотофизические свойства конъюгатов BODIPY-3 α 5 α THP	112
III. III.3. Биологические исследования BODIPY-3 α 5 α THP	113
IV. ВЫВОДЫ.....	118
V. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	119
V.1 Получение цикленовых производных 1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3 α ,4 α -диаза-s-индацена (BODIPY).....	121
V.1.1 Параметры ВЭЖХ-анализа и препаративной очистки.....	121
V.1.2 Методики синтеза цикленовых производных BODIPY	122
V.2 Получение 2,6-тиадиазол производных BODIPY	129
V.2.1 Получение серии 2,6-тиадиазол производных.....	129
V.2.2 Получение Вос-защещенного 2,6-тиадиазол производного BODIPY.....	136
V.3 Получение 1,3-азол производных BODIPY	137
V.3.1 Получение бензимидазол производных BODIPY.....	137
V.3.2 Получение бензоксазол производных BODIPY.....	142
V.3.3 Получение бензотиазол производных BODIPY	143
V.4 Получение конъюгатов Аллопрегнанолонa и 4,4-дифтор-4-бора-3 α ,4 α -диаза-s-индацена (BODIPY)	146
V.4.1 Получение исходных соединений.....	146
V.4.2 Получение целевых соединений.....	152
V.5 Изучение фотофизических свойств.....	154
V.5.1 Регистрация спектров поглощения и флуоресценции с растворов.....	154
V.5.2 Изучение пленок методами УФ и флуоресценции спектроскопии.....	154
V.5.3. Эксперимент по изучению температурной зависимости.....	154
V.5.4. Флуоресцентное pH-титрование.....	155
V.5.5. Флуоресцентное pH-титрование для измерения pKa.....	155
V.5.6. УФ/видимое и флуориметрическое спектроскопическое детектирование ионов металлов.....	156
V.5.7. Динамическое рассеяние света (ДРС) и сканирующая электронная микроскопия (СЭМ).....	156
V.6 Исследования <i>in vitro</i>	156
V.7 Квантово-химические расчеты.....	159
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	161
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	176

I. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. 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 [1].

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.

Целью диссертационной работы стали 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-замещенных аза-макроциклических производных BODIPY симметричного и асимметричного строения;
- получение с использованием реакции окислительного сочетания формил-BODIPY с биснуклеофилами широкой библиотеки производных BODIPY, замещенных 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)-замещенных BODIPY;
- изучение возможности создания на основе полученных цикленовых производных BODIPY флуоресцентных лизосомотропных маркеров, способных к агрегативно-индуцированной эмиссии;
- получение BODIPY производных нейростероида – аллопрегнанолона, и изучение возможности его применения для флуоресцентной маркировки нейронов в тканях головного мозга.

Научная новизна. 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 замещенных 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.

Практическая значимость работы. 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-3а,4а-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.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Синтез производных BODIPY, содержащих аза-макроциклические фрагменты в положениях 2 и 6 дипиррометенового ядра, может быть осуществлен реакцией восстановительного аминирования 2(6)-формил BODIPY цикленами при использовании в качестве восстановителя триацетоксиборогидрид натрия в присутствии уксусной кислоты.
- Реакция восстановительного аминирования 2(6)-формил BODIPY цикленом позволяет получать аза-макроциклические производные BODIPY линейного, циклического, симметричного и асимметричного строения.
- 2(6)-Циклензамещенные BODIPY способны к агрегативно-индуцируемой эмиссии в водных растворах и могут быть использованы как флуоресцентные сенсоры, реагирующие по принципу off-on на полярность, вязкость, температуру и pH среды, а также по принципу on-off на содержание в водных растворах катионов меди (II). По совокупности фотофизических свойств, 2(6)-циклензамещенные BODIPY перспективны в качестве селективных маркеров для флуоресцентной визуализации лизосом в раковых клетках.
- Синтез производных BODIPY, содержащих 1,3,4-тиадиазольные и бензаннелированные 1,3-азольные фрагменты в положениях 2 и 6 дипиррометенового ядра, может быть осуществлен реакцией окислительного сочетания 2(6)-формил BODIPY с такими биснуклеофилами как

тиогидразиды фосфорилтиомуравьиной кислоты, тиогидразиды оксаминовых кислот, *орто*-фенилендиамины, *орто*-аминофенолы и *орто*-аминотиофенолы.

- В серии 2(6)-замещенных BODIPY природа и положение функциональных групп в гетероциклических остатках - 1,3,4-тиадиазольном или бензаннелированном 1,3-азольном, существенным образом влияет на квантовые выходы флуоресценции красителя в различных растворителях, а также на его сенсорные свойства по отношению к pH среды. Фосфиноксид-замещенные 1,3,4-тиадиазольные производные BODIPY являются редокс-чувствительными соединения.
- Эффективной стратегией создания флуоресцентных маркеров для визуализации нейронов в срезах тканей головного мозга является введение флуорофора BODIPY в 21 положение каркаса нейростероида – аллопреганолона, с использованием аминокислотного линкера.

Достоверность результатов. Достоверность результатов обеспечивалась совокупностью физико-химических методов анализа, использованных для характеристики синтезированных соединений (спектроскопия ЯМР, масс-спектрометрия высокого разрешения, УФ- и флуоресцентная спектроскопия). Структура избранных соединений установлена методом рентгеноструктурного анализа. Фотофизические исследования и эксперименты по биовизуализации проводились в соответствии с современными международными протоколами, адаптированными из публикаций в высокорейтинговых научных журналах. Для обеспечения надежности данных, ключевые эксперименты проводились в нескольких независимых повторностях, что позволило провести последующий статистический анализ и оценить значимость полученных результатов.

Личный вклад автора. Диссертантом был осуществлен поиск, сбор и анализ данных, имеющихся в литературе по теме исследования, а также выполнен основной объем экспериментальной работы по синтезу исследованных в работе соединений и изучению их физико-химических, оптических и сенсорных свойств в растворах и в твердых пленках. Автор непосредственно принимал участие в постановке научных задач, планировании эксперимента, в обсуждении полученных результатов, анализе данных ЯМР-, УФ-, флуоресцентной спектроскопии и масс-спектрометрии. Автор принимал непосредственное участие в подготовке материалов для публикации в научных журналах, представления на конференциях, включая написание, редактирование текстов рукописей и тезисов.

Публикации. По материалам исследования опубликовано 2 статьи в рецензируемых научных журналах, а также индексируемых Web of Science и Scopus и входящих в список ВАК, а также 6 тезисов докладов всероссийских и международных конференций.

Апробация работы. Результаты диссертационной были работы 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 174 страницах машинописного текста и содержит 37 рисунков, 11 схем, 7 таблиц. Список цитируемой литературы насчитывает 201 наименование.

Благодарности. Работа частично выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (№ 22-13-00161, 22-13-00161-П, №25-23-00303). Автор выражает благодарность к.б.н. Д.В. Самигуллину и к.б.н. Г.В. Субгатуллиной, сотрудникам КазНЦ РАН, за предоставленные результаты и анализ флуоресцентной визуализации лизосом клеточной линии HeLa; к.б.н. А.М. Щербакову и Д.И. Сальниковой, сотрудникам НМИЦ им. Блохина, за предоставление результатов оценки антипролиферативной активности (МТТ-тест) и флуоресцентного окрашивания клеток MCF7; к.ф.-м.н., сотруднику Института мозга РАН С.Н. Колбаеву за любезно предоставленные результаты и анализ оценки модулирующего действия соединений в отношении ГАМК_A-рецептора; к.х.н. Н.А. Саполетовой и к.х.н. С.Е. Кушнир, сотрудникам лаборатории МГУ им. Ломоносова, за помощь в проведении ДРС- и СЭМ- экспериментов и анализ результатов; к.х.н., сотруднику лаборатории ИОХ РАН И.С. Голованову за предоставление и анализ результатов расчёта (оптимизации геометрий основного и возбужденного состояний методами DFT, моделирование спектров поглощения к.х.н., сотруднику ИОХ РАН В.К. Лесникову за помощь в регистрации и анализе циклической вольтамперометрии; к.х.н., сотруднику МГУ им. Ломоносова А.С. Абелю за помощь в проведении и анализе фотометрического и флуоресцентного титрования; д.х.н., зав. лаб. института ИФХЭ С.Л. Селектор за помощь в регистрации спектров поглощения и флуоресценции твердых образцов.

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю к.х.н Ю.А. Волковой за чуткое руководство, помощь и поддержку на всех этапах научной работы.

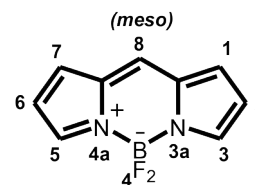
Работа проводилась по плану НИР Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (г. Москва).

II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

«Синтез и применение производных BODIPY в флуоресцентной визуализации биологических объектов»

В настоящее время синтетические органические красители (small molecule dyes) являются одним из важнейших инструментов биологии и биохимии. В частности, флуоресцентные маркеры на их основе позволяют визуализировать структуры клеток и тканей, а также отслеживать внутриклеточные динамические процессы в реальном времени, изучать локализацию и движение молекул *in vitro* и исследовать взаимодействия между молекулами внутри клетки [1]. Типичная структура флуоресцентного маркера включает флуорофорный фрагмент, отвечающий за флуоресцентный отклик, ковалентно связанный непосредственно или через спейсер с рецепторной частью, обеспечивающей селективность взаимодействия с мишенью.

Среди многообразия известных органических флуоресцентных красителей (родаминов, пиренов, периленов, сквараинов, цианинов, кумаринов, DPP), особое место занимают BODIPY-красители (Рис. 1). Жесткая молекулярная архитектура 4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-с-индаценового ядра обеспечивает этим соединениям исключительно высокие квантовые выходы



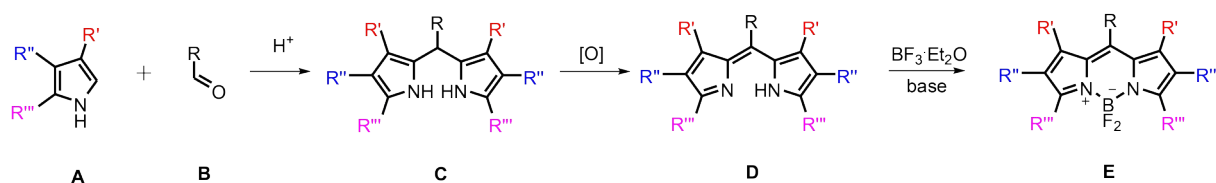


Схема 1. Синтез симметрично-замещенных BODIPY

Получение несимметрично-замещенного каркаса BODIPY предполагает синтез 2-карбонил-пирролов **F** реакцией ацилирования пирролов **A'** агентами **B'** (Схема 2). В качестве ацилирующих компонентов наиболее часто применяют хлорангидриды[6, 7] и ангидриды[8] карбоновых кислот, или сложные ортоэфиры[9]. Конденсация пирролов **A** и **F** в кислых средах приводит к несимметричным дипиррометенам **G**, которые также как и симметричные аналоги **D**, вступают в реакцию комплексообразования с эфиром трёхфтористого бора приводя к BODIPY **H**.

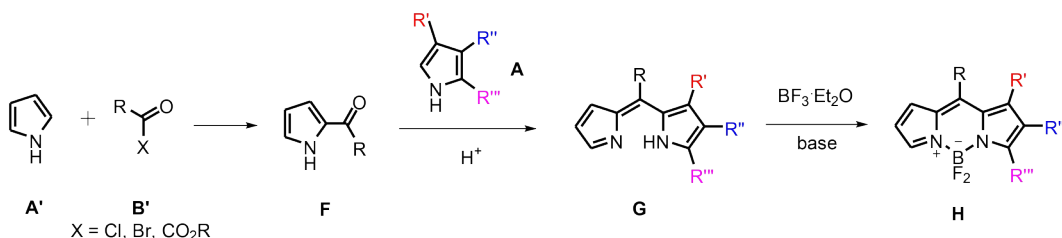


Схема 2. Синтез несимметрично-замещенных BODIPY

Кроме того, несимметрично-замещенные BODIPY могут быть получены постфункционализацией каркаса красителя или заместителей в его составе [10]. Так, галогенсодержащие BODIPY служат ключевыми субстратами для селективной функционализации 1, 2, 3 и 8 положений ядра красителя *via* реакции нуклеофильного замещения и кросс-сочетания (Стилле, Сузуки, Соногаширы, Ульмана) [10]. Альтернативные стратегии модификации включают C-H-активацию положений 2 и 3 ядра BODIPY, а также реакцию Кневенагеля 3,5-диметилпроизводных, в то время как 3 и 5 положения проявляют высокую активность в реакциях радикального арилирования. [11, 12]

Благодаря синтетической доступности и структурному разнообразию производных BODIPY, эти красители нашли широкое применение в качестве флуоресцентных маркеров. В литературе представлены обзоры, охватывающие их использование как флуоресцентных сенсоров для детектирования ионов и молекул, фотосенсибилизаторов для терапии и меток для отслеживания белков и клеточных органелл [13-21]. Несмотря на то, что некоторые из этих работ затрагивают внутриклеточную визуализацию, стремительный рост числа публикаций в этой области за последние годы требует отдельной систематизации.

В настоящем литературном обзоре рассмотрены представительные работы 2023-2025 гг., посвященные применению красителей ряда BODIPY для визуализации внутриклеточных органелл, отслеживания динамики белков и рецепторов, детектирования биорегуляторов, а также мониторинга параметров клеточного микроокружения. Особое внимание уделено выявлению взаимосвязи между структурными особенностями молекул и их функциональными характеристиками в биологических системах.

II.1. Внутриклеточные органеллы

Разработка флуоресцентных маркеров для специфического мечения органелл основывается на принципе селективного накопления внутри целевого компартмента. Ключевым является использование свойств самой органеллы, таких как разность трансмембранного потенциала (для митохондрий) или низкие значения pH (для лизосом и эндосом). Селективность достигается за счет введения в ядро флуорофора функциональных остатков, которые отвечают за регулирование липофильности красителя, реагируют на изменение параметров среды или взаимодействуют с ферментами/рецепторами на мембране органеллы. Как правило, для достижения максимального контраста и минимального фонового сигнала дизайн таких маркеров требует соблюдения баланса между гидрофобностью, зарядом молекулы и её способностью к специфическому связыванию.

II.1.1. Лизосомы

Лизосомы – мембранные органеллы, выступающие в роли главного деградиционного компартмента эукариотической клетки. Ключевой характеристикой лизосом является кислая внутренняя среда (pH 4.5–5.0), поддерживаемая работой протонной АТФазы (V-типа). Помимо эндоцитоза и аутофагии, лизосомы опосредуют ключевые клеточные процессы, включая иммунный ответ, апоптоз, репарацию плазматической мембраны и гомеостаз холестерина [22, 23]. Нарушения в работе лизосом могут приводить к нейродегенеративным расстройствам, вызывать опухолевые и сердечно-сосудистые заболевания, что негативно сказывается на здоровье человека [24]. В связи с чем флуоресцентная визуализация лизосом не просто позволяет увидеть их местоположение, но и оценить их функциональное состояние, динамику и роль в норме и при различных заболеваниях, что является критически важным для фундаментальной науки и разработки новых методов диагностики и лечения [25, 26].

Конструкция лизосом-направленных зондов является модульной и включает два основных компонента: флуоресцентную основу-оксиды (хромофор) и функциональную группу, ответственную за селективное накопление внутри органеллы. Фундаментальный принцип, на

котором работает большинство лизосомотропных флуоресцентных маркеров, известен как "кислотная ловушка" (acid trapping) [27]. Ее принцип состоит в следующем: нейтральная молекула липофильного зонда пассивно диффундирует через плазматическую и органеллярные мембраны внутрь лизосомы, где в кислых условиях, функциональная группа зонда (чаще всего аминогруппа) протонируется. Протонированная гидрофильная форма зонда не может свободно пройти обратно через липидный бислой мембраны лизосомы, и молекула зонда "застревает" внутри органеллы. Помимо pH-зависимых зондов, также известны зонды, работающие как off-on метаболизируемые флуорогенные субстраты лизосомальных ферментов и флуоресцентные конъюгаты с декстраном или альбумином [28, 29].

В недавней работе, Wang с соавт. [30] описали флуоресцентную метку **BDP1** (в литературном источнике **BML**), селективно накапливающуюся в лизосомах и позволяющую количественно оценивать в них содержание оксида азота (NO) (Рис. 2). Отслеживания пространственно-временной динамики и внутриклеточной локализации NO в клетках критически важно для разработки новых терапевтических стратегий, направленных на коррекцию NO-зависимых сигнальных путей, поскольку отклонение от нормы содержания NO в клетке служит одним из ключевых факторов повреждения лизосом и запуска механизмов клеточной смерти при нейродегенеративных, сердечно-сосудистых, онкологических и аутоиммунных заболеваниях [31, 32]. Ключевая стадия синтеза красителя **BDP1** включала конденсацию 3,5-диметил-8-толилпроизводного BODIPY **6** с альдегидом **3** (Рис. 3.I). В основе off-on флуоресцентного отклика **BDP1** лежит снятие PET-гашения неподеленной парой электронов атома азота анилинового фрагмента в результате реакции нитрозирования NO (Рис. 2.II). Краситель **BDP1** характеризовался селективностью по отношению к NO в присутствии других аналитов, таких как ионы металлов (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Na^+ , K^+), активные формы кислорода, тиолы (глутатион, цистеин, гомоцистеин), эндогенные альдегиды, низкой цитотоксичностью, а также устойчивостью в диапазоне pH от 2 до 8. В экспериментах по колокализации **BDP1** с Lyso-Tracker Green, селективно накапливаемом в лизосомах, в клетках НерG2 инкубированных в атмосфере NO коэффициент перекрытия для **BDP1** составил 0.93 (Рис 2.III). Также эффективность **BDP1** для флуоресцентной визуализации эндогенного NO *in vivo* была продемонстрирована в тестах на данио-рерио.

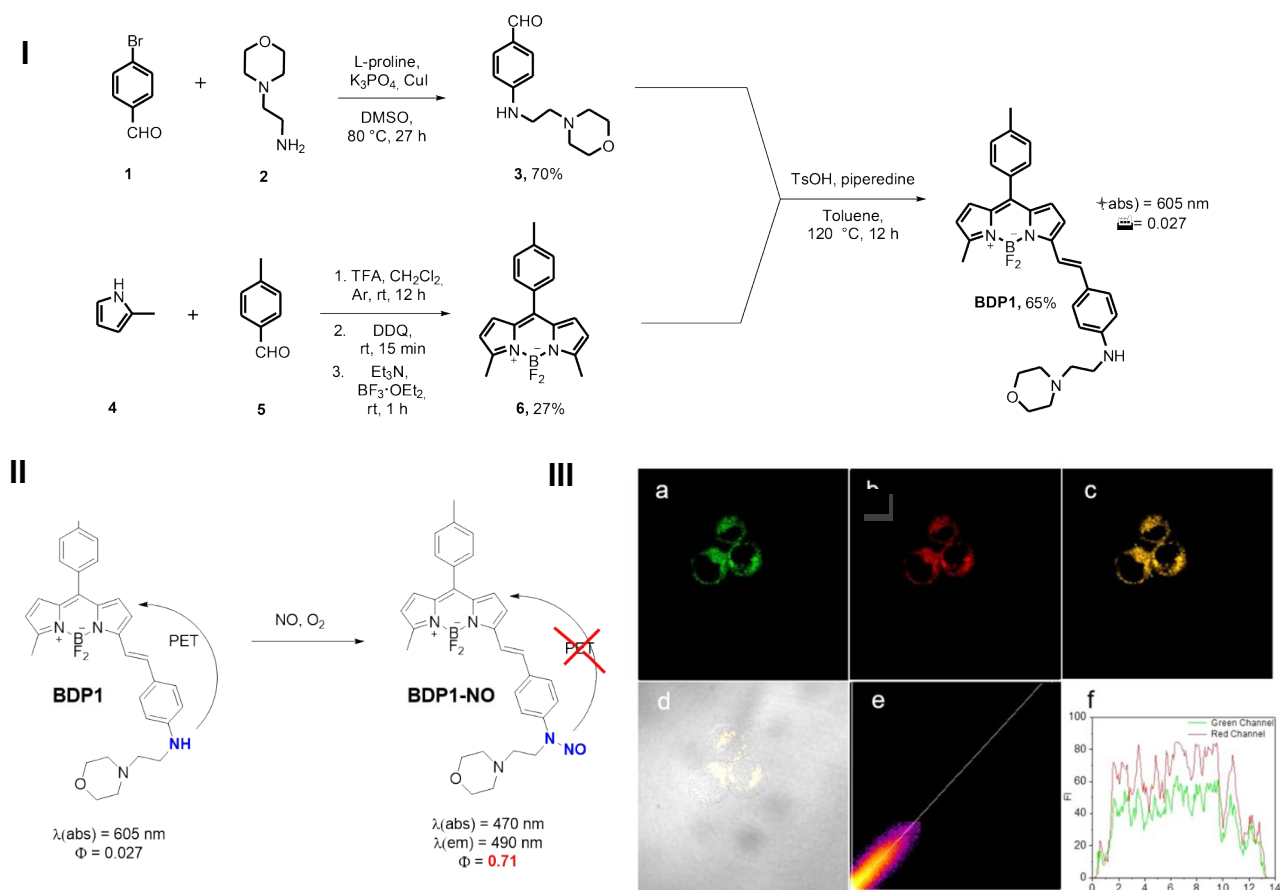


Рисунок 2. (I) Схема синтеза флуоресцентной метки **BDP1**. (II) Принцип работы флуоресцентной метки **BDP1** для визуализации NO в лизосомах. (III) Флуоресцентная визуализация клеток HepG2 после инкубации с Lyso-Tracker-Green (a), с красителем **BDP1** (b). (c) Наложение двух изображений. (d) Светлопольное изображение. (e) График корреляции локализованной флуоресценции красного и зелёного каналов. (f) Интенсивность флуоресценции зелёного и красного канала интересующей области (ROI) в клетках HepG2. Изображение заимствовано из: Wang Z. и соавт., 2023 [30].

Chan с соавт. [33] опубликовали краситель **BDP2** (в литературном источнике **CarBDP**) способный селективно накапливаться в лизосомах и оценивать внутриклеточную вязкость (Рис. 3). Соединение **BDP2** было синтезировано из пиррола **8** и карбазол альдегида **7** с использованием классического подхода к сборке каркаса BODIPY (Схема 1, Рис. 3.I). Краситель **BDP2** относится к AIE-активным соединениям, для которого off-on отклик возникает в водных растворах в результате агрегации молекул красителя, затрудняющее свободное вращения фенильного и карбазольного фрагментов в *мезо*-положении ядра BODIPY (Рис. 3.II). Несмотря на то, что большинство лизосом-направленных проб являются pH чувствительными, **BDP2** не чувствителен к изменению pH среды и сохраняет стабильный уровень флуоресценции, как в кислой, так и щелочной средах. Используя конфокальную микроскопию на линии клеток MCF-7, инкубированных с красителями **BDP2**, Lyso-Tracker-Green и Mito-Tracker-Green (Рис. 3.IIIc), была показана значительная колокализация ($Rr = 0.71$) флуорофора **BDP2** с лизосомальным маркером Lyso-Tracker-Green. В экспериментах с дексаметазоном, стабилизатором

лизосомальной мембраны, продемонстрировали способность метки **BDP2** отслеживать внутриклеточную вязкость в клетках (Рис. 3.IIIa, 3.IIIb).

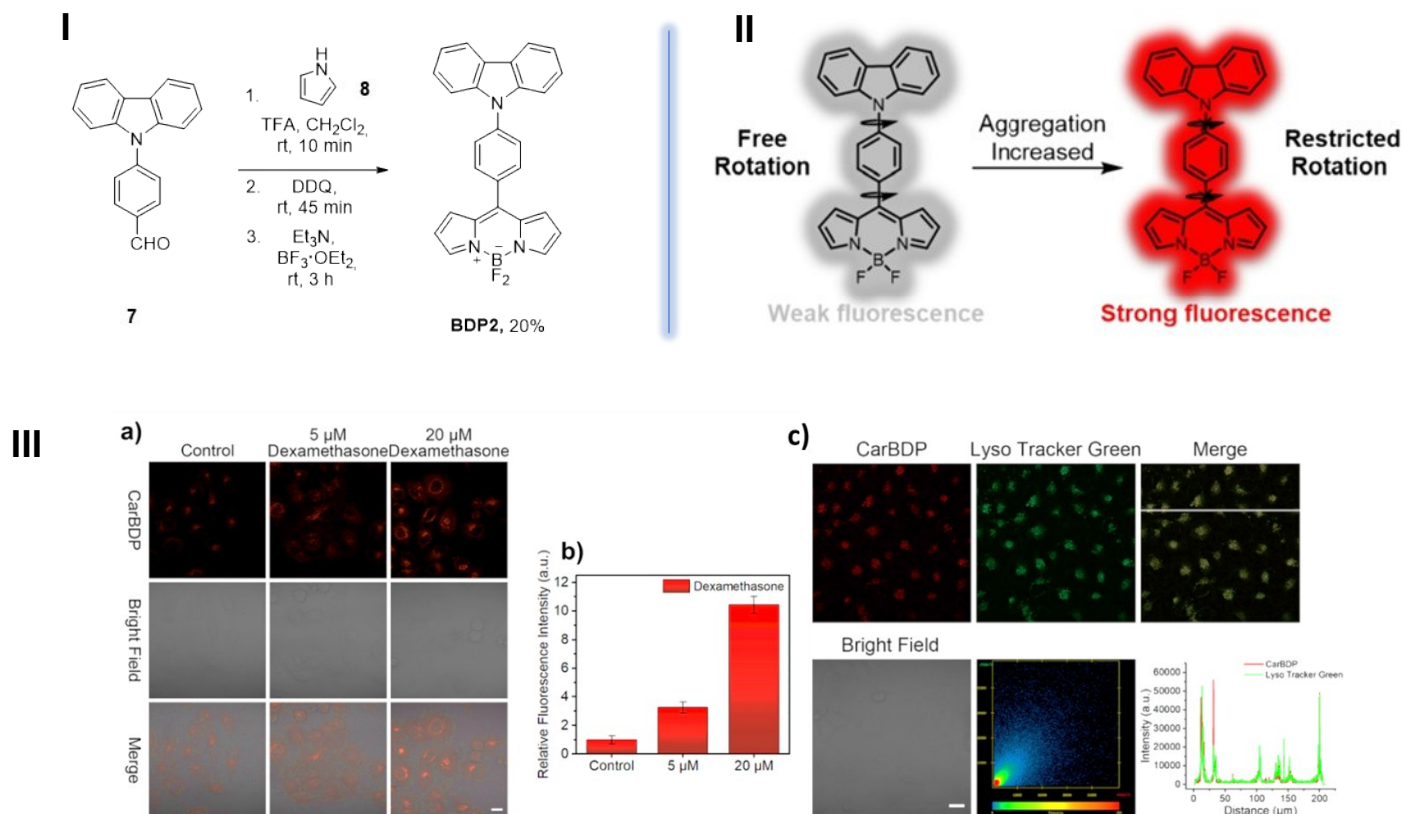


Рисунок 3. (I) Схема синтеза флуоресцентной метки **BDP2**. (II) Механизм инициирования флуоресценции за счет агрегации **BDP2**. (III) (a) Конфокальная флуоресцентная визуализация клеток MCF-7 последовательно инкубированных дексаметазоном (5 и 20 мкМ) и меткой **BDP2** (10мкМ). (b) гистограмма интенсивности флуоресценции окрашенных клеток MCF-7 в отсутствие/присутствии дексаметазона (0; 5 и 20 мкМ). (c) Конфокальные флуоресцентные микрофотографии клеток MCF-7 инкубированные с красителем **BDP2**, Lyso tracker Green. Наложение двух изображений. Светопольное изображение. Совместная локализация красного и зеленого канала в клетке. Изображения заимствованы из: Wang X.-Y. и соавт., 2023 [33].

Guo с соавт. [34] разработали краситель **BDP3** (в литературном источнике **2TPEB**) в качестве лизосом-направленного маркера перспективного для фотодинамической терапии раковых заболеваний (Рис. 4). Разработка фотодинамических агентов, специфически накапливающихся в лизосомах, представляет собой перспективную терапевтическую стратегию лечения онкологических заболеваний, поскольку раковые клетки, часто усиливают свою лизосомальную активность для поддержания гомеостаза, а также содействуют клеточной пролиферации и выживанию в стрессовой микросреде [35, 36]. Ключевой стадией синтеза **BDP3** является реакция палладиевого сочетания димера **10** с бромидом **11**, несущим тетрафенилэтиленовый AIE-генный фрагмент (Рис. 4.I). В водных средах AIE-активный краситель **BDP3** образует устойчивые наночастицы, которые способны локализоваться в лизосомах живых клеток. Молекулы **BDP3** также самоорганизуются с поверхностно-активным амфифильным триблочным сополимером **F-127**, давая наночастицы **2TPEB NP**, также

способные селективно накапливаться в лизосомах (Рис. 4.II и 4.III). Размер наночастиц **2TPEB NP** подтвержденный методами просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и динамического светорассеяния (ДРС) составил 87-125 нм. Значение коэффициента корреляции Пирсона составило 0.90 в экспериментах по колокализации **2TPEB NP** с коммерческим красителем Lyso-Tracker-Green. Наночастицы **2TPEB NP** демонстрировали противоопухолевую активность при применении в качестве фототерапевтического агента как на клеточных моделях ($IC_{50} \sim 4.1 \mu M$), так и на живых организмах (мышь с опухолью).

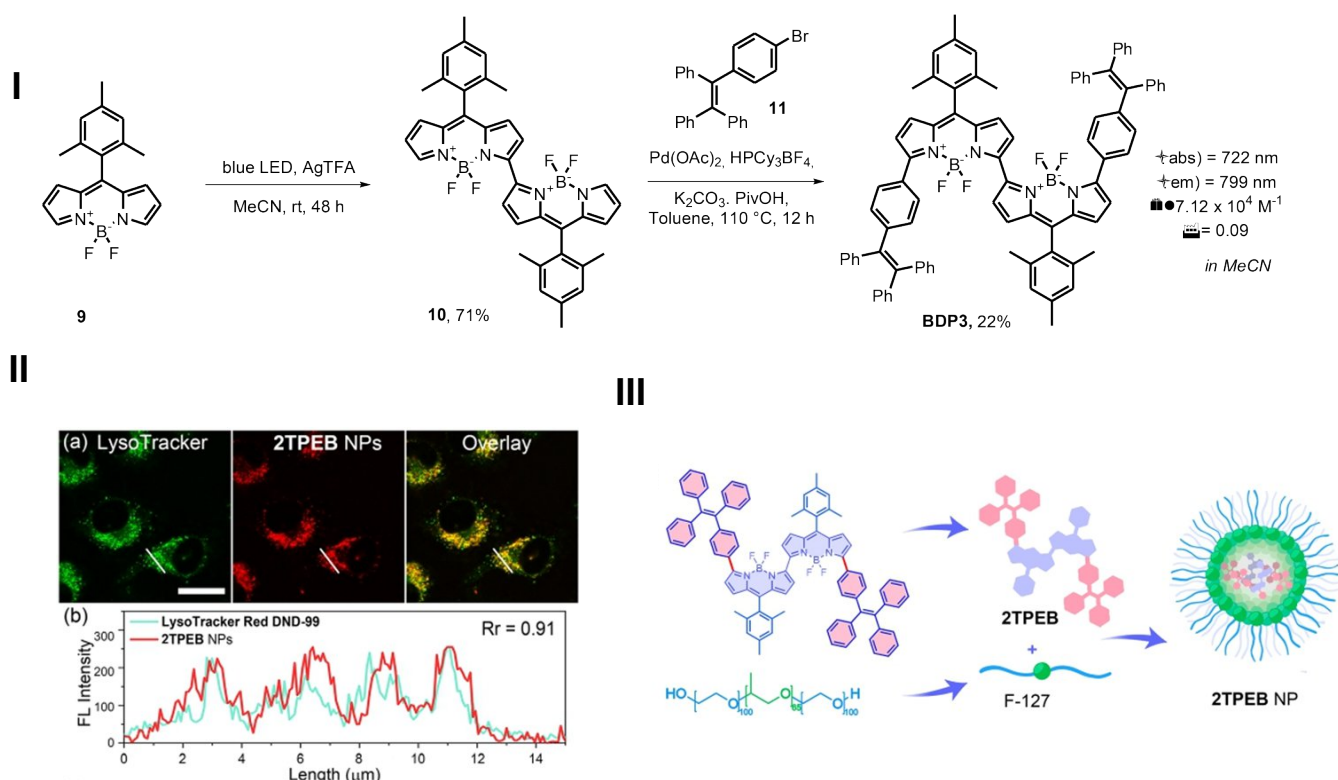


Рисунок 4. (I) Схема синтеза AIE красителя **BDP3**. (II) (a) Конфокальные микрофотографии клеток 4T1, инкубированных наночастицам красителя **BDP3** (**2TPEB**) и коммерческим Lyso-Tracker-Green. Наложение двух изображений. (b) Кривая колокализации зеленой (Lyso-Tracker-Green) и красной (**2TPEB NP**) флуоресценции в клетках 4T1. (III) Схематическое изображение самособранных наночастиц из **BDP3** (**2TPEB**) и F-127. Изображение заимствовано из: Guo X. и соавт., 2024 [34].

Еще один пример самосборных наночастиц разработанных для лизосом-направленной фотодинамической терапии недавно был опубликован Sun с соавт. [37]. Авторы предложили самоорганизацию плохо растворимого в водных средах красителя **BDP4** с триблочным сополимером **F-127** в наночастицы **BDP4 NP** (Рис. 5.II) в качестве эффективной стратегии получения селективно накапливающихся в лизосомах агентов для фотодинамической терапии (Рис. 5). Ключевой стадией синтеза красителя **BDP4** стала реакция S_NAr атома хлора в бис-BODIPY **13** амином **14**, несущим рН-чувствительный морфолиновый фрагмент, ответственный за доставку в лизосомы **BDP4** (Рис. 5.I). Результаты просвечивающей электронной микроскопии и динамического светорассеяния продемонстрировали, что наночастицы **BDP4 NP** имеют сферическую морфологию со средним диаметром 91.28 нм и обладают хорошей коллоидной

стабильностью. Методом конфокальной микроскопии была подтверждена преимущественно лизосомная локализация как красителя **BDP4**, так и наночастиц **BDP4 NP** в живых клетках 4T1 (Рис. 5.Ia, 5.IIb). В экспериментах *in vivo* установлено, что фототерапия с использованием **BDP4 NP** — независимо от способа введения, непосредственно в опухоль или внутривенно — эффективно тормозит рост опухолей у мышей с раком молочной железы.

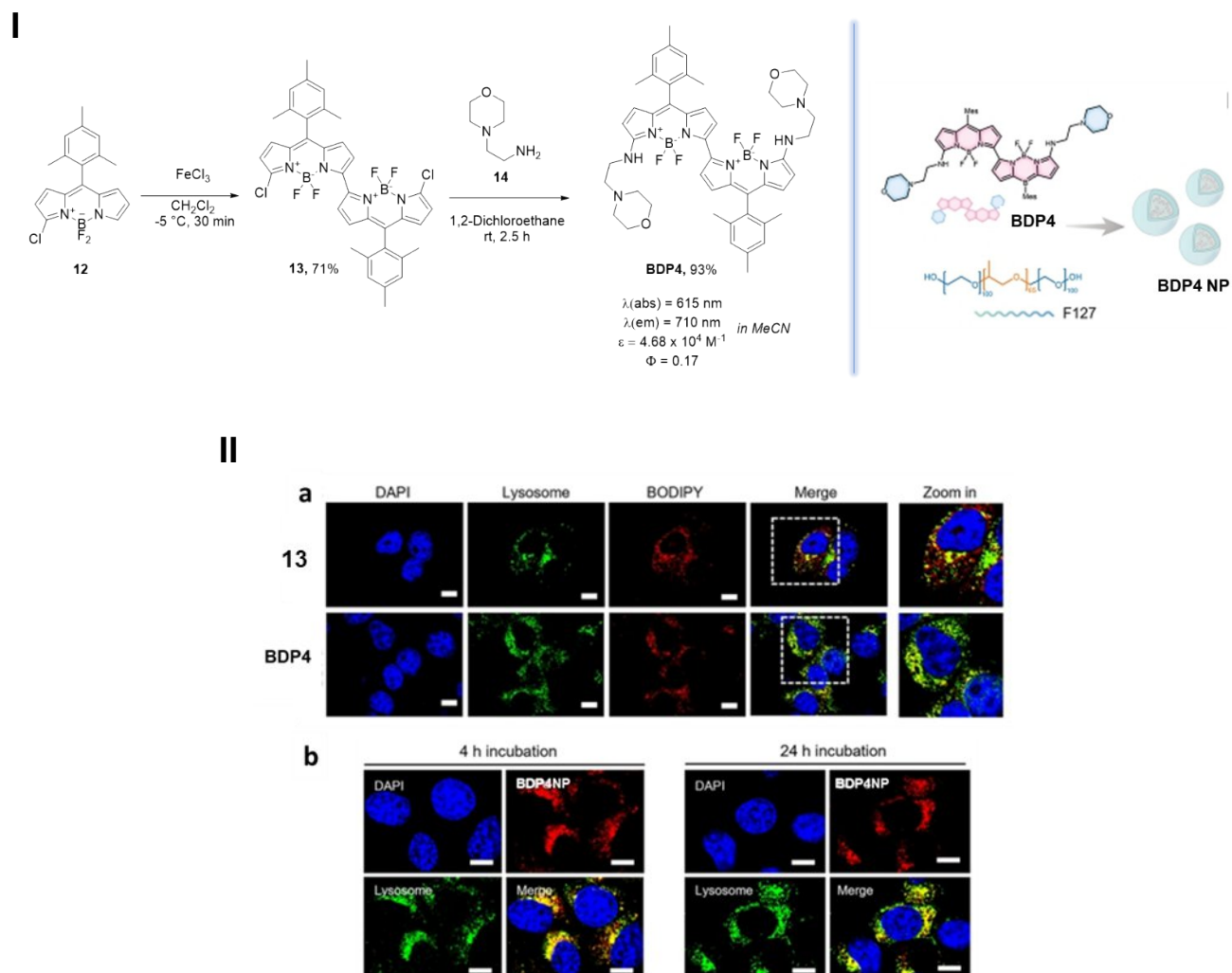


Рисунок 5. (I) Схема синтеза ориентированного на лизосомы красителя **BDP4**. Образование наночастиц **BDP4 NP**. (II) (a) Конфокальные микрофотографии клеток 4T1, инкубированные с красителями **13** и **BDP4**. Визуализация клеточных ядер красителем DAPI (1ый столбец). Визуализация лизосом с помощью Lyso-Tracker-Green (2ой столбец). Окрашивание и визуализация лизосом красителями **13** и **BDP4**. Наложение трех изображений клеток 4T1. (b) Конфокальные микрофотографии клеток 4T1, после 4ех и 24ех часовой инкубации с наночастицами **BDP4 NP**. Визуализация клеточных ядер красителем DAPI. Визуализация лизосом с помощью Lyso-Tracker-Green. Окрашивание и визуализация лизосом **BDP4 NP**. Наложение трех изображений клеток 4T1. Изображение заимствовано из: Sun Q. и соавт., 2023 [37].

В работе Figliola с соавт. [38] описана серия фотосенсибилизаторов **BDP5-7** на основе BODIPY, содержащих в качестве лизосом-ориентирующей группы анилиновый заместитель (Рис. 6). 2-Йод-6-этиниламино замещенных **BDP5-7** синтезировали с использованием реакций кросс-сочетания (бис)йодпроизводных BODIPY **15**, **17** с ацетиленом **16**, бороновой кислотой **18** и

(трибутилстаннил)анилина **20** (Рис. 6.I). Ввиду низкой водорастворимости, исследования соединений **BDP5-7** проводились в смеси с неионогенным ПАВ Cremophor ELR. Атоврами было показано, что соединения **BDP5-7** в протонированных формах генерируют активные формы кислорода (АФК), а значения их рKa составляют от 2.0 до 3.6.

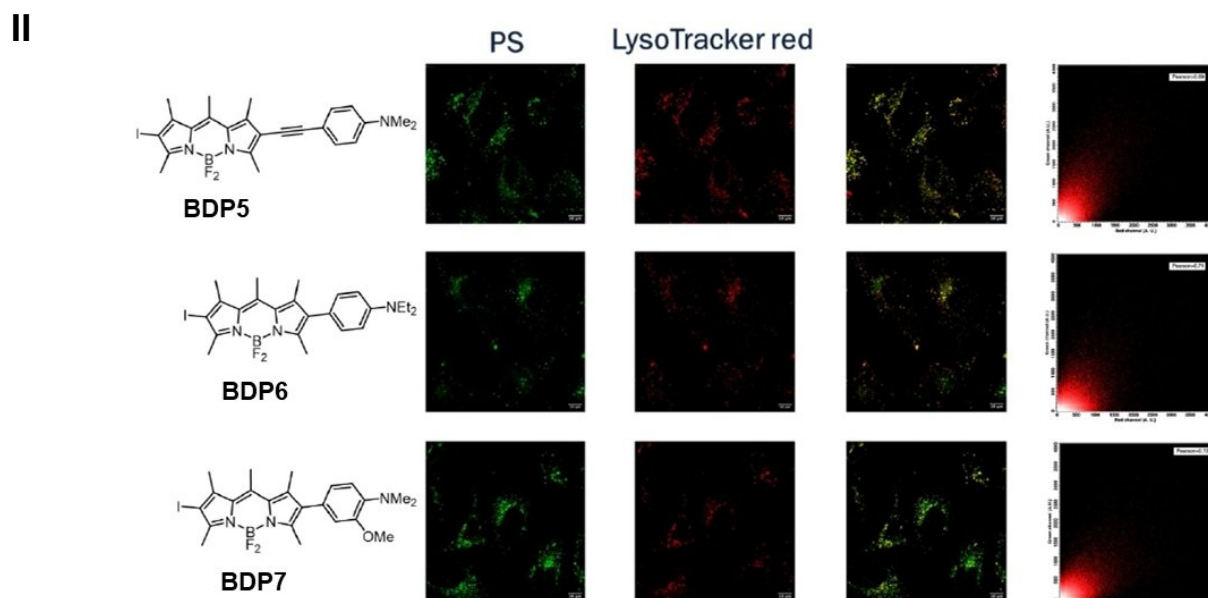
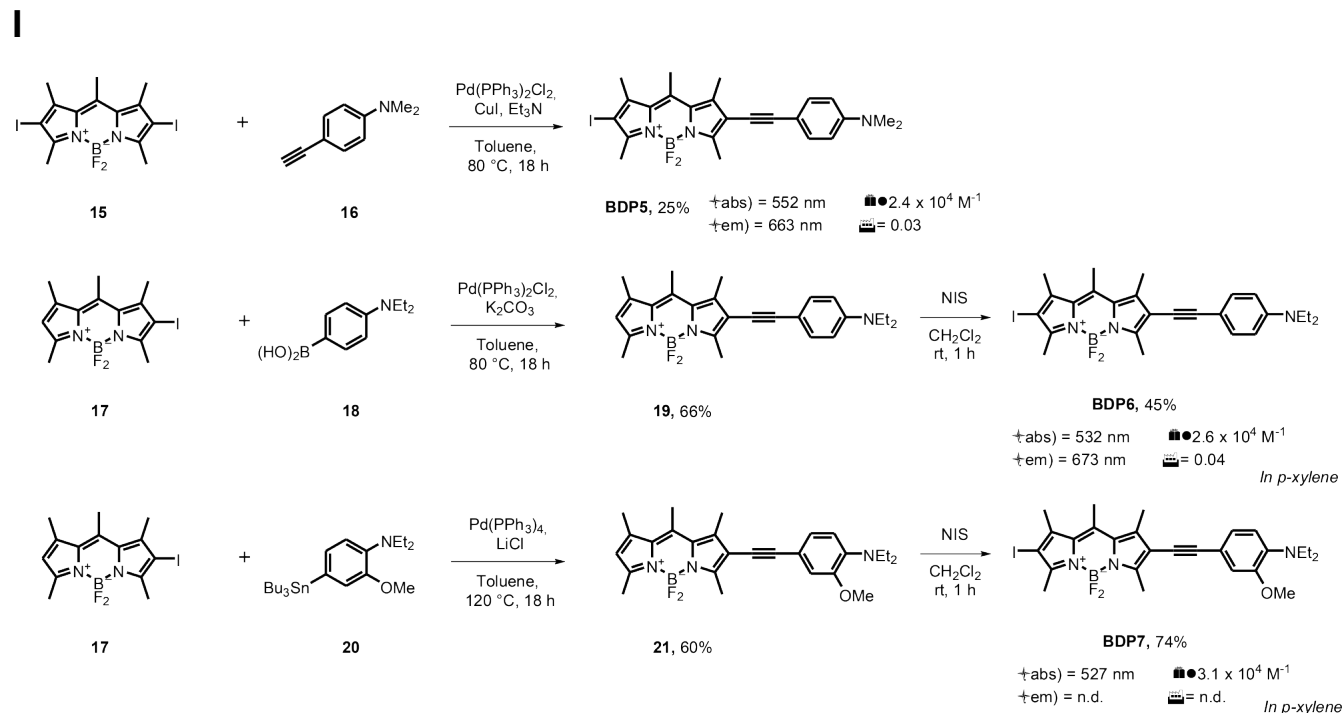


Рисунок 6. (I) Схема синтеза красителей **BDP5-7**. (II) Конфокальные микрофотографии живых клеток HeLa. Визуализация капсулированными (Cremophor EL) фотосенсибилизаторами **BDP5-7**. Визуализация коммерческим красителем Lyso-Tracker-DeepRed, нацеленным на лизосомы. Совместная локализация интенсивности красного (Lyso-Tracker-DeepRed) и зелёного цвета (**BDP5-7**) в клетках HeLa. Изображение заимствовано из: Figliola C. и соавт., 2023 [38].

Сравнение **BDP5-7** с красителем Lyso-Tracker-Red в экспериментах на клетках HeLa подтвердило колокализацию их флуоресценции. Коэффициенты корреляции Пирсона составили

0.69 для **BDP5**, 0.71 для **BDP6** и 0.72 для **BDP7**. Авторы исследования отмечают, что полученные фотосенсибилизаторы обладают оптимальной фототоксичностью (IC_{50} : 0.16 μ M (**BDP5**), 0.12 μ M (**BDP6**), 0.12 μ M (**BDP7**)) по отношению к клеткам, однако их применение в живых организмах ограничено из-за неподходящего диапазона облучения.

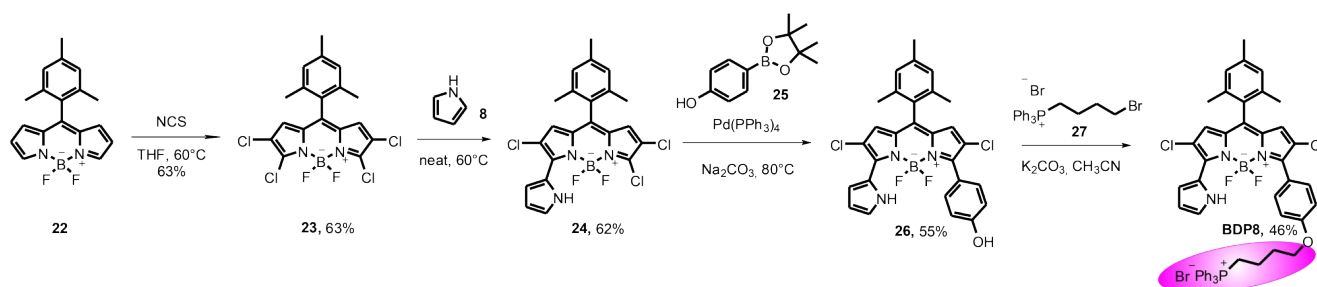
II.1.2. Митохондрии

Митохондрии — это двумембранные клеточные органеллы, ответственные за ключевые биоэнергетические процессы, в первую очередь за синтез АТФ. Их флуоресцентная визуализация позволяет исследовать функциональное состояние клеток, в частности изменения трансмембранного митохондриального потенциала, оценивать динамику митохондриальной сети, процессы апоптоза, а также нарушения их функций при патологических состояниях [39, 40]. Большинство известных митохондриотропных флуоресцентных зондов являются липофильными катионами [41, 42]. Принцип их накопления в митохондриях основан на том, что ключевым параметром функциональной активности митохондрий является митохондриальный мембранный потенциал — отрицательный заряд на внутренней стороне митохондриальной мембраны. Флуоресцентный зонд, представляющий собой липофильный катион, благодаря липофильности легко проникает через плазматическую мембрану и цитоплазму клетки, где катионная составляющая молекулы электростатически притягивается к отрицательно заряженной внутренней митохондриальной мембране. Накопление зонда напрямую зависит от величины митохондриального мембранного потенциала: чем выше потенциал, тем больше красителя накапливается и тем интенсивнее флуоресценция. Потеря потенциала (например, при апоптозе) приводит к быстрому вымыванию зонда, что является индикатором нарушения функции митохондрий.

В недавней работе Miao с соавт. [43] в качестве флуоресцентного красителя, селективно накапливающегося в митохондриях, описано соединение **BDP8** (Рис. 7). Реализованный авторами многостадийный синтез **BDP8** представлен на Рис. 7.I и включает модификацию на последней стадии 2,6-дихлор-3-пиррол-6,8-бисарил флуорофора BODIPY **26** катионным остатком бутилтрифенилфосфония. Краситель **BDP8** характеризовался сбалансированным липофильно-гидрофильным балансом, низкой цитотоксичностью, и флуоресценцией в дальнем красном и ближнем инфракрасном диапазонах спектра. Соединение **BDP8** селективно накапливается в митохондриях клеток HeLa; коэффициент корреляции Пирсона с эталонным митохондриальным красителем родамином 123 составил 0.93. Также краситель **BDP8** обладает значительно более высокой фотостабильностью в живых клетках по сравнению с коммерческим

аналогом Mito-Tracker-DeepRed, деградируя в 2.3 раза медленнее по сравнению с ним при непрерывном облучении.

I



II

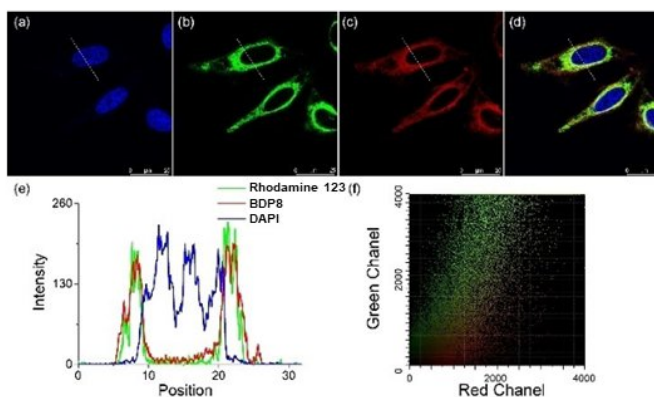


Рисунок 7. (I) Схема синтеза BODIPY **BDP8**, ориентированного на окрашивание митохондрий. (II) Конфокальные микрофотографии клеток HeLa после инкубации с DAPI (a) родамином 123 (b), флуорофором **BDP8** (c). (d) Наложение трех изображений клеток HeLa. (e) Профили интенсивности флуоресценции **BDP8** и родамина 123 в пределах отмеченной области. (f) Диаграмма рассеяния интенсивностей родамина 123 и флуорофора **BDP8**. Изображение заимствовано из: Miao W. и соавт., 2023 [43].

В работе Walter с соавт. [44] описана серия митохондриотропных флуоресцентных зондов **BDP9-14**, структура которых включает липофильный 1,3,5,7-тетраметил-8-фенил BODIPY фрагмент и гидрофильные алкил(полиэтиленгликоль)триарилфосфониевые катионы (Рис. 8). Синтез красителей **BDP9-14** включал на заключительной стадии нуклеофильное замещение атома брома в BODIPY **30** третичными фосфинами (Рис. 8.I). Они демонстрировали практически идентичные максимумы поглощения, эмиссии, коэффициенты экстинкции и высокие квантовые выходы флуоресценции. Авторами показано, что красители **BDP9-14** стабильны в физиологических условиях (при pH = 5-8), а также, что полиэтиленгликолевые производные обладают самой низкой биодоступностью в серии. Обработка клеток HeLa красителями **BDP9-14** выявила, что последние селективно накапливаются в митохондриях, о чем свидетельствовали высокие коэффициенты Пирсона, составившие 0.76–0.95, относительно данных для митохондриальной метки MitoTracker-Red (Рис. 8.II).

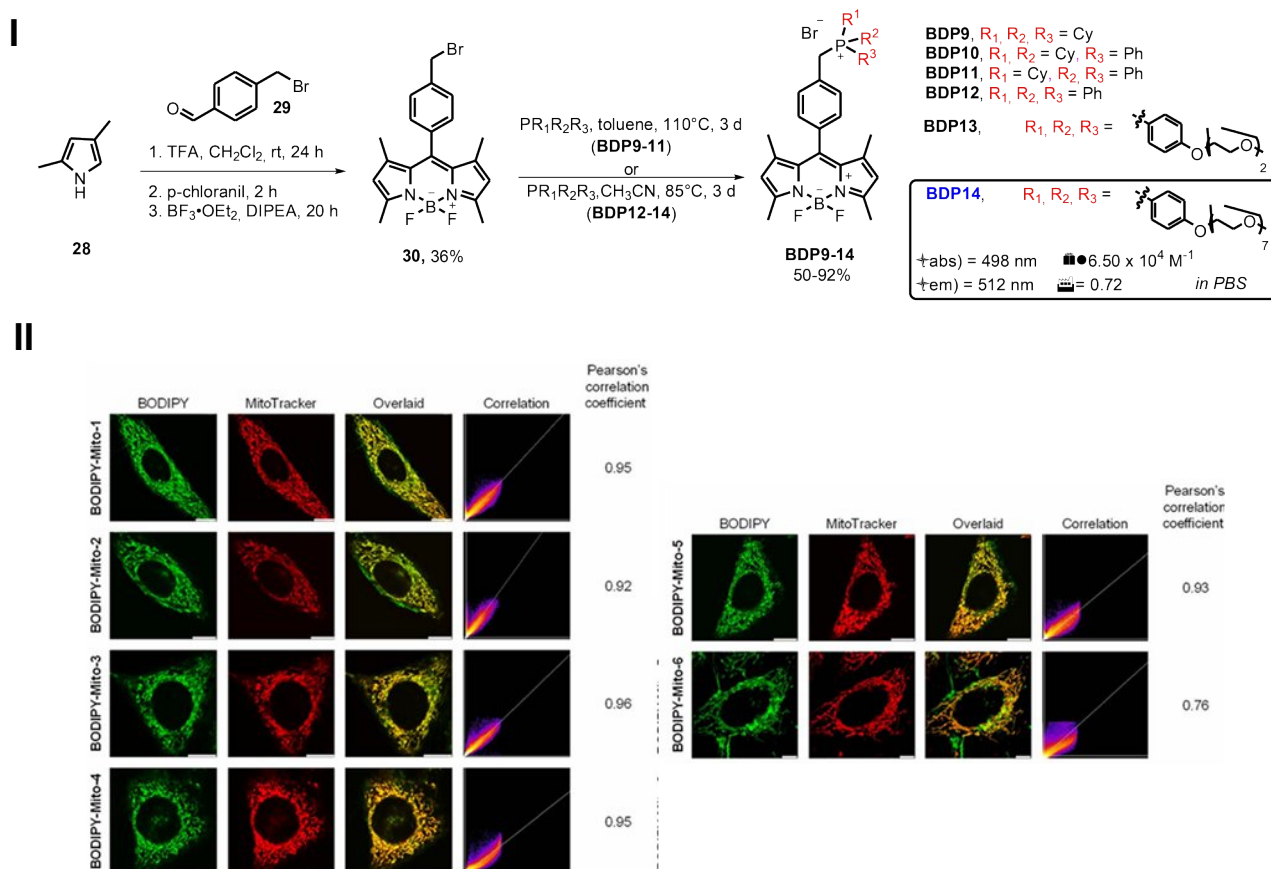


Рисунок 8. (I) Схема синтеза **BDP9-14**, нацеленных на визуализацию митохондрий. (II) Конфокальные микрофотографии клеток HeLa после инкубации с **BDP9-14**; коммерческим; Наложение двух изображений клеток HeLa. (f) Диаграмма рассеяния интенсивностей Mito-Tracker-Red и **BDP9-14**. Изображение заимствовано из: *Walter E. R. и соавт., 2024 [44]*.

Јана с соавт. [45] разработали перспективный для фотодинамической терапии раковых заболеваний митохондриотропный краситель **BDP15**, несущий металлокомплексный остаток кобальта(III) (Рис 9). Ключевая стадия синтеза **BDP15** включала обработку 8-гидроксихинолин производного **34**, полученного конденсацией Кнёвенагеля альдегида **33** с 1,3,5,7-тетраметил BODIPY **32**, *N*-(2-гидроксибензил)-*N,N*-бис(2-пиридилметил)амином и хлоридом кобальта(II) в окислительных условиях (Рис 9.I). Авторами было показано, что для комплекса **BDP15** характерна низкая фототоксичность в отсутствие источника облучения, что вероятнее всего, было связано с высокой константой комплексообразования и высокими электрохимическим потенциалом комплекса, не попадающим в диапазон биологических окислительно-восстановительных реакций (от -0.4 до $+0.4$). Методом конфокальной микроскопии в экспериментах по колокализации с коммерческим маркером MitoTracker Green показана преимущественная митохондриальная локализация **BDP15** в клетках HeLa (коэффициент Пирсона = 0.77) (Рис 9.II). Также для комплекса **BDP15** было показано, что в условиях облучения он демонстрирует высокую фотоцитотоксичность в наномолярных концентрациях [IC_{50} (HeLa) = $0.36 \mu\text{M}$] и индуцирует апоптотическую гибель клеток посредством генерации синглетного

кислорода. Кроме того, было характерно **BDP15** селективное накопление в раковых клетках относительно нормальных.

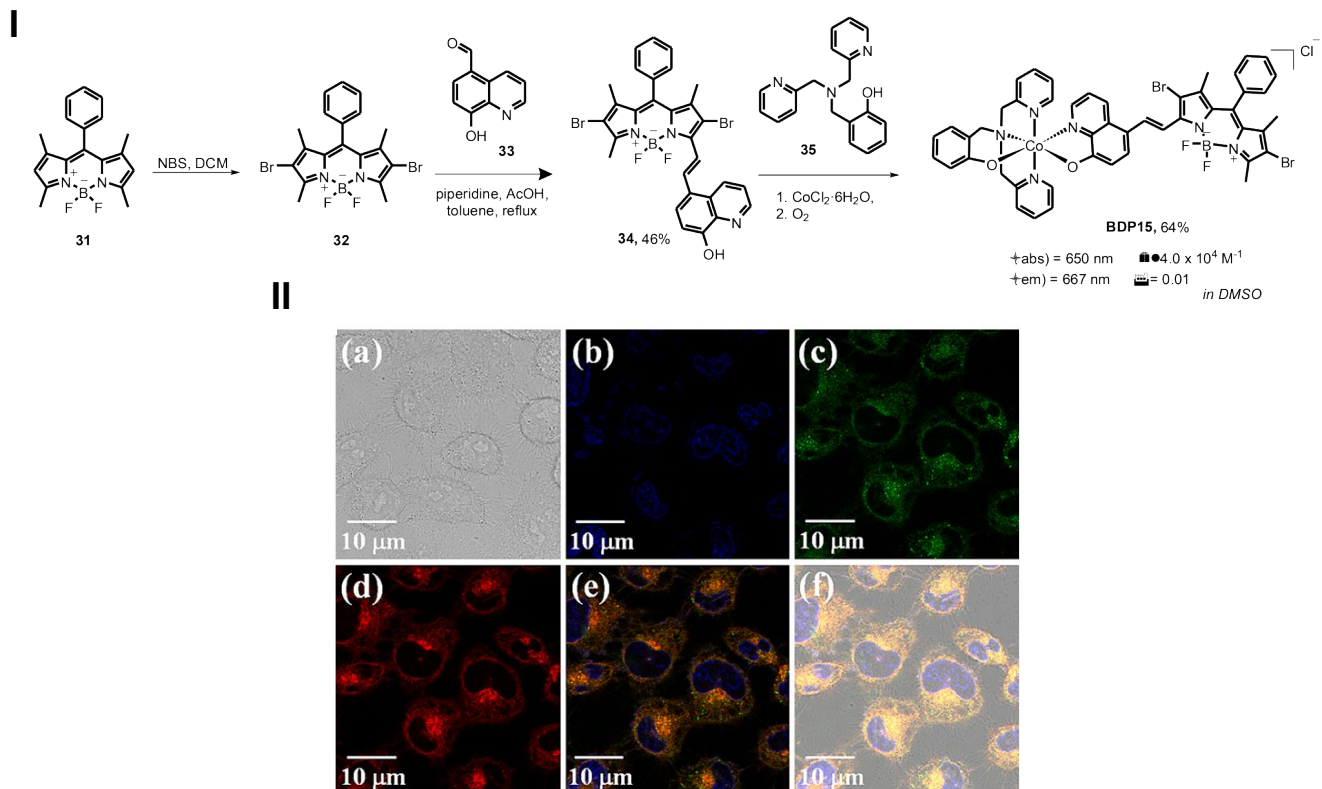


Рисунок 9. (I) Схема синтеза флуоресцентного металлокомплекса **BDP15**. (II) Конфокальные микрофотографии клеток HeLa, инкубированных флуоресцентной меткой **BDP15** (d), красителем Hoechst - окрашивание ядер(b), Mito-Tracker-Green – визуализация митохондрий (c) ($R = 0.79$). (a) Светопольное изображение. (e) Наложение трех изображений для изучения колокализации. Изображение заимствовано из Japa A. и соавт., 2023 [45].

В работе Pham с соавт. [46] в качестве фотосенсибилизатора, селективно накапливающегося в митохондриях и эффективного в условиях гипоксии, был предложен краситель **BDP16** (Рис. 10). Соединение **BDP16** было синтезировано с использованием классического *one-pot* подхода (Схема 1), включавшей конденсацию 9-этил-3-карбазолкарбоксальдегида **36** с пирролом **37** в присутствии трифторуксусной кислоты, последующее окисление и комплексообразование под воздействием эфира трифторида бора (Рис. 10.I). Показано, что для соединения **BDP16** характерен механизм переноса заряда от донора карбазола на акцептор BODIPY. Такой механизм способствует увеличению констант скорости интеркомбинационного перехода (k_{ISC}) и скорости флуоресценции (k_f). Экспериментальные данные подтвердили механизм I типа генерации активных форм кислорода для красителя **BDP16**. Окрашивание клеток HeLa соединением **BDP16** наряду с коммерческим красителем BioTracker405-BlueMitochondria (Рис. 10.II) показало, что краситель **BDP16** преимущественно локализуется в митохондриях (коэффициент корреляции Пирсона 0.89). Накопление в митохондриях авторы связывают с акцепторными свойствами ядра BODIPY, которое

притягивается к областям с высокой электронной плотностью (т.е. к отрицательно заряженным областям, таким как матрикс митохондрий).

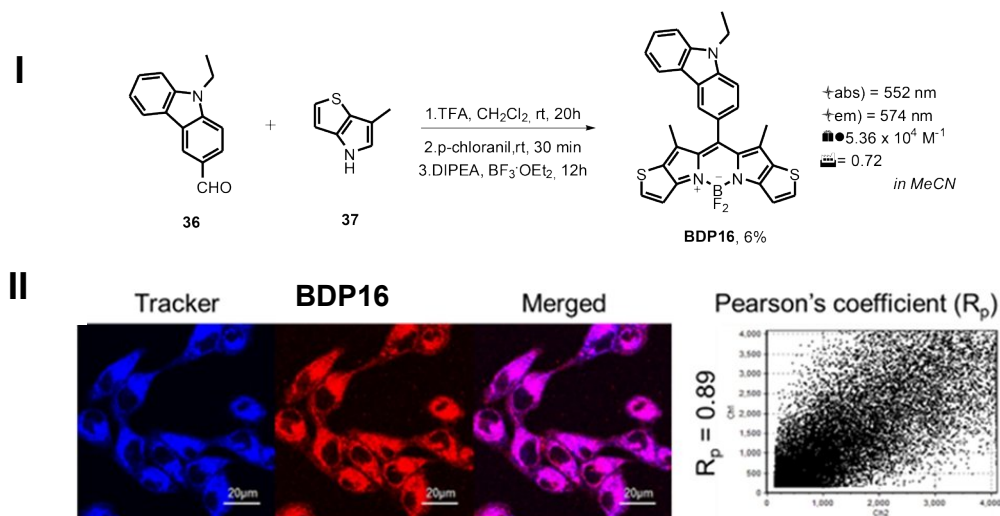


Рисунок 10. (I) Схема синтез красителя **BDP16**. (II) CLSM-изображения клеток HeLa, инкубированных с **BDP16** с красителем BioTracker405-BlueMitochondria (MTB) ($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 430\text{--}455 \text{ nm}$). Изображение заимствовано из Pham T. C. и соавт., 2024 [46]

Uradhyau с соавт. [47] недавно опубликовали митохондриотропный фотосенсибилизатор **BDP17** (в литературном источнике **Acacplatin-RB**), несущий в *мезо*-положении комплекс платины (II) (Рис. 11). Краситель **BDP17** был разработан как фотоактивируемый аналог лекарственного средства цисплатина – препарата, широко применяющегося в химиотерапии онкологических заболеваний [48]. Его синтез включал обработку цисплатином дикетона **44**, полученного реакцией кросс—сочетания ацетиленов **42** с арилйодидом **43** (Рис. 11.I). Авторами было показано, что краситель **BDP17** обладает низкой токсичностью в отсутствие источника облучения. Конфокальная микроскопия подтвердила преимущественную митохондриальную локализацию **BDP17** в клетках A549 и показала его высокую колокализацию с коммерческим красителем MitoTracker Green (коэффициент Пирсона = 0.65). (Рис. 11.II).

Результаты окрашивания с 5,5,6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазоилкарбоцианином иодидом (JC-1) подтвердили локализацию комплекса **BDP17**. Накопление в митохондриях авторы связывают с акцепторными свойствами ядра BODIPY, которое притягиваются к областям с высокой электронной плотностью (т.е. к отрицательно заряженным областям, таким как матрикс митохондрий).

Кроме того, выявлена умеренная степень совместного расположения с эндоплазматическим ретикулулом ($R = 0.43$). Также была показана перспективность применения **BDP17** в качестве фототерапевтического препарата. Иммуноокрашивание с использованием β -тубулина и аннексина V-FITC/иодида пропидия продемонстрировала способность **BDP17**

вызывать фотоактивируемый разрыв микротрубочек и клеточный апоптоз. Кроме того, отмечена высокая цитотоксичность этого красителя ($IC_{50} = 0.9 \mu M$) в отношении клеточной линии A549 в условиях облучения.

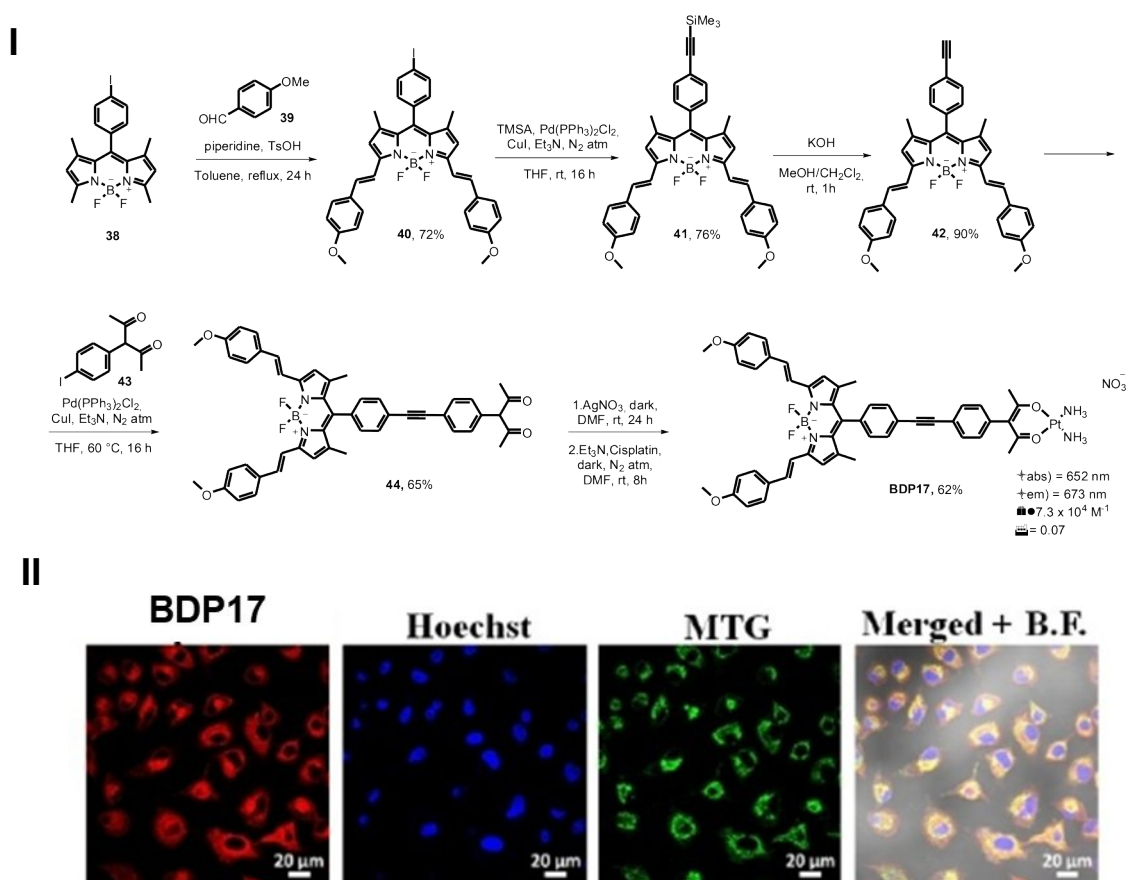


Рисунок 11. (I) Схема синтеза красителя **BDP17**. (II) Конфокальные микрофотографии клеток A549 после инкубации с красителями: визуализация флуорофором **BDP17**, визуализация ядер с помощью Hoechst, визуализация Mito-Tracker-Green. Наложение трех изображений клеток A549. Изображение заимствовано из Upadhyay и соавт., 2023 [47].

II.1.3. Липидные капли и эндоплазматический ретикулум

Липидные капли представляют собой уникальные органеллы, которые не только отвечают за хранение липидов в клетках, но и активно участвуют в клеточном метаболизме липидов[49]. Эндоплазматический ретикулум (ЭР) — это протяженная мембранная сеть, играющая ключевую роль в синтезе липидов и белков [50]. Эти две структуры тесно связаны: липидные капли зарождаются в монослой мембраны ЭР и остаются физически ассоциированными с ним, что облегчает обмен липидами и белками между цитоплазматическим листком мембраны ЭР и фосфолипидным монослойом липидной капли. Флуоресцентная визуализация позволяет в реальном времени отслеживать динамику их взаимодействия, локализацию и количество в живых клетках[51]. Этот метод является ключевым для изучения клеточного метаболизма

липидов, поскольку нарушения в биогенезе и функции липидных капель связаны с такими патологиями, как сахарный диабет 2 типа, ожирение, сердечно-сосудистые заболевания и рак [52].

Направленная разработка флуоресцентных маркеров для липидных капель непосредственно связана с их уникальной архитектурой, сочетающей гидрофобное ядро с внешним фосфолипидным монослоем и функциональными белками [53, 54]. Приоритет отдается красителям, демонстрирующим флуоресцентный off-on эффект при переходе от водной среды к неполярной липидной среде, что соответствует переходу красителя из цитозоля в липидную каплю. Такие красители, как правило, характеризуются сольватохромизмом, агрегацией, сопровождающейся тушением флуоресценции, а также возможностью управления интенсивностью их флуоресценции через RIM (Mechanism of Restriction of Intramolecular Motion), благодаря наличию в их структурах объемных функциональных заместителей.

В недавней работе Zhu с соавт. [55] в качестве перспективных маркеров для визуализации липидных капель с помощью конфокальной и STED-микроскопии были предложены **BDP18** и **BDP19** (Рис. 12). Селективность накопления в липидных каплях **BDP18** и **BDP19** обеспечивалась их строением, а именно, в первую очередь мезитильным фрагментом в *мезо*-положении ядра BODIPY, отвечающим за RIM, и бензотиазольным фрагментом во втором положении ядра флуорофора, отвечающим за гидрофобно-гидрофильный баланс красителей. Красители **BDP18** и **BDP19** были получены конденсацией альдегидов BODIPY **47,48** с 2-аминотиофенолом **49** в окислительных условиях (Рис. 12.I). Методом ко-локализационного анализа с коммерческим маркером липидных капель NpCN1 установлена высокая специфичность флуоресцентных красителей **BDP18** и **BDP19** к липидным каплям в клетках линии A549. Значения коэффициентов корреляции Пирсона для них составили 0.84 ± 0.07 и 0.74 ± 0.08 , соответственно. Также была показана возможность использования данных красителей для визуализации интенсификации межклеточного транспорта липидных капель в раковых клетках по сравнению с нормальными.

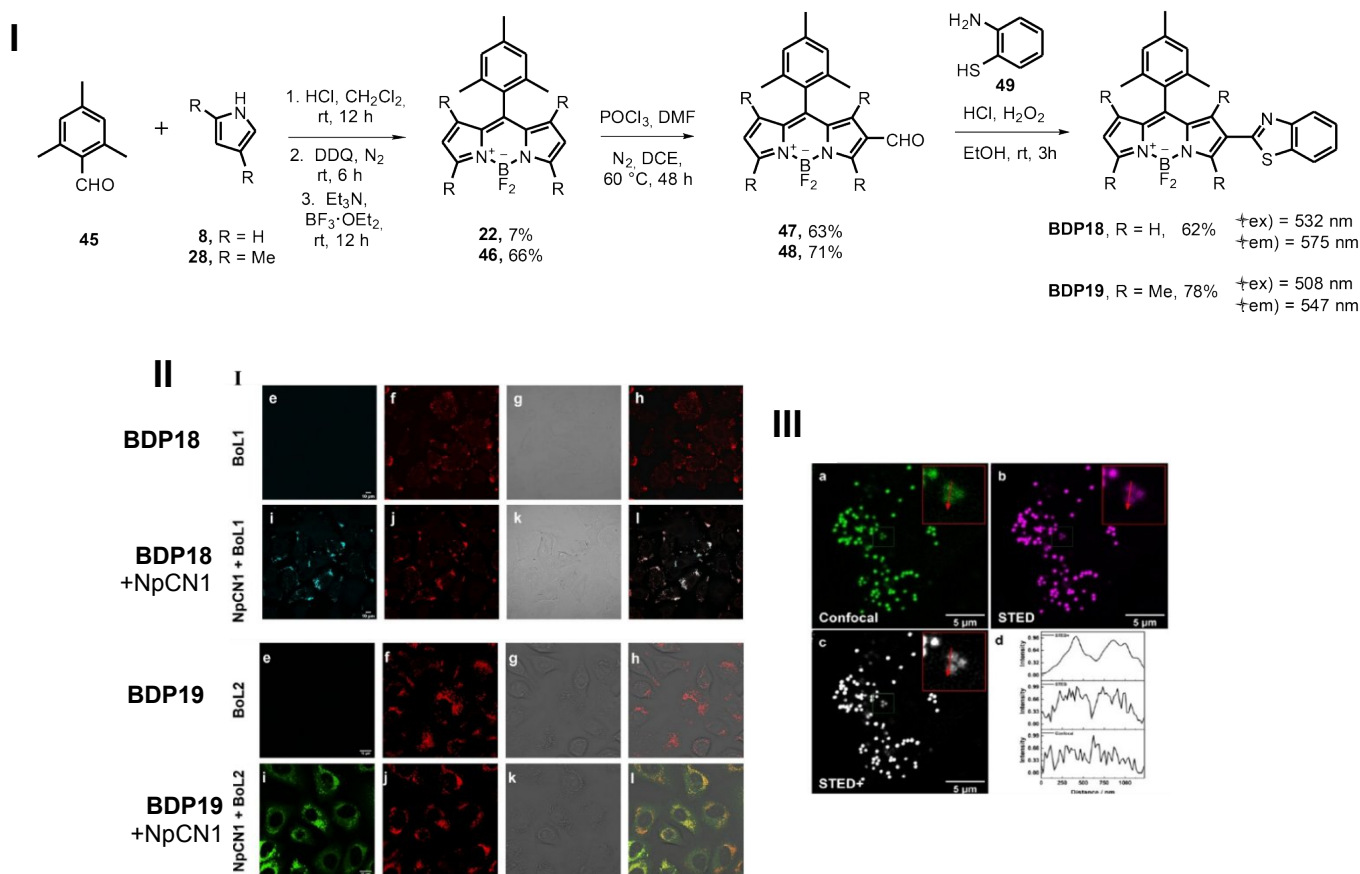


Рисунок 12. (I) Схема синтеза красителей **BDP18** и **BDP19**. (II) Конфокальные микрофотографии клеток A549, инкубированных **BDP18** и **BDP19**. (e,i) Окрашивание BODIPY красителями. (f,j) Визуализация липидных капель коммерческим NpCN1. (g,k) Светопольное изображение. (h,l) Наложение изображений. (III) Фотографии конфокальной (a) и STED-микроскопии (b) клеток A549, окрашенных **BDP19** (10 мкМ). (c) Деконволюционное STED-изображение (STED+) с использованием программы Huygens. (d) Изменение интенсивностей на отмеченной области, отражающее разрешающую способность микроскопии. Изображения заимствованы из: Zhu J. и соавт., 2024 [55].

В работе[56] Wang с соавт. систематически изучили влияние взаимного расположения (гет)арильных заместителей в *мезо*-положении ядра BODIPY и при атоме бора в красителях **BDP20** и **BDP21**, в результате чего в качестве флуоресцентного красителя, селективно накапливающегося в липидных каплях, был предложен **BDP21a** (Рис. 13). Авторами было показано, что замена атомов фтора в классическом 4,4-дифтор-3а,4а-диаза-*s*-индаценовом ядре на тиофен или фенил приводит к существенно изменяет его ключевые оптоэлектронные и фотофизические свойства. Соединения **BDP20** и **BDP21** были синтезированы реакцией борфторидных комплексов со станнанами (Рис. 13.I). AIE-активные красители **BDP20** и **BDP21**, образовывали *J*-агрегаты в водных средах и демонстрировали сольватохромные свойства и биосовместимость. Методом ко-локализационного анализа с коммерческим маркером липидных капель Lipi-Blue установлена высокая специфичность флуоресцентного красителя **BDP21a** к липидным каплям в клетках линии HeLa. Значение коэффициента корреляции Пирсона составило 0.94.

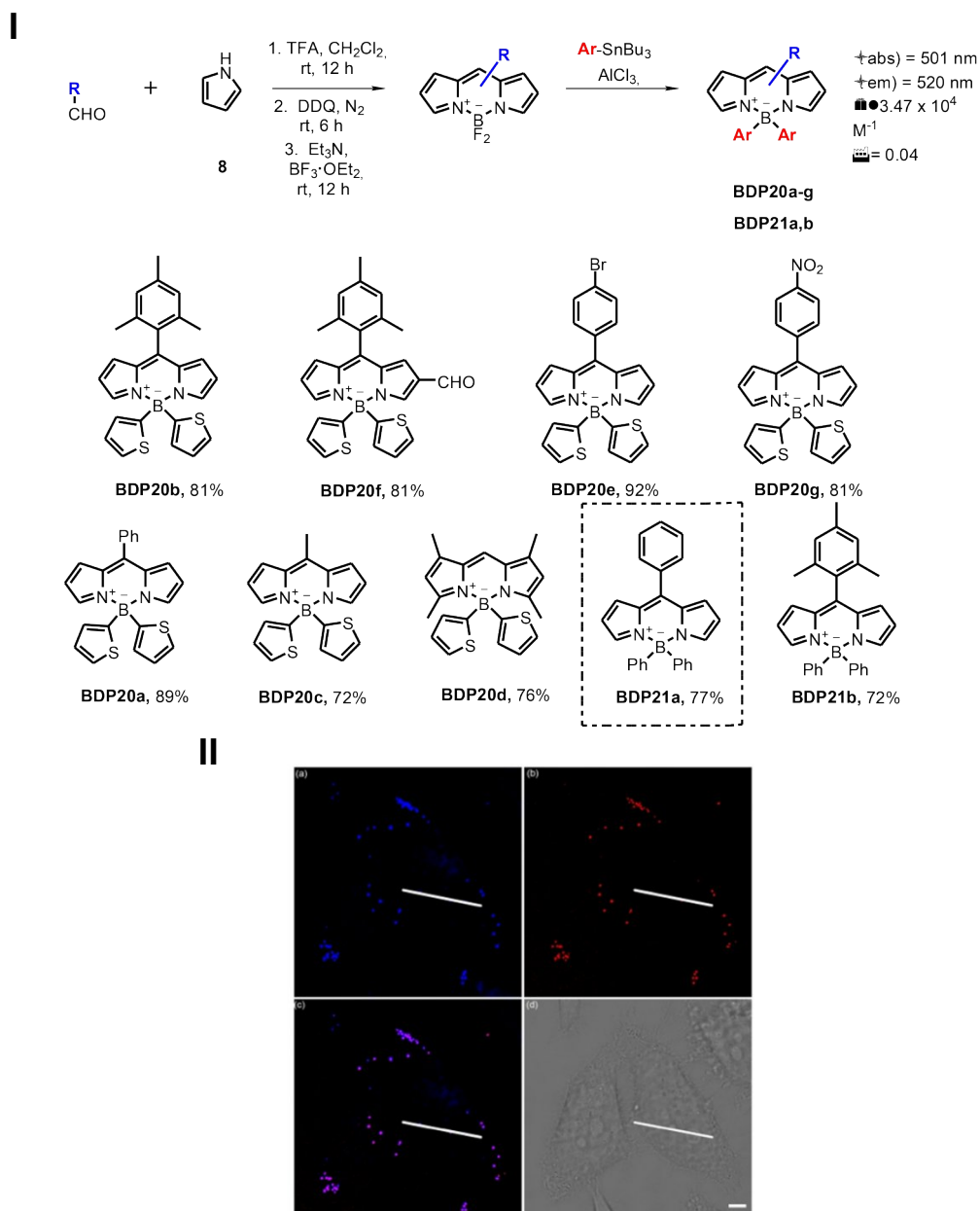


Рисунок 13. (I) Схема синтеза флуоресцентных красителей **BDP20a-g**, **BDP21a,b**. (II) Конфокальные микрофотографии клеток HeLa, инкубированные красителем **BDP21a**. (a) Визуализация липидных капель коммерческим Lipi-Blue (b) Визуализация флуоресцентной меткой **BDP21a**. (c) Наложение двух предыдущих изображений (корреляция Пирсона $R = 0.94$). (d) Светопольное изображение. Изображение заимствовано из: Wang Z. и соавт., 2023 [56].

В недавней работе [57] Engelhardt с соавт. предложили уникальный двухкомпонентный краситель **BDP22** (в литературном источнике **Lipo-Fluddy-1**), способный накапливаться в липидных каплях и перспективный для визуализации липофагии в живых клетках (Рис. 14). Липофагия – это процесс деградации липидных капель клеткой, опосредованный лизосомами, нарушение которого связывают с различными метаболическими заболеваниями (ожирение, сахарный диабет, жировой гепатоз), а также нейродегенеративными патологиями (спастический парализ, болезни Альцгеймера и Паркинсона). В ходе липофагии сначала образуются

аутофагосомы (окружённые двуслойной фосфолипидной мембраной), которые затем сливаются с лизосомой с формированием аутофаголизосом с повышенной кислотностью (pH 4–5), где и происходит переваривание содержимого. Дизайн красителя **BDP22**, представляющего собой гибридную структуру, объединяющую два разных флуорофора, позволил обеспечить стабильную красную флуоресценцию липидных капель, за которую отвечал pH-инертный фрагмент BODIPY, и разгорание зеленой флуоресценции при активации липофагии, благодаря pH-чувствительному фрагменту аминозамещенного флуоресцеина. Ключевая стадия синтеза красителя **BDP22** включала этерификацию кислоты BODIPY **50** спиртом на основе аминозамещенного флуоресцеина **51** (Рис. 14.I) Расчетное значение ClogP для красителя **BDP22** составило 8.26. Методом ко-локационного анализа с коммерческим маркером липидных капель BODIPY 493/503 подтверждена селективная локализация флуорофора **BDP22** в липидных каплях клеток HeLa (Рис. 14.II).

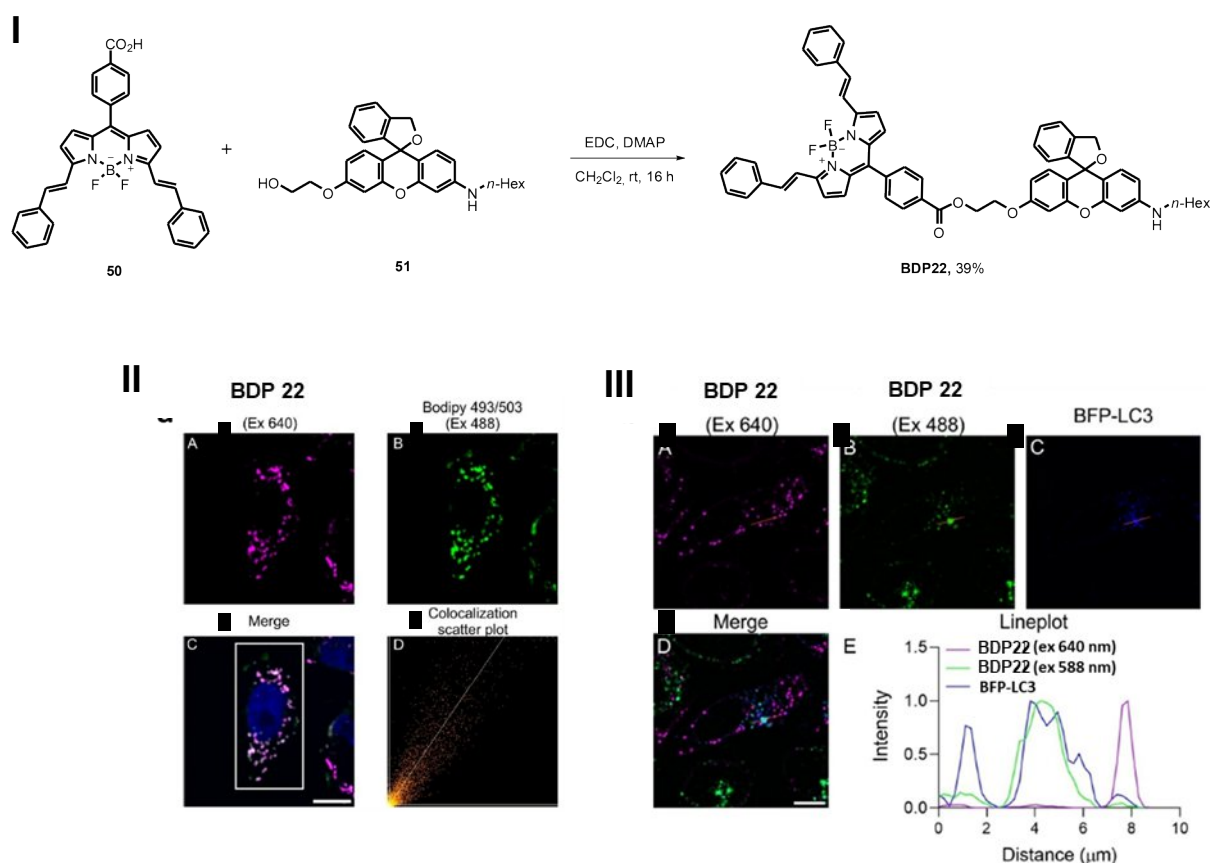


Рисунок 14. (I) Схема синтеза красителя **BDP22**. (II) Конфокальные микрофотографии клеток HeLa. Окрашивание с помощью **BDP22**. Окрашивание с помощью BODIPY 493/503. Наложение изображений. Точечная диаграмма колокализации, выбранной области. (III) Конфокальные микрофотографии клеток HeLa. Окрашивание с помощью **BDP22** при разных $\lambda(\text{ex})$ (488/640). Визуализация клеток HeLa, экспрессирующих флуоресцентный белок BFP-LC3, который локализуется в аутофагосомах. Линейный график интенсивности разных каналов эмиссии на выбранной линии, проведенной на конфокальных изображениях. Изображение заимствовано из: Engelhardt P.M. и соавт., 2024 [57]

Авторы отмечают отсутствие перекрытия темно-красной флуоресценции с зеленым сигналом красителя (Рис. 14.III), что связано с гашением красной флуоресценции фрагмента

BODIPY за счет агрегации аутофагосом в кислой водной среде. С использованием клеток HeLa, экспрессирующих ген флуоресцентного белка BFP-LC3, локализирующегося в аутофагосомах, показана колокализация зеленой (**BDP22**) и синей (BFP-LC3) флуоресценции (Рис. 14.III). Возможность применения соединения **BDP22** для количественного определения липофагии продемонстрирована с использованием метода проточной цитометрии.

Принципы разработки флуоресцентных зондов для эндоплазматического ретикулума (ЭР) кардинально отличаются от подходов для липидных капель, поскольку сама природа этой органеллы иная. В отличие от липидных капель, представляющих собой гидрофобное липидное ядро, окруженное внешним фосфолипидным монослоем и функциональными белками, ЭР является протяженной сетью мембран [58]. В связи с чем, усилия большинства исследователей направлены на разработку флуоресцентных белков, способных накапливаться в просвете или встраиваться в мембрану ЭР [59]. Визуализация ЭР с помощью малых молекул затруднена и, как вариант, может основываться на статистическом накоплении красителя в ЭР относительно остальных клеточных компонент, благодаря локально высокой концентрации в ЭР реакционноспособных аминокислотных остатков (например, см. красители Live ER Tracker dyes).

Несмотря на это, в группе Choi с соавт. [60] были получены флуоресцентные красители **BDP23a,b**, перспективные для одновременного окрашивания липидных капель и ЭР (Рис. 15). Соединения **BDP23a,b** были синтезированы с использованием классического подхода к сборке каркаса BODIPY (Схема 1) с использованием функционализированных альдегидов **52** и **53** (Рис. 15.I). Соединения **BDP23a,b** одновременно окрашивали липидные капли и эндоплазматический ретикулум (ЭР), что было подтверждено в экспериментах ко-локализации с коммерческими маркерами Lipi-Blue (липидные капли) и ER-Tracker-Red (ЭР) (Рис. 15.II). Авторами высказано предположение о том, что одновременное окрашивание липидных капель и ЭР красителями **BDP23a,b** во многом реализуется за счет оптимально подобранных гидрофобно-гидрофильных балансов. Расчетные значения липофильности **BDP23a,b**, полученные с использованием пакета программ ChemDraw v22.2.0 CambridgeSoft, составили 5.414 и 4.432 (ClogP), соответственно.

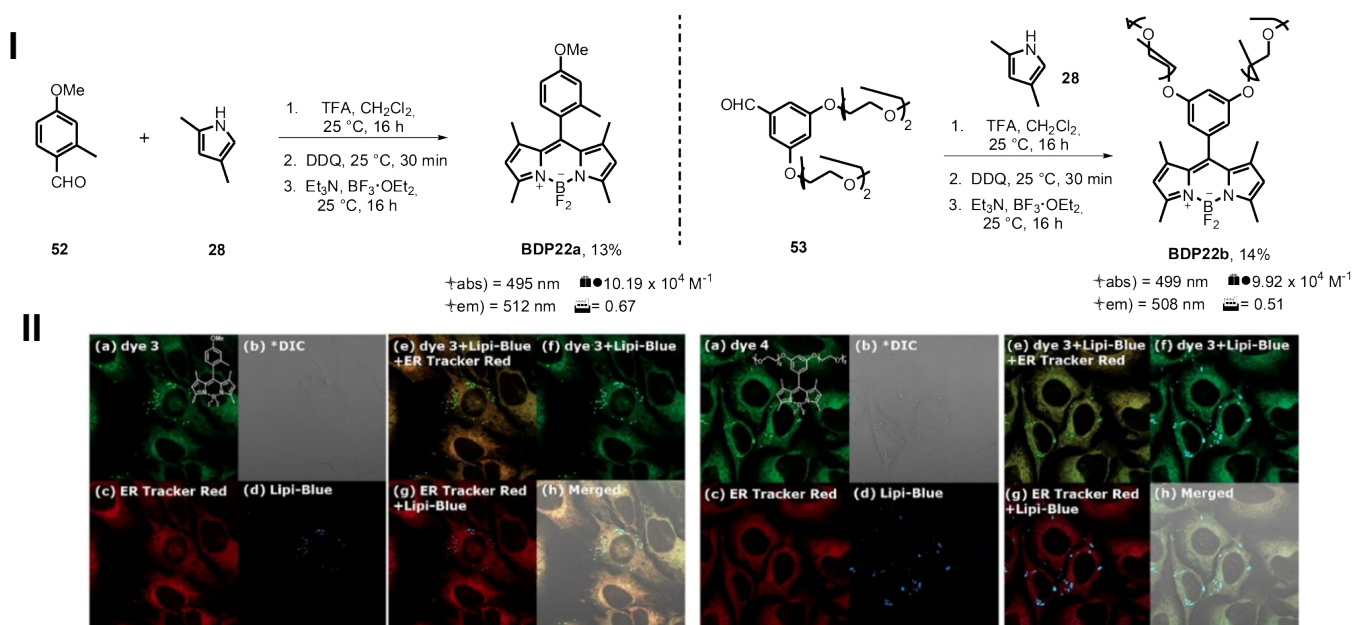


Рисунок 15. (I) Схема синтеза флуоресцентных красителей **BDP23a** и **BDP23b**. Изображения клеток HeLa, полученные методом соокрашивания, демонстрируют накопление красителя **BDP23a,b** в липидных каплях (LD) и эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Клетки HeLa визуализированы с помощью: красителей **BDP23a,b** (a); дифференциально-интерференционного контраста (b); ER-Tracker-Red (c); Lipi-Blue (d); красителей **BDP23a,b** и ER-Tracker-Red и Lipi-Blue (e); красителей **BDP23a,b** и Lipi-Blue (f); ER-Tracker-Red совместно с Lipi-Blue (g); совмещённого изображения (h). Изображение заимствовано из: Choi P. J. и соавт., 2024 [60]

Еще один краситель – бис-борфторидный комплекс **BDP24** (в литературном источнике **NbB**), способный окрашивать одновременно липидные капли и ЭР был описан в работе Chauhan с соавт. [61] (Рис. 16). Краситель **BDP24** был разработан как фотосенсибилизатор для фотодинамической терапии рака поджелудочной железы. Синтез соединения **BDP24** на последней стадии включал обработку основания Шиффа генерируемого *in situ* из амина BODIPY **56** и 3-гидрокси-2-нафталдегида (**57**) эфиром трёхфтористого бора (Рис. 16.I). Авторы полагают, что нафталиновый фрагмент в структуре **BDP24** обеспечивает накопление красителя в ЭР и способствует агрегации молекул красителя в липидных каплях. Методом ко-локализационного анализа с коммерческими маркерами на клетках аденокарциномы поджелудочной железы MIA-PaCa-2 подтверждена специфичность красителя **BDP24** к эндоплазматическому ретикулуму (коэффициент корреляции Пирсона 0.73 с ER-Tracker-Red) и липидным каплям при отсутствии перекрестного накопления в митохондриях и лизосомах (Рис. 16.II). Визуализация с красителем **BDP24** возможна в двухканальном режиме (зеленый канал – ER и липидные капли, красный – только липидные капли). При изучении кинетики процесса окрашивания агрегация **BDP24** в липидных каплях отмечена через 22.5 мин после начала эксперимента. Кроме того, авторы наблюдали эффективное одновременное фотодинамическое воздействие на ЭР и LD в клетках рака поджелудочной железы, инкубированных с **BDP24**.

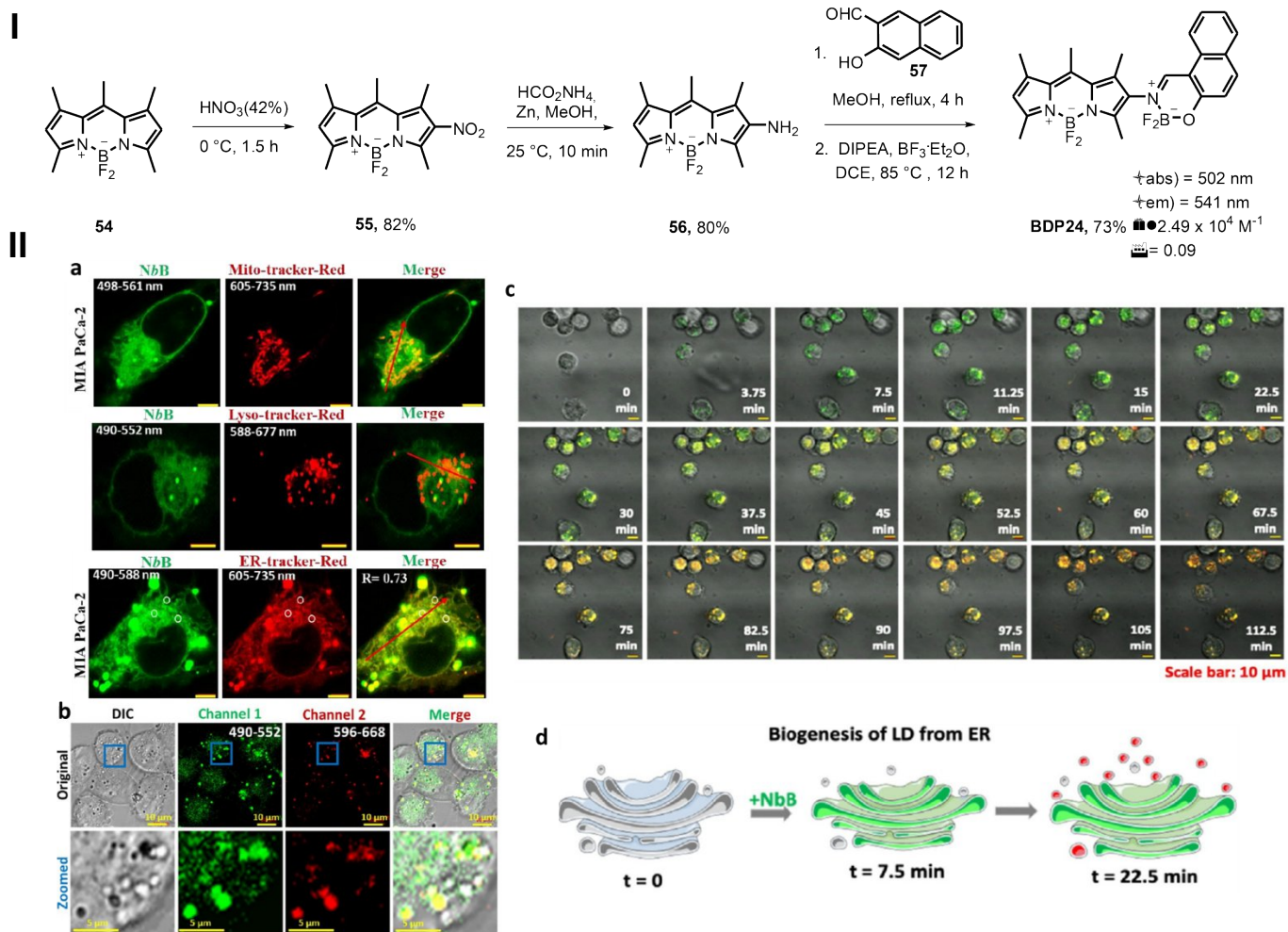


Рисунок 16. (I) Схема синтеза флуоресцентного красителя **BDP24**. (II) (а) Микрофотографии (30 мин. после инкубации) совместной локализации **BDP24** с Mito-Tracker-Red, Lyso-Tracker-Red и ER-Tracker-Red в клетках MIA PaCa-2. (б) Микрофотографии клеток MIA PaCa-2, инкубированных **BDP24**. Светополюсное изображение клеток. Визуализация ЭР и LD (зеленый канал). Визуализация липидных капель (красный канал). Наложение трех изображений. (с, d) Микрофотографии и схематичное изображение кинетики окрашивания органелл ЭР и LD в клетках MIA PaCa-2. Изображения заимствованы из Chauhan, N. и соавт., 2024 [61]

II.1.4. Эндоцитозные везикулы

Эндоцитозные везикулы — это мембранные цитоплазматические структуры, формирующиеся в процессе инвагинации плазматической мембраны. Они функционируют как ключевые транспортные единицы, обеспечивающие интернализацию внеклеточных макромолекул, рецепторов и патогенов [62]. Их флуоресцентная визуализация с использованием специфических маркеров позволяет отслеживать мембранный трафик и созревание эндосом [63]. Большинство современных зондов для визуализации эндоцитозных везикул используют два ключевых принципа: рецептор-опосредованный таргетинг и pH-зависимую активацию флуоресценции. Селективность может достигаться за счет конъюгации флуорофоров с лигандами рецепторов эндоцитоза (трансферрин, холестерол, липопротеины). Такие конъюгаты избирательно поглощаются клетками и направляются в целевые везикулы (например, см.

Transferrin-Alexa Fluor) [64, 65]. В то же время, поскольку в процессе созревания эндоцитозных везикул их pH снижается от 6.0–6.5 (ранние эндосомы) до 4.5–5.0 (лизосомы), pH-чувствительные флуоресцентные маркеры позволяют отслеживать в реальном времени динамику эндоцитоза [66, 67].

В недавней работе, Kirkilessi с соавт. [68] обнаружили, что относительно простое производное ряда BODIPY **BDP25** (в литературном источнике **TC498**) способно накапливаться в эндоцитозных везикулах (Рис. 17). Краситель **BDP25** был получен последовательным формилированием 1,3,5,7-тетраметил-8-фенил BODIPY **31**, иминированием в окислительных условиях 2-аминотиофенолом образовавшегося альдегида **58**, йодированием бензотиазольного производного **59** и кросс-сочетанием по Сузуки с бороновой кислотой **61** йодида **60** (Рис. 17.I).

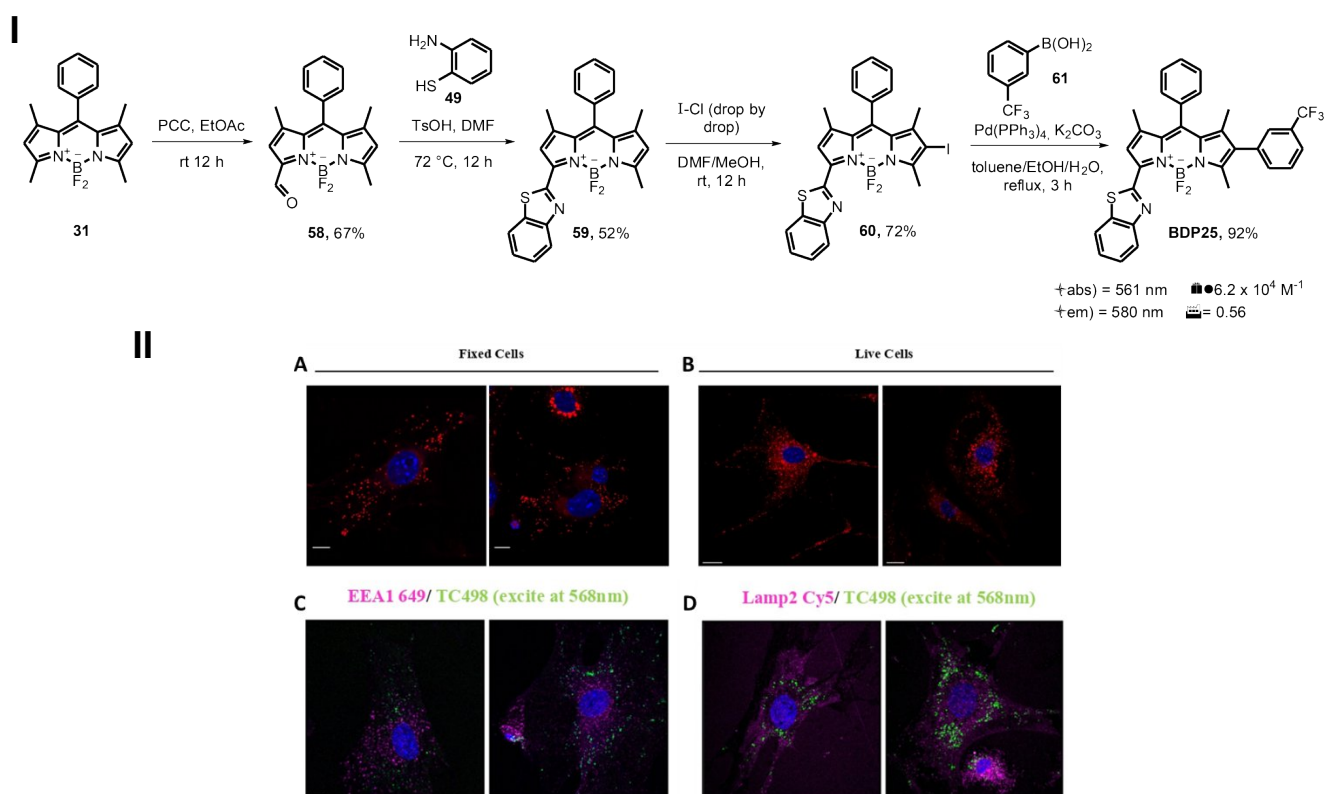


Рисунок 17. (I) Схема синтеза красителя **BDP25**. (II) Конфокальные микрофотографии клеток NIH3T3, являющиеся фибробластами мышей. Окрашивание красителями **BDP25** и DAPI зафиксированных (A) и живых клеток (B). Окрашивание клеток NIH3T3 с помощью **BDP25** и коммерческих маркеров для окрашивания эндоцитозных везикул EEA1 (C) и Lamp2 (D). Краситель DAPI (синий) использовался для визуализации клеточных ядер. Изображение заимствовано из Kirkilessi O. и соавт., 2023 [68].

Методом конфокальной микроскопии сравнением с коммерческими маркерами ранних эндосом (EEA1) и лизосом (Lamp2) продемонстрирована селективная локализация **BDP25** в эндоцитозных везикулах фибробластов NIH3T3. Соединение **BDP25** было фотостабильно и не демонстрировало значимой токсичности, даже при 24-часовом инкубировании, что делает его перспективным для длительного трекинга эндоцитарного трафика.

II.1.5. Аппарат Гольджи

Аппарат Гольджи — ключевая органелла эукариотических клеток, отвечающая за посттрансляционную модификацию, сортировку и транспорт белков. Его флуоресцентная визуализация позволяет изучать организацию цистернальных отделов, динамику мембранного трафика, процессы гликозилирования, а также нарушения функций при нейродегенеративных и онкологических заболеваниях [67]. Большинство зондов для мечения аппарата Гольджи представляют собой липофильные молекулы, способные к метаболическому захвату или специфическому связыванию с мембранными компонентами [69]. Принцип их накопления основан на биохимических особенностях органеллы: градиенте pH (от ~6.7 в цис-Гольджи до ~6.3 в транс-Гольджи) и активности ферментов (например, церамид-трансфераз). Одним из важных параметров требующим контроля в контексте биологических исследований является уровень вязкости. Повышение вязкости в аппарате Гольджи может вызывать нарушение фолдинга белков, их агрегацию и дисфункцию органеллы, что ассоциировано с развитием онкологических патологий [70].

В недавней работе Wang с соавт. [71] предложен новый флуоресцентный маркер **BDP26** (в литературном источнике **GOL-V**) перспективный для измерения уровня вязкости в аппарате Гольджи (Рис. 18). Краситель **BDP26** был синтезирован реакцией Сузуки бром-замещенного BODIPY **62** с бороновой кислотой **63** (Рис. 18.I). Несмотря на то, что бензолсульфамидные препараты не описаны в литературе как селективно-накапливающиеся в аппарат Гольджи, авторы полагают, что именно бензсульфамидный фрагмент, способствует накоплению красителя **BDP26** в нем. Соединение **BDP26** обладает высокой чувствительностью к колебаниям вязкости, основанной на управлении TICT-механизмом (twisted intramolecular charge transfer — процесса переноса заряда с искажением) тушения флуоресценции. Интенсивность флуоресценции **BDP26** увеличивается в 114 раз при повышении вязкости с 2.63×10^3 до 937.28×10^3 Па с. На клетках HeLa методом ко-локализационного анализа с коммерческим маркером аппарата Гольджи (GTR) была показана высокая селективность флуоресцентного зонда **BDP26** к данной органелле (коэффициент корреляции Пирсона 0.93). Низкие значения коэффициентов корреляции (0.33–0.44) с маркерами других органелл (лизосом, митохондрий и эндоплазматического ретикулума) подтвердили отсутствие существенного перекрестного окрашивания с другими внутриклеточными органеллами.

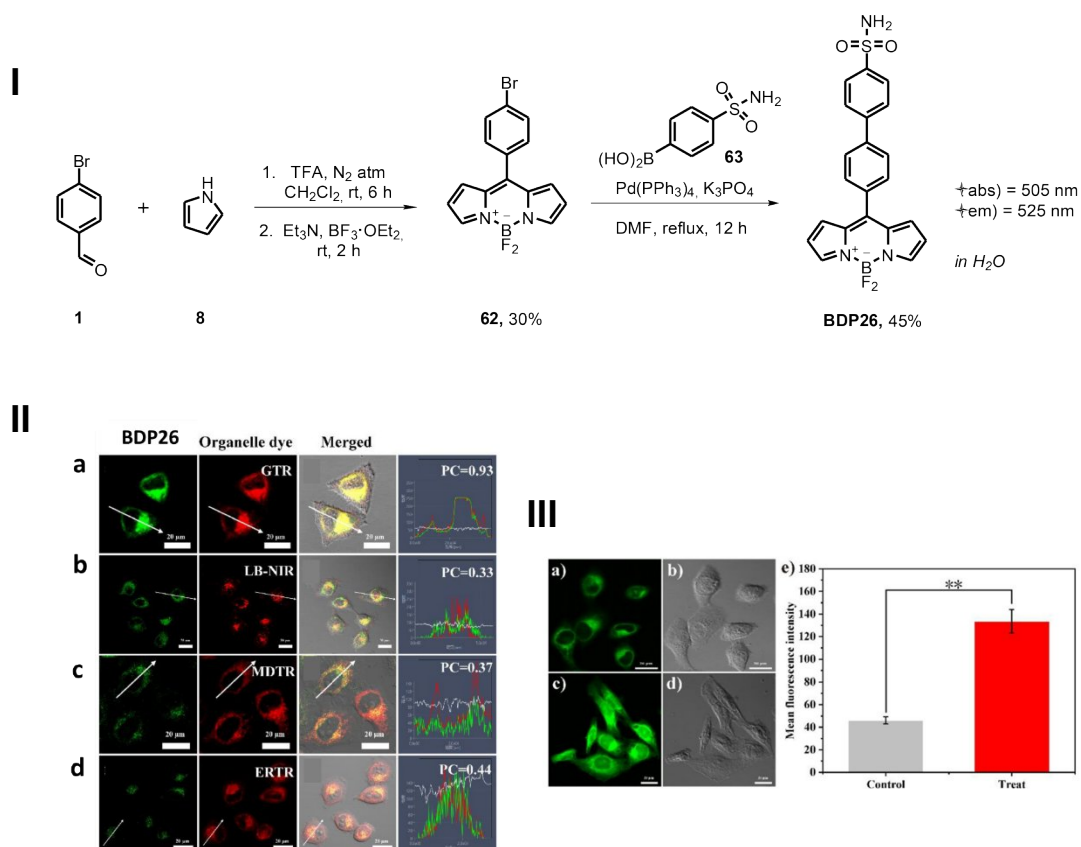


Рисунок 18. (I) Схема синтеза красителя **BDP26**. (II) Конфокальные микрофотографии клеток HeLa, инкубированные с **BDP26** и коммерческими маркерами в отношении различных органелл (Аппарат Гольджи, лизосомы, митохондрии, эндоплазматический ретикул). (II) Микрофотографии клеток HeLa, инкубированные с **BDP26**, в отсутствие и присутствии монензина, повышающего вязкость клетки. Гистограмма, соответствующая интенсивности эмиссии в клетках с различной вязкостью. Изображение заимствовано из: Wang X. и соавт., 2024 [71].

II.2. Белки

Ключевыми характеристиками флуоресцентных маркеров для визуализации внутриклеточных белков являются высокое сродство и специфичность к целевой мишени. Основная сложность в разработке таких маркеров часто связана с необходимостью сохранения нативной конформации и биологической активности целевого белка после связывания с красителем. Оптимизация оптических свойств подобных красителей направлена на достижение высокой яркости, фотостабильности, биодоступности, низкой токсичности, а также на работу в диапазоне длин волн возбуждения и испускания, попадающем в биологически прозрачное оптическое окно. Далее будут рассмотрены примеры успешного рационального дизайна флуоресцентных маркеров для визуализации белков, опубликованные за последние несколько лет.

II.2.1. Эстрогеновые рецепторы α

Эстрогеновый рецептор типа альфа (ЭР α) представляет собой ядерный рецептор и фактор транскрипции, который активируется женскими половыми гормонами (эстрогенами) и регулирует экспрессию генов, контролирующих пролиферацию, дифференцировку и выживание клеток. Флуоресцентная визуализация ЭР актуальна для исследования пространственно-временной динамики его локализации и активации в живых клетках в реальном времени. Этот подход в перспективе позволит визуализировать взаимодействия рецептора с лигандом, корегуляторными белками и ДНК, что критически важно для понимания механизмов гормональной сигнализации.

В недавней работе Rejzina с соавт. [72] был предложен новый флуоресцентный маркер для ЭР α **BDP27**, разработанный по принципу объединения эндогенного лиганда ЭР α – эстрадиола, с флуорофором BODIPY через этиленгликолевый линкер (Рис. 19). Краситель **BDP27** представляет интерес для визуализации ЭР α в линии гормонозависимых клеток рака молочной железы MCF7. Ключевой стадией синтеза **BDP27** стала реакция конденсации фенол-BODIPY **69** с бром-производным **66**, полученным алкилированием эстрадиола (**64**) (Рис. 19.I). Методом иммуноблоттинга было показано, что краситель **BDP27** проявляет высокую эстрогенную активность в клетках MCF7, вызывая экспрессию прогестероновых (PR α/β) и снижая уровень экспрессии ER α (Рис. 19.V). В клетках SKBR-3 с высокой экспрессией ЭР α соединение **BDP27** демонстрировало агонистическую активность; в диапазоне концентраций от 80 до 400 нМ его эффективность была сопоставима с эффективностью природного агониста ЭР α 17 β -эстрадиола (E2). Молекулярный докинг выявил сходное расположение фрагмента эстрана **BDP27** с эстрадиолом в сайте связывания ER α (Рис. 19.IV). Краситель **BDP27** демонстрировал цитозольную локализацию в клетках MCF7 и не накапливался в ядре, что было подтверждено

низким уровнем колокализации с DAPI ($16.88 \pm 2.13\%$). Сравнение с красителем Alexa Fluor 594, нацеленным на ER α , выявило колокализацию флуоресценции (Рис. 19. III), равную 83.23 ± 2.80 (коэффициент корреляции Пирсона = 0.664 ± 0.049).

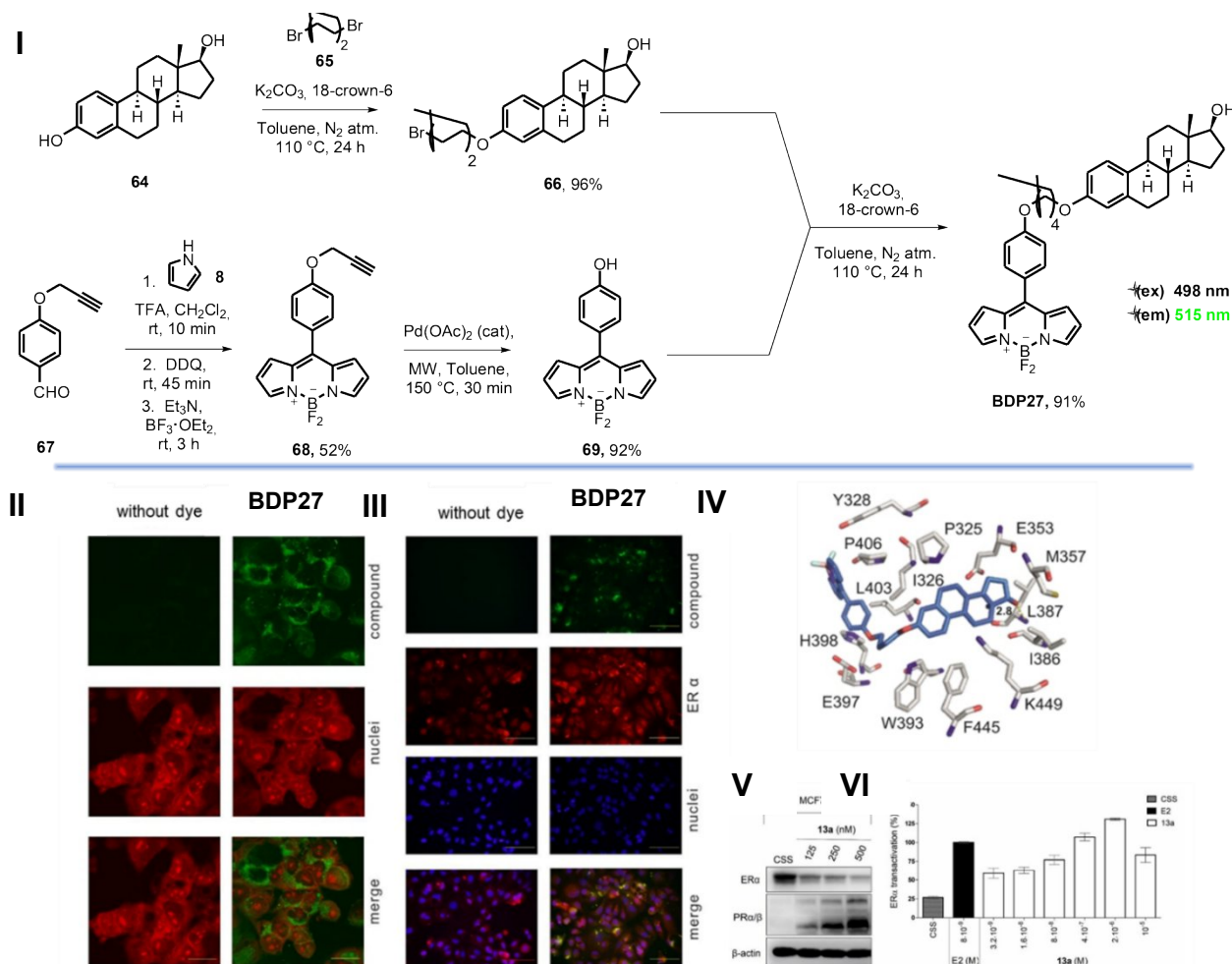


Рисунок 19. (I) Схема синтеза BODIPY **BDP27**, активного к эстрогеновым рецепторам α . (II) Конфокальные флуоресцентные микрофотографии линии клеток MCF7 без красителя и клеток MCF7 инкубированных 10 мкМ BODIPY **BDP27**. Визуализация ядер йодидом пропидия (nuclei). Наложение двух изображений клеток MCF7 (merge). (III) Флуоресцентные микрофотографии клеток MCF7, с добавлением 10 мкМ BODIPY **BDP27**. Клетки, обработанные флуоресцентным красителем Alexa Fluor 594, нацеленным на рецепторы эстрогена α . Ядра, окрашенные красителем DAPI (nuclei). Наложение трех изображений (merge). Разрешение изображений в 100 мкм. (IV) Молекулярный докинг BODIPY **BDP27** с альтернативным сайтом связывания эстрагенового рецептора α . (V) Иммуноблоттинг эстрагеновых и прогестероновых рецепторов в клетках MCF7. (VI) Иммуноблоттинг эстрагеновых рецепторов в клетках SKBR-3 соединением BODIPY **BDP27** и эстрадиолом. Изображение заимствовано из: Peřina M. и соавт., 2024 [72].

II.2.2. Белки HER2

Рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2) представляет собой трансмембранный тирозинкиназный рецептор, который активируется при связывании лигандов семейства EGFR и запускает внутриклеточные сигнальные пути, регулирующие пролиферацию, выживание и миграцию клеток. Визуализация HER2 с помощью

флуоресцентных зондов позволяет в реальном времени отслеживать его экспрессию, кластеризацию и интернализацию на поверхности живых клеток. Этот метод открывает возможности для изучения динамики гомо- и гетеродимеризации рецептора, а также оценки эффективности таргетной-терапии моноклональными антителами.

Недавно в работе Мао с соавт. [73] в качестве новых флуоресцентных маркеров для HER2 были предложены производные BODIPY **BDP28a-c** (Рис.20). Используя синтетическую стратегию на схеме 2, несимметрично замещенный каркас BODIPY формировали из двух пирролов **70** и **71**. Многостадийный синтез **BDP28a-c** включал амидирование **74** и конденсацию Кневенагеля альдегидов с BODIPY **76** (Рис.20.I). С использованием методики TSA (Tyramide Signal Amplification) для красителей **BDP28a-c** была продемонстрирована специфическая поверхностная локализация на клетках SKBR3, характеризующихся гиперэкспрессией HER2 (Рис.20.II).

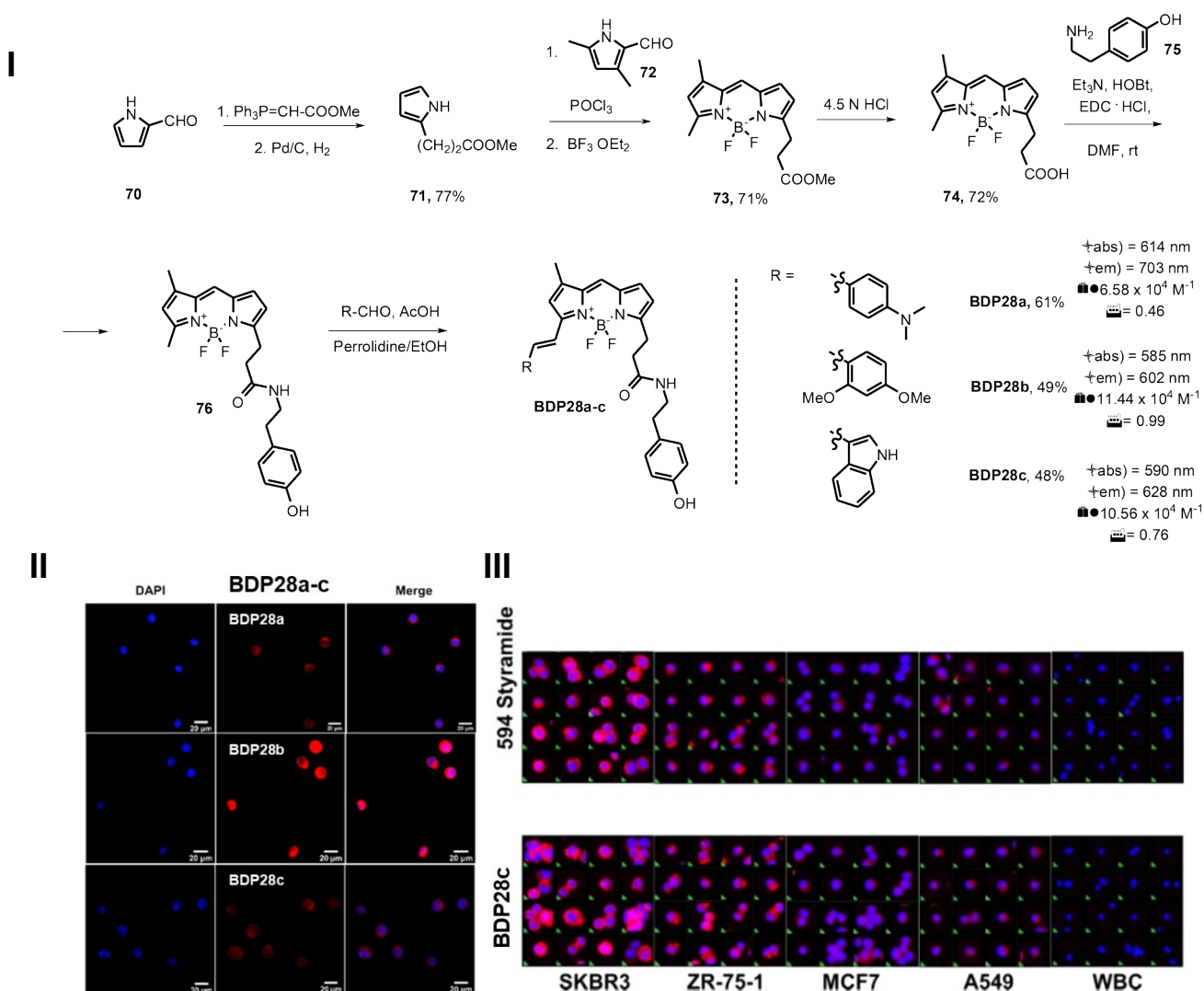


Рисунок 20. (I) Схема синтеза тиамидов производных красителей **BDP28a-c**. (II) Конфокальные микрофотографии клеток SKBR3, инкубированных красителями DAPI (окрашивание нуклеотидов) и красителями **BDP28a-c**. (III) Микрофотографии клеток с различной экспрессией HER2, обработанные **BDP28b** и коммерческим красителем 594 styramide. Изображение заимствовано из: Мао W.-J. и соавт., 2025 [73].

Краситель **BDP28b**, обладавший лучшими фотофизическими характеристиками (pH- и фото-стабильностью, значением квантового выхода флуоресценции) в серии, показал сопоставимую с коммерческим аналогом (594 styramide) эффективность мечения в HER2-позитивных клеточных линиях (SKBR3, ZR-75-1) (Рис.20.III).

II.2.3. Рецепторы GPR54

Рецептор, связанный с G-белком, GPR54 (KISS1R) представляет собой трансмембранный рецептор, сопряженный с G-белком, который активируется при связывании нейропептидов киспептина и запускает внутриклеточные сигнальные пути, регулирующие секрецию гонадотропин-рилизинг гормона и функцию репродуктивной системы. Флуоресцентная визуализация GPR54 перспективна для мониторинга его экспрессии, интернализации и пространственного распределения на поверхности нейронов и клеток гонад в режиме реального времени. Этот метод открывает возможности для изучения динамики лиганд-зависимой активации рецептора, а также для исследования нарушений его функций при эндокринных патологиях.

Mendive-Tapia с соавт.[74] разработали флуоресцентную метку **BDP29** для визуализации рецепторов GPR54 эффективную в клетках человека (HEK293) и в островках поджелудочной железы мышей (Рис. 21). Краситель **BDP29** является конъюгатом природного лиганда рецептора GPR54 - киспептина (KP-10), и пептидного остатка на основе кислотоустойчивой аминокислоты Trp-BODIPY с флуорофором BODIPY. Соединение **BDP29** было получено с использованием твердофазного пептидного синтеза (Рис. 21.I). При инкубировании трансфицированных человеческих клеток (HEK293), экспрессирующих белок HA-GPR54, с пептидом **BDP29** выявлена его агонистическая активность ($EC_{50} = 0.22 \text{ нМ}$), сопоставимая с активностью немеченого пептида KP-10. Конфокальная микроскопия показала, что пептид **BDP29** колокализуется с AF647-anti-HA на мембране HEK293 клеток, экспрессирующих GPR54 (Рис. 21.II). Селективность пептида **BDP29** к рецепторам GPR54 была подтверждена контрольным экспериментом на клетках HEK293, которые не экспрессировали белок HA-GPR54 (Рис. 21.IIb). Было показано, что пептид **BDP29** является антагонистом GPR54 и способствует интернализации рецептора. Сравнение с коммерчески доступным флуоресцентным маркером LUXendin645, нацеленным на рецепторы глюкагоноподобного пептида (GLP1R) на поверхности β -клеток, показало, что пептид **BDP29** преимущественно связывается с β -клетками (Рис. 21.III).

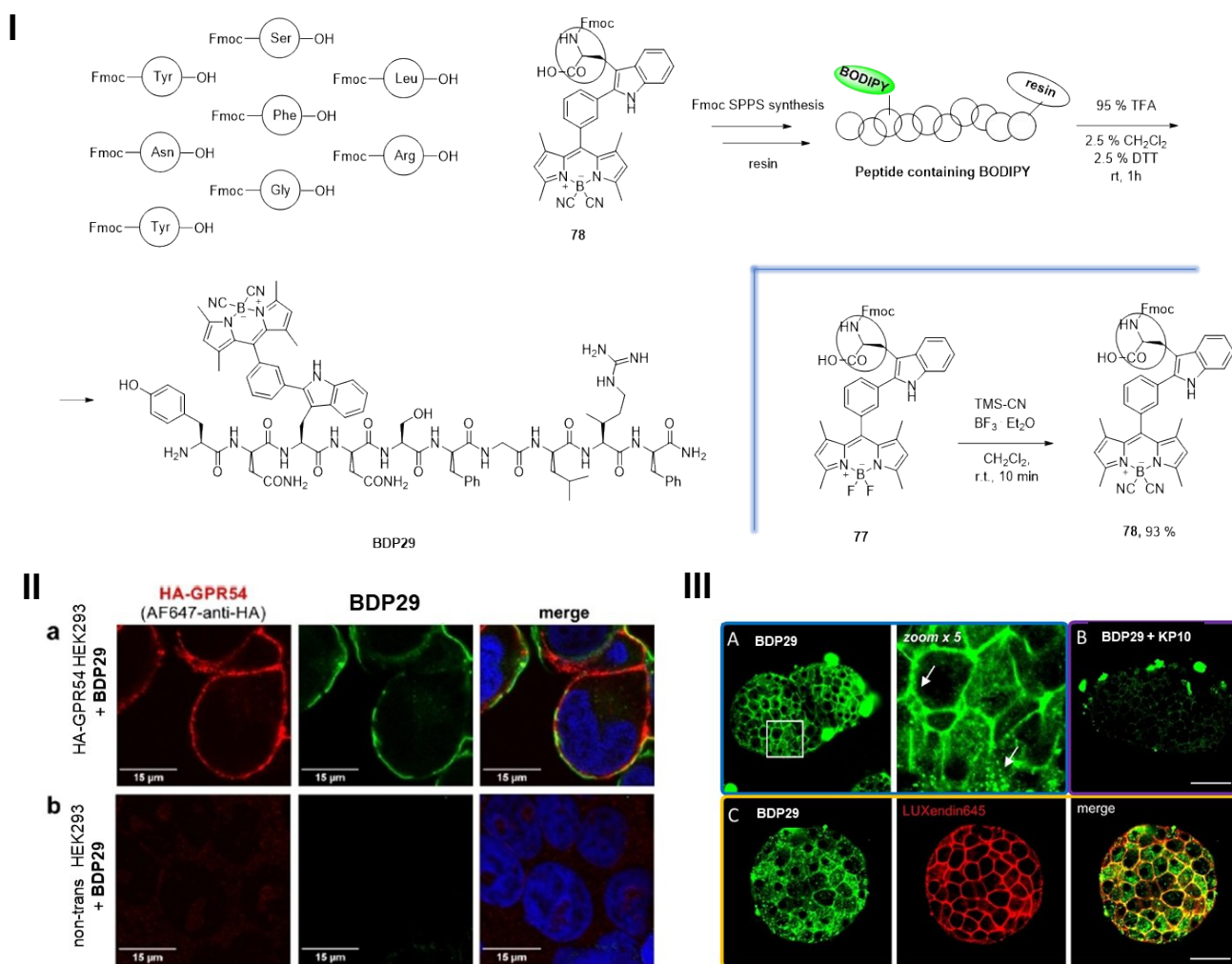


Рисунок 21. (I) Схема Fmoc твердофазного пептидного синтеза (ТФПС) соединения **BDP29**, меченного красителем BODIPY. Схема синтеза цианопроизводного BODIPY. (II) Конфокальная микроскопия. Окрашивание клеток HEK293, экспрессирующих белок HA-GPR54 (a) и не экспрессирующих (b). Визуализация рецептора меченным антителом AF647-anti-HA (левый столбец). Визуализация рецептора флуоресцентным пептидом **BDP29** (10 мкМ; средний столбец). Наложение изображений инкубированных красителями клеток HEK293 (правый столбец; ядра подкрашены красителем DAPI (синий цвет)). (III) Микрофотографии конфокальной микроскопии живых островков Лангерганса после инкубации с пептидом **BDP29** (10 мкМ; (A)); после последовательной инкубацией немеченым пептидом KP-10 (50 мкМ) и меченым пептидом **BDP29** (10 мкМ; (B)). Белые стрелки указывают на внешне- и внутриклеточное окрашивание. Микрофотографии живых островков. Фотографии Островков Лангерганса спустя 1 час окрашивания пептидом **BDP29** (10 мкМ) и LUXendin645 (100 нМ) а также интерференция этих изображений. Изображение заимствовано из: Mendive-Tapia L. и соавт., 2023 [74].

II.2.4. Белки SOD1(V31A)-Halo

Медно-цинковая супероксиддисмутаза1 (SOD1) представляет собой ключевой антиоксидантный фермент, катализирующий дисмутацию супероксидных радикалов в кислород и пероксид водорода [75]. Мутация V31A в белке SOD1 связана с развитием бокового амиотрофического склероза (БАС). Флуоресцентная визуализация меченой HaloTag версии мутантного белка SOD1(V31A) позволяет в режиме реального времени отслеживать его внутриклеточную локализацию, кинетику агрегации и процессы мисскладирования [76]. Этот подход открывает новые возможности для изучения механизмов нейродегенерации, скрининга

потенциальных терапевтических соединений, препятствующих образованию токсичных агрегатов, и исследования патогенеза БАС.

В недавней работе Shen и соавт. [77] описана новая AggTag-метка **BDP30**, которая позволяет обнаруживать агрегацию белков SOD1(V31A)-Halo в живых клетках (Рис. 22). В качестве откликов маркер **BDP30** использует off-on изменение интенсивности флуоресценции и увеличение времени жизни флуоресценции красителя. Краситель **BDP30** (в литературном источнике **P1**), содержащий хлоралкановый фрагмент, был получен реакцией амидирования BODIPY кислоты **80** аммонийной солью **81** (Рис. 22.I). В растворе конъюгат SOD1(V31A)-Halo-**BDP30** под воздействием повышенной температуры сворачивается с образованием агрегатов, что повышает интенсивность и время жизни флуоресценции фрагмента **BDP30** (Рис. 22.II). Авторами показано, что визуализация агрегатов в клетках, экспрессирующих белок SOD1(V31A)-Halo, возможна только в присутствии ингибитора MG132, который блокирует работу протеасом и приводит к накоплению белков (Рис. 22.IIIe). Окрашивание живых клеток красителем **BDP30** также было изучено методом FLM-спектроскопии. В клетках HEK293T, экспрессирующих Halo, краситель **BDP30** продемонстрировал низкую интенсивность флуоресценции и короткое время жизни (2.4 нс). Напротив, клетки, экспрессирующие белок Htt-Q110-Halo, имели среднее время жизни 3.4 нс (Рис. 22.IIf,h), тогда как для клеток, экспрессирующих SOD1(A4V)-Halo, время жизни флуоресценции красителя **BDP30** составило 2.5 нс и имело диффузный характер. Однако следует отметить, что после обработки ингибитором MG132, наблюдаются как диффузные с продолжительностью жизни 3.0 нс, так и точечные флуоресцентные сигналы (Рис. 22.IIg,i). Продолжительность жизни точечных сигналов составила 3.4-3.6 нс (широкое плечо на кривой на Рис. 22.IIi).

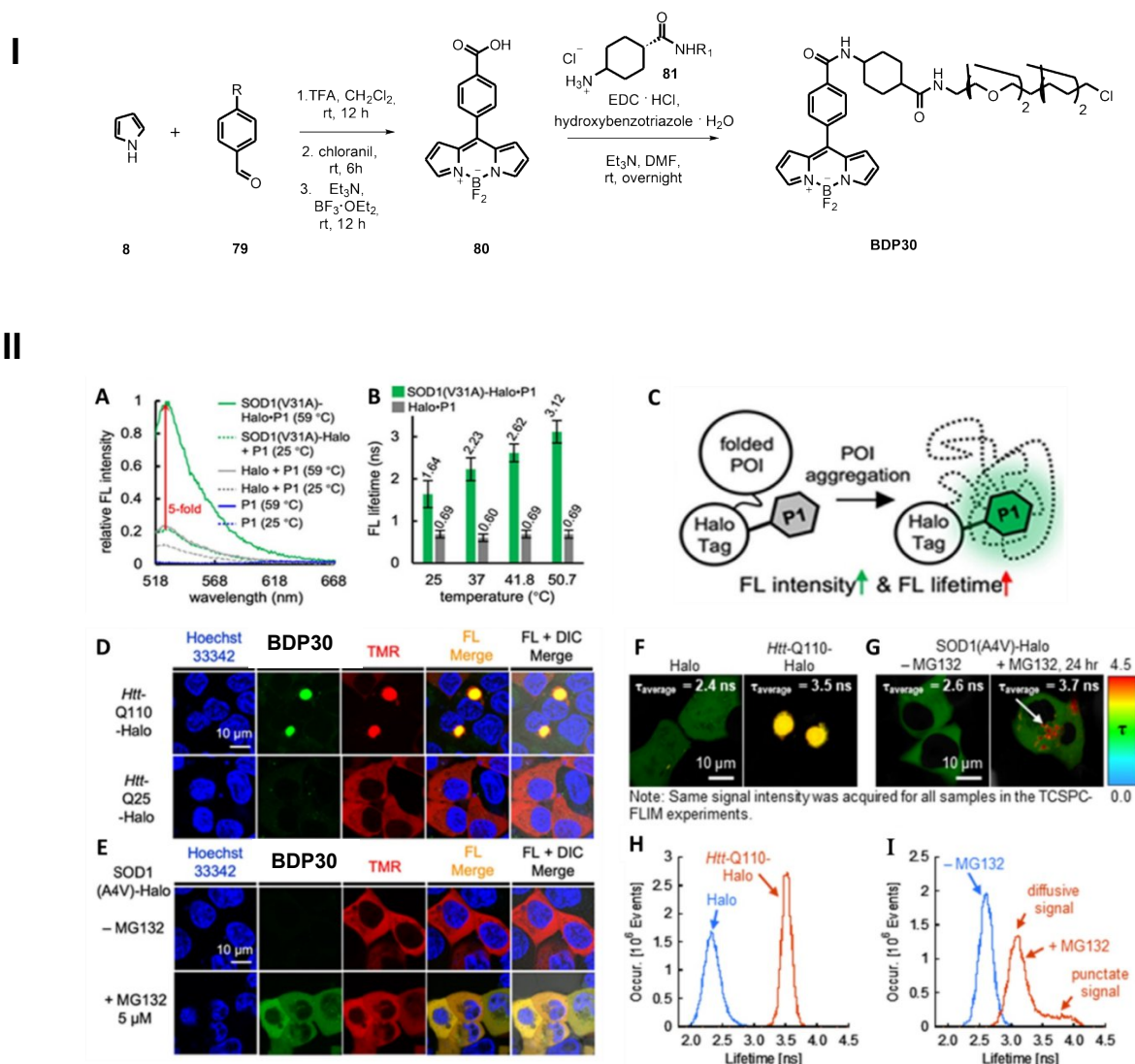


Рисунок 22. (I) Схема синтеза флуоресцентной метки **BDP30**. (II) (A) Профили флуоресценции метки **BDP30** (5 μM), а также метки **BDP30** (5 μM) в присутствии 42 μM SOD1(V31A)-Halo / Halo при 25 °C и 59 °C. (B) Время жизни флуоресценции метки **BDP30** в составе белкового конъюгата SOD1(V31A)-Halo-BDP30 при разных температурах (25; 37; 41.8; 50.7 °C). (C) Принцип работы флуоресцентной метки по методу AggTag. (D) Флуоресцентная конфокальная визуализация агрегированных белков в клетках HEK293T, экспрессирующих в одном случае белок Htt-Q110-Halo (1ая строка), в другом Htt-Q25-Halo (2ая строка). Визуализация красителем **BDP30**, визуализация красителем TMR и наложение этих изображений. (E) Конфокальные микрофотографии клеток HEK293T, экспрессирующих конъюгаты SOD1(A4V)-Halo, в отсутствие (1ая строка) и присутствии (2ая строка) ингибитора функции протеасом (MG132). Визуализация красителем **BDP30**, визуализация красителем TMR и наложение этих изображений. (F) FLIM фотографии клеток HEK293T, экспрессирующих HaloTag или Htt-Q110-Halo. (G) FLIM фотографии клеток HEK293T, экспрессирующих SOD1(A4V)-Halo, в отсутствие и в присутствии MG132. (H);(I) Гистограммы времени жизни диффузной и точечной флуоресценции для фотографий на рисунках 22.IIF и 22.IIG. Изображения заимствованы из Shen B. и соавт., 2023 [77].

II.2.5. Рецепторы ST2

Рецептор ST2 (IL1RL1) представляет собой трансмембранный рецептор из семейства интерлейкина-1, который существует в двух основных изоформах: мембранной (ST2L) и растворимой (sST2) [78]. ST2L является ключевым компонентом сигнального пути IL-33 и играет ключевую роль в активации иммунного ответа типа 2 [79]. Флуоресцентная визуализация рецептора ST2 позволяет в реальном времени исследовать его экспрессию на поверхности иммунных клеток, динамику связывания с лигандом IL-33 и последующую интернализацию. Этот метод открывает перспективы для детального изучения патогенеза аллергических заболеваний (таких как астма), фиброза сердца и аутоиммунных расстройств, а также для скрининга терапевтических агентов, модулирующих этот путь [80].

В работе Reese с соавт. [81] предложен флуоресцентный аналог интерлейкина-33 – **BDP31** (в литературном источнике **IL-33(6)**), перспективный для визуализации ST2 рецепторов. Соединение **BDP31** было получено путем медь-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения (CuAAC) между алкиновым производным флуорофора BODIPY **84** и азид-содержащим аналогом IL-33, в котором остаток тирозина в позиции 143 был заменен на азидофенилаланин (**IL-33 Y143AzidoPhe**) (Рис. 23.I).

Биологическую активность меченного белка **BDP31** изучали на клеточной линии HEK-blue, в которой связывание IL-33 с рецепторами ST2 активирует пути NF-κB и AP-1, приводя к секреции эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP). Активность **BDP31** оказалась сопоставима с активностью немодифицированного IL-33. Снижение сигнала в присутствии ингибиторов ST2-Fc (связывается с IL-33) и HpBARI (связывается с рецептором ST2) подтвердило специфичность взаимодействия между **BDP31** и ST2.

С помощью конфокальной микроскопии (с контрастированием ядер красителем DRAQ5) было показано, что инкубация клеток HEK-blue, экспрессирующих ST2, с флуоресцентным конъюгатом **BDP31** приводит к интернализации рецептора, опосредованной связыванием цитокина (Рис. 23.IIIa). Наблюдаемая зеленая флуоресценция **BDP31** исчезала после обработки ингибитором HpBARI и промывки (Рис. 23.IIIb), что подтверждает специфичность связывания метки. Кроме того, авторы успешно применили данный подход для визуализации рецепторов ST2 в культуре иммунных клеток человека HMC1.1 (Рис. 23.IIIc).

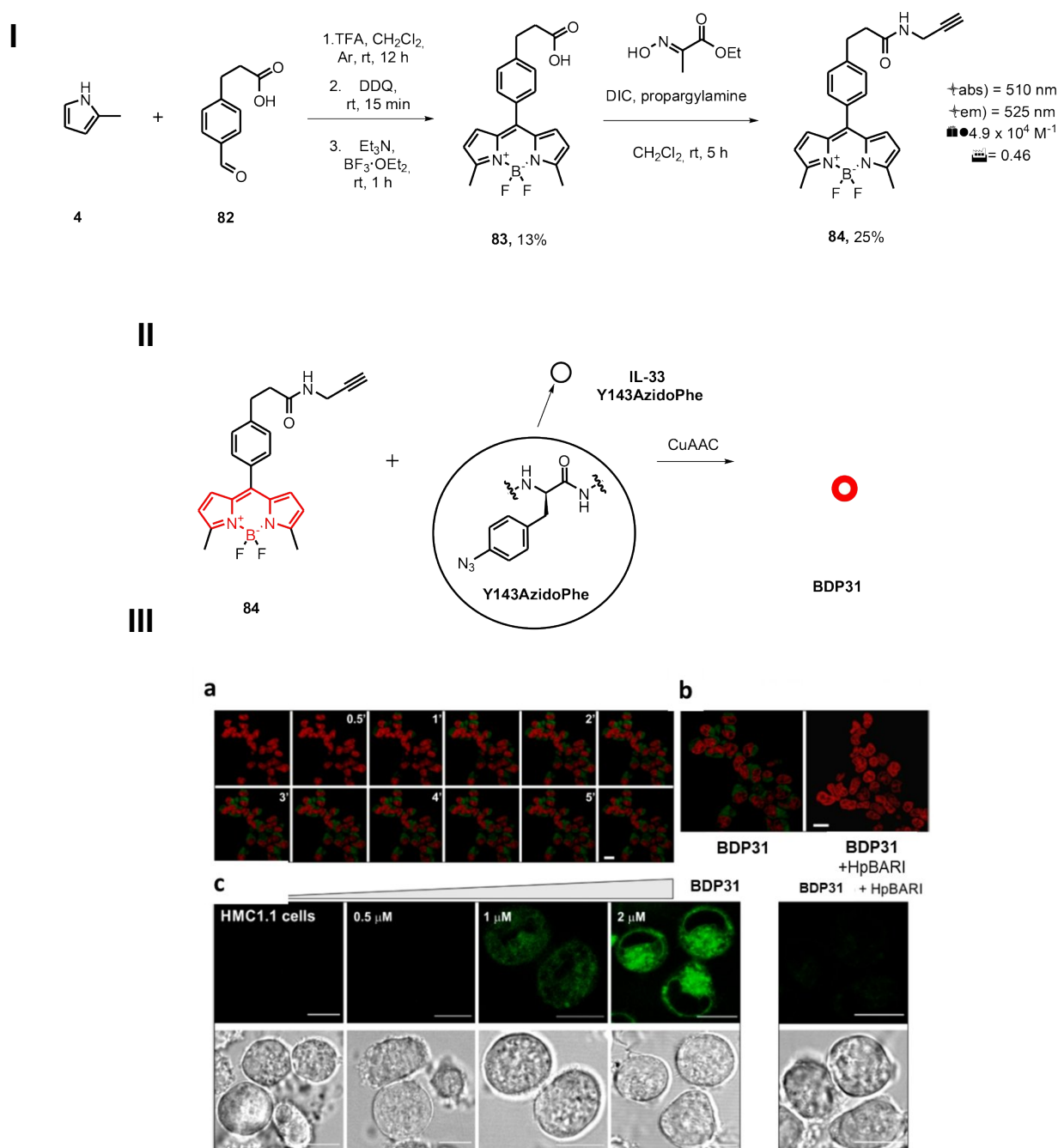


Рисунок 23. (I) Схема синтеза BODIPY **84**. (II) Схема CuAAC-синтеза флуоресцентного белка **IL-3(6)**. (III) (a) Конфокальные микрофотографии клеток HEK-blue, экспрессирующие ST2. Визуализация ST2-рецептора с **BDP31** (зелёный цвет), а также окрашивание клеточных ядер красителем DRAQ5 (красный цвет). (b) Микрофотографии инкубированных с **BDP31** (зелёный цвет), DRAQ5 (красный цвет) клеток HEK-blue в отсутствие/присутствии ингибитора HpBARI. (c) Окрашивание мастоцитов человека HMC1.1. Инкубация с растворами **BDP31** различной концентрации. Инкубация **BDP31** в присутствии ингибитора HpBARI. Изображения заимствованы из Reese A.E. и соавт., 2023 [81].

II.2.6. g4-ДНК

G-квадруплекс ДНК (g4-ДНК) представляет собой неканоническую вторичную структуру нуклеиновых кислот, образующуюся в богатых гуанином участках генома при участии катионов [82]. Эти структуры играют ключевую роль в регуляции транскрипции, репликации ДНК, теломерного гомеостаза и стабильности генома. Флуоресцентная визуализация g4-ДНК открывает возможности для изучения роли G4-ДНК в клеточном цикле и канцерогенезе, скрининга соединений, стабилизирующих или разрушающих g4, а также для разработки новых терапевтических стратегий, направленных против онкологических и нейродегенеративных заболеваний [83].

В недавней работе Liu с соавт. [84] был представлен новый флуоресцентный маркер **BDP32** (в литературном источнике **BODPA**) для селективного ратиометрического обнаружения G-квадруплексов ДНК (Рис. 24). Синтез соединения **BDP32** включал сборку каркаса BODIPY из альдегида **85** и 2,4-диметилпиррола **28** с получением соединения **86**, которое вводилось в нуклеофильное замещение с 2,2'-дипиколиламином **87**, что привело к получению целевой структуры (Рис. 24.I).

Соединение **BDP32**, несущее группу 2,2'-дипиколиламина для детектирования G4 ДНК, образует агрегаты со слабой флуоресценцией при 508 нм в водной среде, однако в присутствии G-квадруплекса промотора гена c-MYC (cMYC G4 ДНК) происходит дезагрегация по DIE-механизму (Disaggregation Induced Emission – Дезагрегационно-индуцированная эмиссия), приводящая к яркому сигналу при 518 нм.

С помощью комплекса методов, включающего конкурентные эксперименты, анализ с мутированными ДНК и построение кривой Джоба, авторы установили высокую аффинность и селективность **BDP32** к G4 ДНК. Молекулярный докинг показал, что связывание происходит посредством торцевого стэкинга и частичного взаимодействия в бороздке. Эффективность **BDP32** для флуоресцентной визуализации была подтверждена в экспериментах на клетках СТ26, где была продемонстрирована умеренная колокализация маркера с коммерческим красителем DAPI (Рис. 24.II). Коэффициент корреляции Пирсона составил 0.60. При этом распределение флуоресценции между цитоплазмой и ядром было равномерным, что может указывать на низкую ядерную проницаемость зонда либо на его высокую чувствительность к различиям в полярности микроокружения.

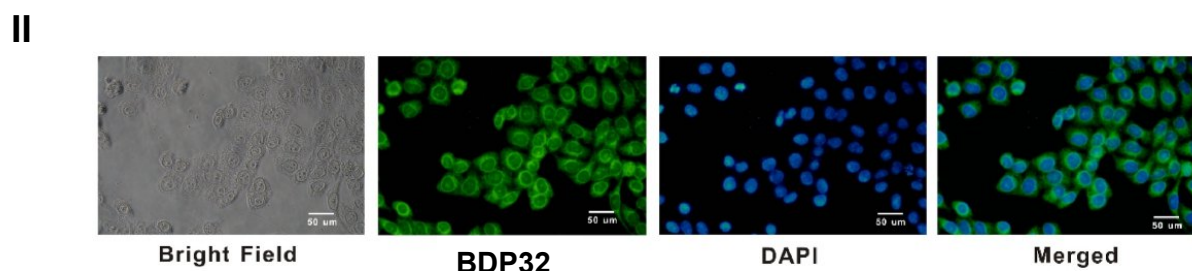
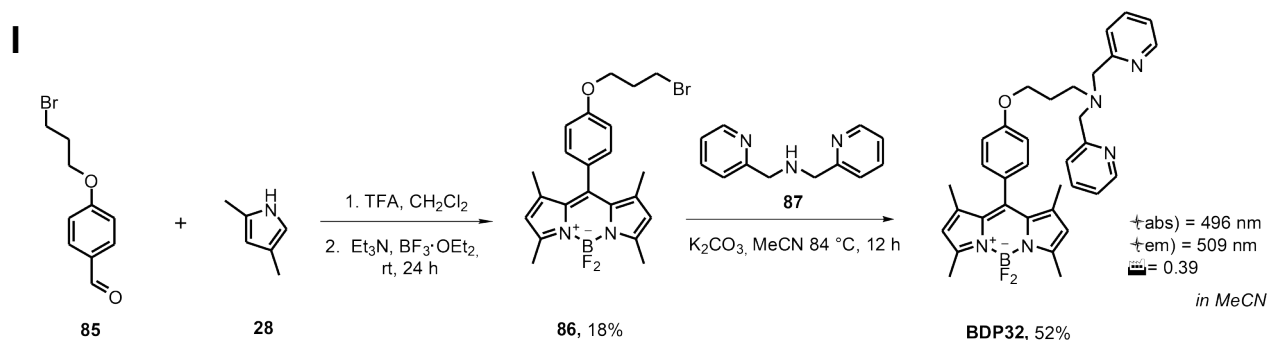


Рисунок 24. (I) Схема синтеза красителя **BDP32**. (II) Конфокальные микрофотографии клеток CT26, инкубированных **BDP32** и DAPI. Светопольное изображение. Визуализация нуклеотидов с помощью BDP32 и DAPI. Наложение двух изображений (коэффициент корреляции Пирсона 0.60). Изображение заимствовано из Liu G.-F. и соавт., 2024 [84].

II.2.7. Агрегаты бета-амилоидов

Бета-амилоид ($A\beta$) — это пептид, образующийся при протеолитическом расщеплении белка-предшественника амилоида (APP) и склонный к формированию нерастворимых токсичных агрегатов: олигомеров и фибрилл [85]. Накопление этих агрегатов в мозге является центральным патогенетическим звеном в развитии болезни Альцгеймера, приводя к нейродегенерации и нарушению синаптической передачи. Флуоресцентная визуализация бета-амилоидных агрегатов позволяет проводить высокочувствительное и специфичное мечение патологических скоплений в режиме реального времени [86].

В недавнем исследовании Ма с соавт. [87] сообщили о синтезе серии флуоресцентных маркеров на основе BODIPY, содержащих циклические амины в качестве молекулярных ротационных донорных фрагментов. Наиболее перспективным соединением серии оказался краситель **BDP33** (в литературном источнике **TPipBDP**) с пиперидиновым фрагментом, продемонстрировавший высокую эффективность для детекции β -амилоида ($A\beta$) — ключевого биомаркера болезни Альцгеймера.

Целевое соединение **BDP33** было синтезировано путем конденсации BODIPY **88** с соответствующим предшественником пиперидинового производного **89** (Рис. 25.I). Принцип работы зонда основан на подавлении внутримолекулярного вращения пиперидинового остатка

и уменьшении ICT (переноса заряда) при связывании с гидрофобной полостью A β , что реализует off-on механизм и приводит к значительному усилению флуоресценции.

Фотофизические исследования показали, что **BDP33** обладает исключительными характеристиками: высоким соотношением сигнал/шум (усиление флуоресценции в 75.5 раз) и выраженным сродством к мишени (константа диссоциации (K_d) = 28.30 $\pm$ 5.94 нм). Конфокальная микроскопия клеток PC12, инкубированных с **BDP33** и коммерческим красителем ThT, подтвердила селективность связывания с A β 1-42 (Рис. 25. II). Высокий коэффициент колокализации Пирсона (R_r = 0.84) с ThT свидетельствует о способности **BDP33** специфично визуализировать β -амилоидные агрегаты в клеточных моделях.

В экспериментах *in vivo* краситель успешно преодолевал гематоэнцефалический барьер и демонстрировал специфичное накопление в мозге трансгенных мышей APP/PS1 (модель болезни Альцгеймера) по сравнению с контрольными животными.

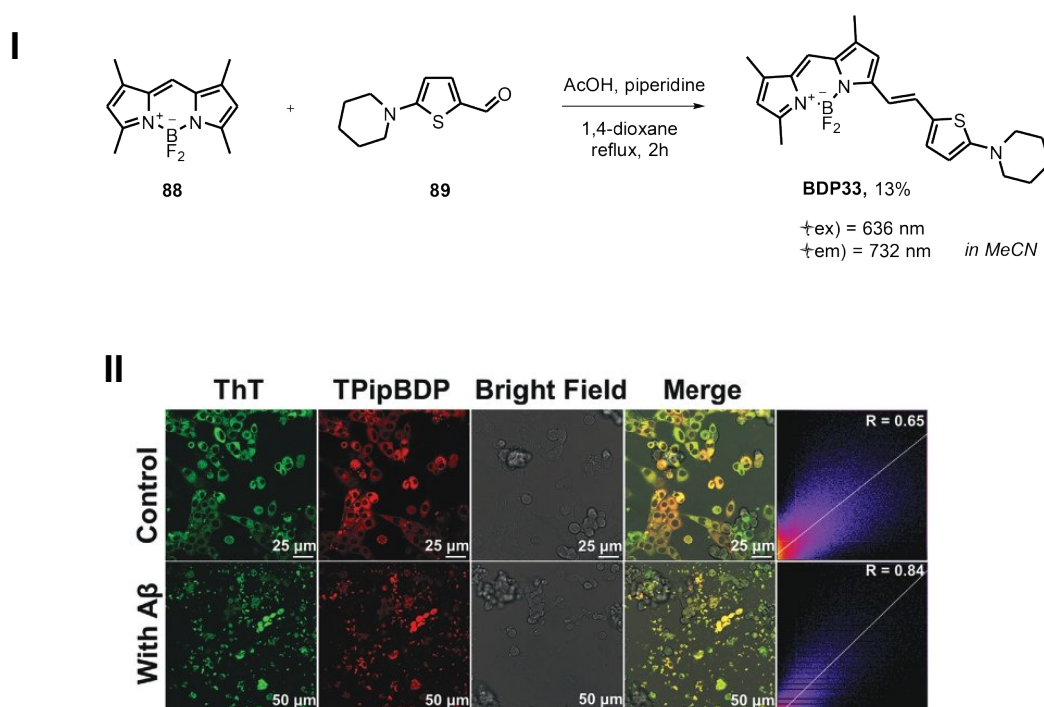


Рисунок 25. (I) Схема синтеза красителя **BDP33**. (II) Конфокальные микрофотографии клеток PC12, инкубированные с маркерами **BDP33** и ThT. Визуализация агрегатов A β 1-42 коммерческим ThT (зеленый канал) и **BDP33** (красный канал). Наложение изображений для изучения колокализации. Изображение заимствовано из: Ma L. и соавт., 2023 [87].

II.2.8. Ферменты ЦОГ

Современные исследования свидетельствуют о вовлечённости простагландинов в поддержании уникальных свойств раковых стволовых клеток, таких как способность к самообновлению, устойчивость к лечению, формирование метастазов и «скрытность» от иммунитета. Среди ферментов простагландинового пути особый интерес представляет

циклооксигеназа (ЦОГ), которая ассоциирована с прогрессированием опухоли и развитием резистентности. «Аварийная» изоформа ЦОГ (ЦОГ-2) активируется внешними условиями и способствует развитию опухоли. Так, различные стратегии ингибирования ЦОГ-2 в доклинических моделях демонстрируют антиметастатический эффект.

В недавней работе Тае Hong с соавт. [88] были предложены DИЕ-активные флуоресцентные метки для обнаружения циклооксигеназы (ЦОГ). Авторами были разработаны BODIPY-производные **BDP34a,b** (в литературном источнике **BD-IMC-1** и **BD-IMC-2**), содержащие фрагмент индометацина - нестероидного противовоспалительного препарата, в разных положениях молекулы. Соединение **BDP34a** было синтезировано путем амидирования амина **90** индометацином **94** с формированием мезо-замещенного производного. Для получения структуры **BDP34b**, замещенной во 2-м положении, сначала из иодида **91** получили спирт **92** с помощью реакции кросс-сочетания, который затем был подвергнут этерификации индометацином **94**. (Рис. 26.I). Исследование фотофизических свойств показало, что оба зонда обладают ACQ-свойствами (гашение флуоресценции при агрегации; $\Phi(\text{BDP34a}) = 0.0060$; $\Phi(\text{BDP34b}) = 0.0035$) в буферных растворах, но демонстрируют исключительную селективность и значительное увеличение квантового выхода в присутствии ЦОГ (**BDP34a**: $\Phi_{\text{ЦОГ}} = 0.66$, $\Phi_{\text{ЦОГ-2}} = 0.47$; **BDP34b**: $\Phi_{\text{ЦОГ}} = 0.29$, $\Phi_{\text{ЦОГ-2}} = 0.015$). Соединения демонстрировали образование самоорганизованных наноструктур в PBS-буфере ($r(\text{BDP34a}) = 620.4$ нм; $r(\text{BDP34b}) = 598.5$ нм), что было доказано использованием динамическим рассеянием света. Обе наноструктуры демонстрировали выраженную деагрегацию при связывании с ЦОГ, что приводило к уменьшению размера частиц более чем в пять раз. С помощью конфокальной микроскопии эффективность визуализации ЦОГ красителями **BDP34a,b** была продемонстрирована в живых клетках HeLa и RAW264.7 (Рис. 26.III; 26.IV). В клетках с индуцированной экспрессией ЦОГ-2 под действием липосахарида (LPS) или форбол-12-миристат-13-ацетата (PMA) оба зонда продемонстрировали статистически значимое усиление флуоресценции (до 2 раз), что коррелировало с увеличением экспрессии ЦОГ-2, подтвержденным иммуноблоттингом (Рис. 26.II). Применение маркеров **BDP34a,b** в образцах тканей пациентов с саркомами различной степени злокачественности не только подтвердило возможность детектирования ЦОГ-2 *in vivo*, но и продемонстрировало перспективность использования этого фермента в качестве биомаркера раковых стволовых клеток.

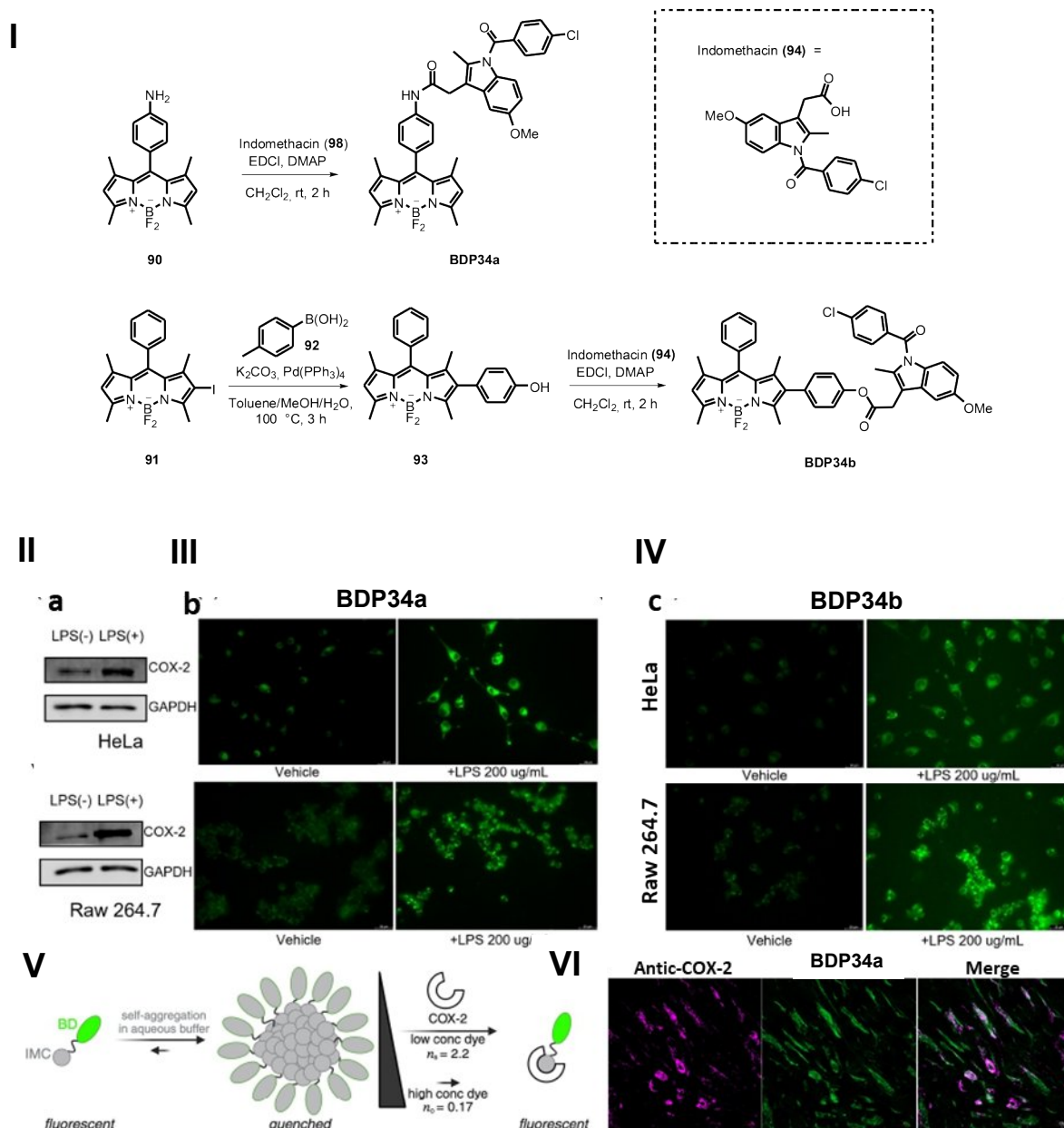


Рисунок 26. (I) Схема синтеза красителей **BDP34a** и **BDP34b**. (II) Иммуноблоттинг экспрессии ЦОГ-2 при обработке клеток HeLa и Raw264.7. Микрофотографии клеток HeLa и Raw264.7 обработанные **BDP34a**(III) и **BDP34b**(IV) в отсутствие и присутствии липосахарида (LPS). (V) Схематическое изображение процесса самоагрегации, сопровождаемое уменьшением флуоресценции соединений **BDP34a,b**, и процесс растворения агрегатов при связывании с ЦОГ-2 с разгоранием флуоресценции. (VI) Микрофотографии тканей саркомы человека, обработанных красителями. Окрашивание иммуногистохимическим anti-ЦОГ-2 и **BDP34a**. Наложение изображений для изучения колоколизации. Изображение заимствовано из Tae Hong K. и соавт., 2024 [88].

II.3. Биорегуляторы

Эндогенные биотиолы, такие как глутатион (GSH), цистеин (Cys) и гомоцистеин (Hcy), представляют собой серосодержащие соединения, играющие ключевую роль в поддержании клеточного редокс-гомеостаза, детоксикации, сигнальных процессах и работе ферментов [89, 90]. Дисбаланс их уровня и редокс-статуса является маркером окислительного стресса, связанного с развитием онкологических, нейродегенеративных заболеваний и процессов старения. Флуоресцентная визуализация динамики комплекса биотиолов с помощью флуоресцентных маркеров, специфичных к тиольным группам, позволяет в реальном времени отслеживать изменения их концентрации и редокс-состояния в живых клетках и тканях [91]. Этот метод открывает возможности для фундаментального изучения редокс-биологии, скрининга антиоксидантных препаратов и диагностики заболеваний, ассоциированных с окислительным стрессом.

В работе Tang и соавт. [92] был разработан комплекс красителя **BDP35** с Pd(II) (**BDP35-Pd**) для визуализации эндогенных биотиолов в живых клетках на основе изменения флуоресценции. Флуоресцентный хелатор **BDP35**, построенный на основе структурных фрагментов родамина, BODIPY и хелатирующей группы для катиона Pd(II), был синтезирован по схеме, представленной на Рисунке 27.I. Синтез включал амидирование карбоновой кислоты **102** пиперазиновым производным **103** с образованием промежуточного соединения **104**. Последующее амидирование субстрата **104** амином **105** позволило получить целевую молекулу **BDP35**. Механизм детекции биотиолов зондом **BDP35-Pd** основан на селективном изменении цвета флуоресценции. Взаимодействие с целевыми биотиолами индуцирует высвобождение иона Pd²⁺ и последующую внутримолекулярную циклизацию родаминового фрагмента. Возникающая структурная модификация эффективно подавляет FRET (резонансный перенос энергии) между донором и акцептором, что приводит к переключению флуоресцентного сигнала со свечения в красной области спектра ($\lambda_{em} = 600$ нм) на интенсивное зеленое свечение ($\lambda_{em} = 510$ нм). Данное переключение, подтвержденное спектрофлуориметрическими исследованиями при титровании зонда **BDP35-Pd** биотиолами (Рис. 27.III), лежит в основе аналитического сигнала.

Оценив цитотоксичность **BDP35** как низкую, авторы продемонстрировали возможность визуализации глутатиона (GSH) комплексом **BDP35-Pd** в живых клетках. С помощью конфокальной микроскопии было проведено исследование клеток линии A549, инкубированных с комплексом **BDP35-Pd**, в разных флуоресцентных каналах (Рис. 27.II). Показательно, что предварительная обработка клеток N-этилмалеимидом, известным реагентом для связывания тиольных групп, приводила к значительному уменьшению флуоресценции в зеленом канале

(Рис. 27.IIf-j). Данный факт подтверждает селективность работы комплекса **BDP35-Pd** и возможность его применения для детекции биотиолов непосредственно в клетках.

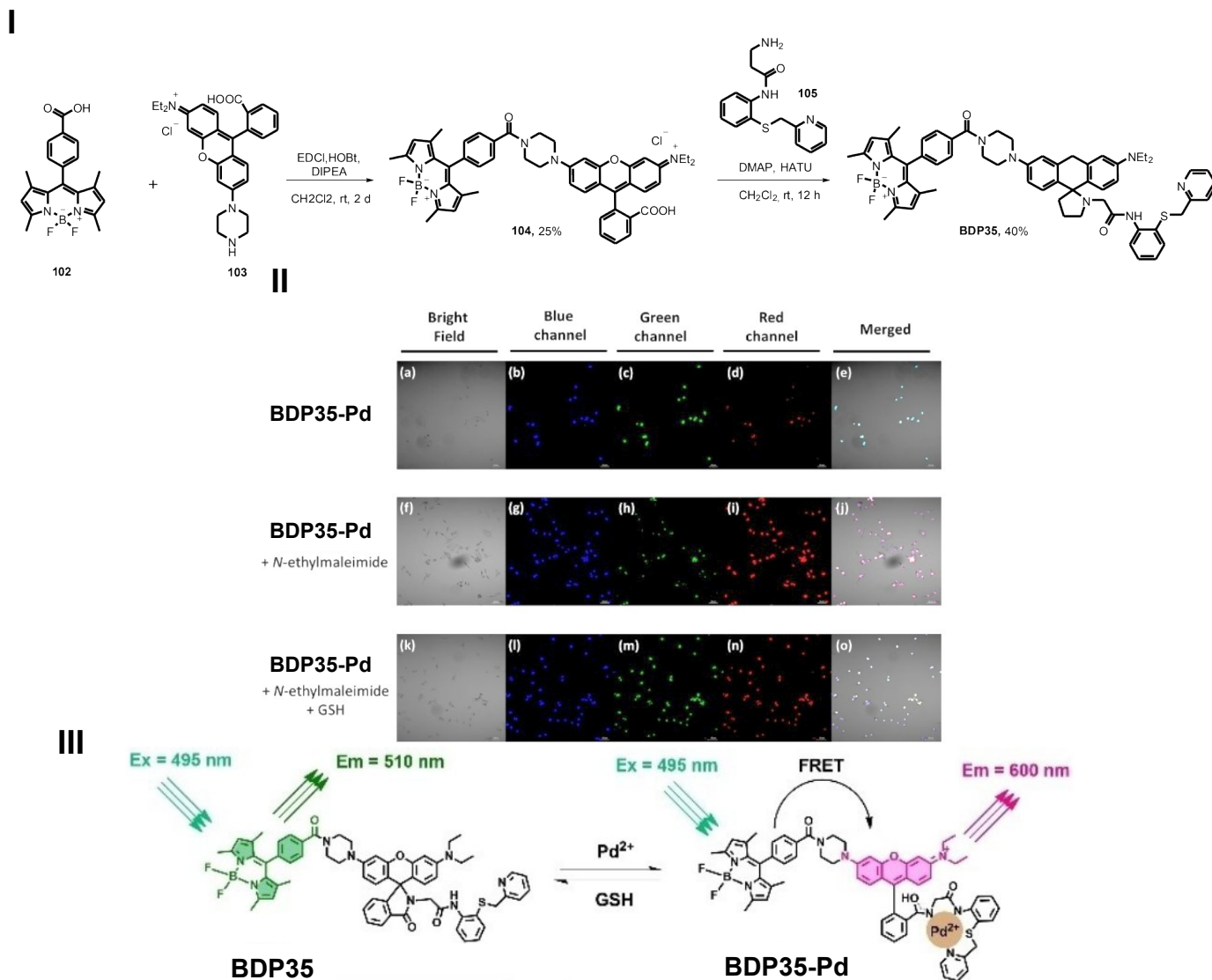


Рисунок 27. (I) Схема синтеза красителя **PRS**. (II) Конфокальные лазерные сканирующие микроскопические изображения (CLSM) клеток A549, инкубированных со сложным ансамблем **BDP35-Pd** (10 мкМ) в разных каналах: (a– e) только датчик **BDP35-Pd** в качестве контроля; (f–i) датчик **BDP35-Pd** в отсутствие GSH (клетки предварительно обработаны тиоловым антиоксидантом N-этилмалеимидом); и (k–o) датчик **BDP35-Pd** в присутствии GSH (к предварительно обработанным клеткам добавлен GSH). Клетки были окрашены DAPI (синяя флуоресценция). (III) Предлагаемый механизм обнаружения GSH с помощью **BDP35-Pd²⁺**. Изменение цвета от зелёного к красному, и обратное переключение при добавлении GSH. Изображение заимствовано из: Tang F.K. и соавт., 2023 [92].

В работе Yang и соавт. [93] была предложена флуоресцентная метка на основе BODIPY – **BDP36**, предназначенная для детекции цистеина (Cys). Целевое соединение **BDP36**, содержащее метоксифенилсульфидный фрагмент в *мезо*-положении, было синтезировано по схеме, представленной на Рисунке 28.I. На первом этапе конденсация пиррола **106** с фосгеном с

последующей обработкой оксихлоридом фосфора (POCl_3) позволила получить промежуточный продукт — хлорированный субстрат **108**. На второй стадии реализовано нуклеофильное замещение атома хлора в *мезо*-положении соединения **108** на тиолат-анион, из тиола **109**, что привело к формированию целевой структуры **BDP36**. Принцип off-on работы пробы **BDP36** основан на замещении метоксифенилсульфидной группы цистеином, что снимает тушение флуоресценции и приводит к значительному усилению сигнала. Зонд **BDP36** проявил себя как высокочувствительный и селективный сенсор для цистеина в растворах. Исследования выявили его низкий фоновый сигнал и значительный флуоресцентный "отклик" (в 3150 раз при 600 нм) на целевой аналит. Эксперименты на клеточной линии HepG2 продемонстрировали способность зонда детектировать эндогенный цистеин, о чем свидетельствует медленное нарастание флуоресцентного сигнала во времени. Важным результатом является подтверждение высокой селективности **BDP36** именно к цистеину на клеточной модели: предварительная инкубация клеток с различными биотиолами (Cys, Hcy, GSH) выявила статистически значимое усиление флуоресценции исключительно в случае цистеина.

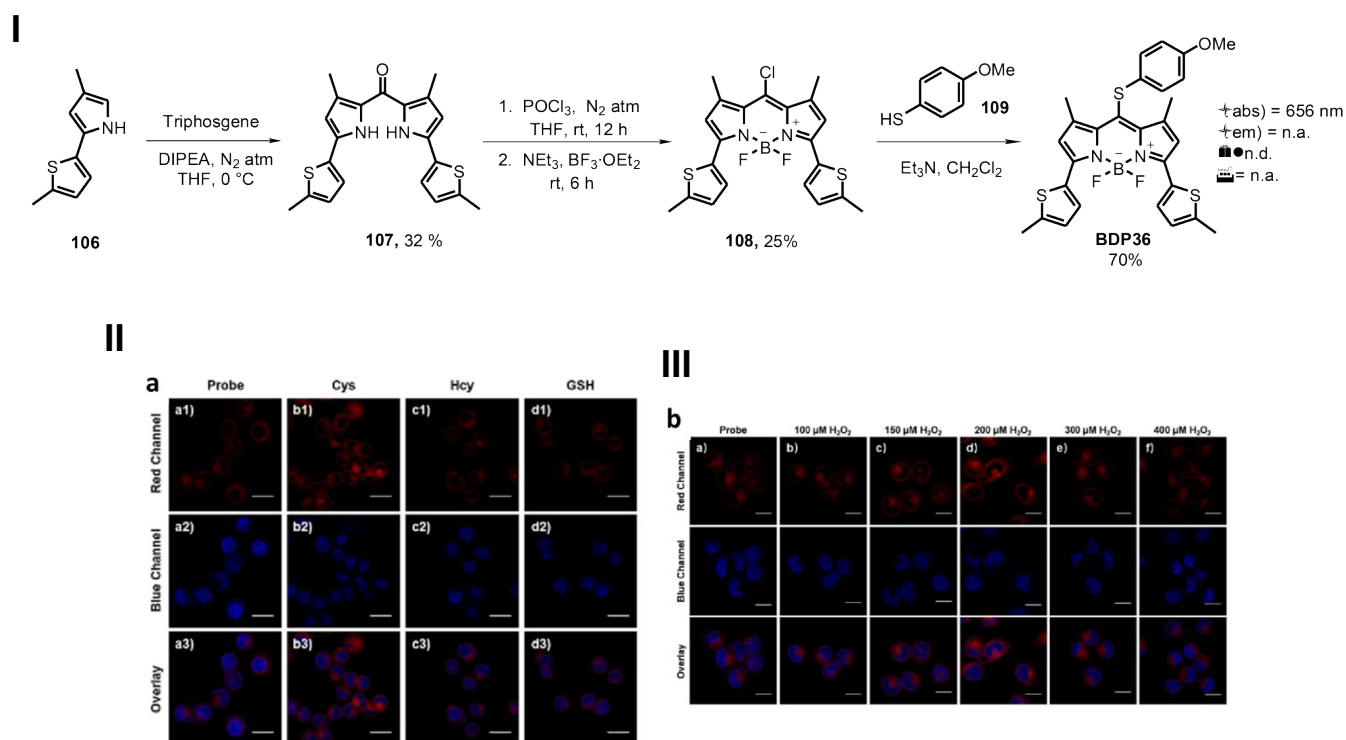


Рисунок 28. (I) Схема синтеза красителя **BDP36**. (II) Конфокальные микрофотографии клеток HepG2 инкубированные меткой **BDP36** и аминокислотами (Cys, Hcy, GSH). Дополнительное окрашивание ядер клетки с помощью синего красителя Hoechst (средняя строка). Наложение изображений красного и синего канала (нижняя строка). (III) Конфокальные микрофотографии клеток HepG2 инкубированные меткой **BDP36** и обработанные различной концентрацией H_2O_2 (100 – 400 μM). Изображение заимствовано из: Yang X. и соавт., 2023 [93].

Зонд **BDP36** успешно применен для решения практических задач детекции цистеина. Авторами показана его эффективность для визуализации колебаний концентрации цистеина при окислительном стрессе в клетках, а также для детекции *in vivo* на модели данио-рерио.

В работе Yang X. с соавт. [94] описан комплекс красителя **BDP37** с ионами Cu^{2+} (**BDP37-Cu**), предназначенный для off-on визуализации глутатиона (GSH) в живых клетках. Целевое соединение **BDP37**, селективно образующее стабильный комплекс с ионами $\text{Cu}(\text{II})$, было синтезировано из производного **109** в две стадии (Рис. 29.I). На первой стадии соединение **109** вступало в реакцию с гидразином с образованием промежуточного **111**. Затем соединение **111** было подвергнуто конденсации с альдегидом **112**, что привело к получению целевой структуры хелатора. Данный комплекс характеризуется тушением флуоресценции за счет парамагнитного эффекта ионов меди (II) и обладает низким квантовым выходом (Рис. 29.II). Изучение фотофизических свойств показали, что комплекс **BDP37-Cu** избирательно реагирует с глутатионом, что приводит к высвобождению ионов меди, снятию тушения и восстановлению флуоресценции. Проведенные авторами эксперименты демонстрируют перспективность комплекса **BDP37-Cu** в качестве сенсора для визуализации глутатиона (GSH).

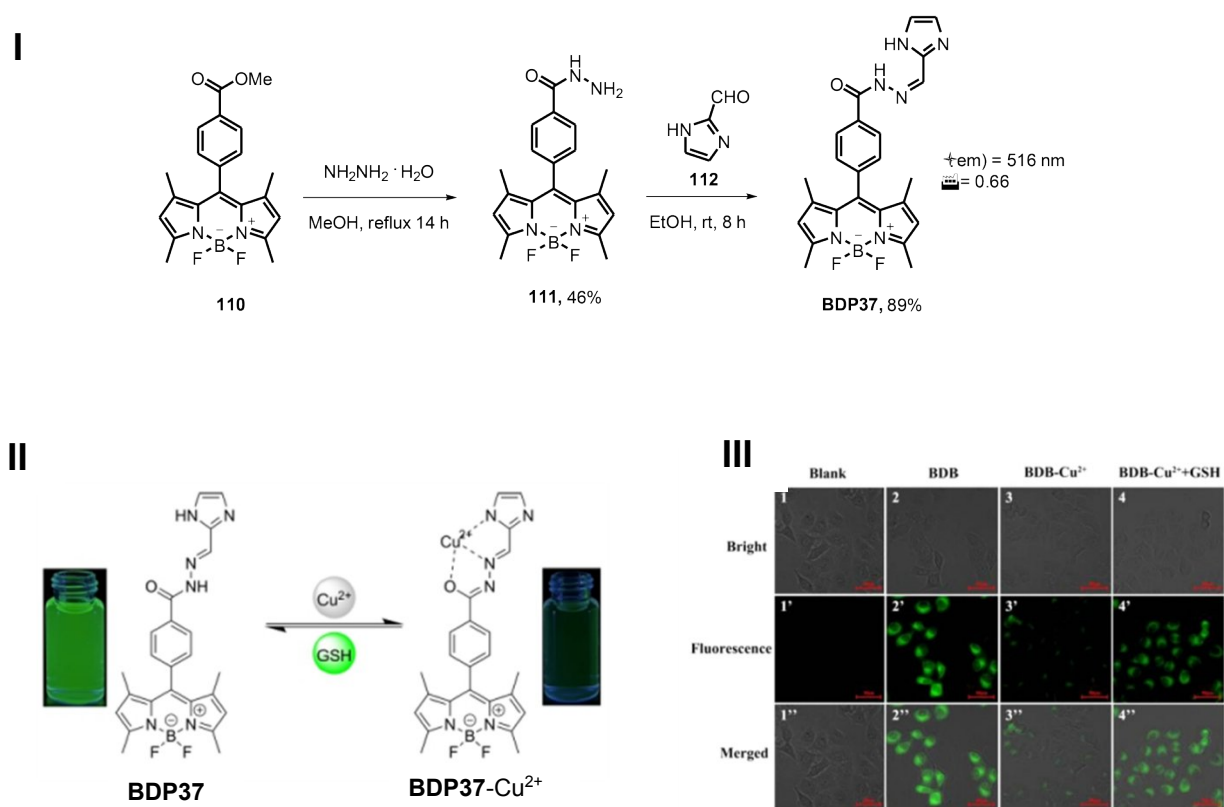


Рисунок 29. (I) Схема синтеза красителя **BDP37**. (II) Схематическое изображение принципа обнаружения GSH пробой **BDP37-Cu²⁺**. (III) Конфокальные микрофотографии клеток HeLa, инкубированных меткой **BDP37**, а также в присутствии Cu^{2+} , Cu^{2+} и тиола GSH (средняя строка). Светопольное (верхняя строка) и наложенное изображение (нижняя строка). Изображение заимствовано из Wang M. и соавт., 2023[94].

Установлены стехиометрия взаимодействия 1:1, рабочий диапазон pH (6–10) и низкий предел обнаружения 0.02 мкМ, что определяет его высокую чувствительность и применимость в физиологических условиях. Детектирование внутриклеточного глутатиона (GSH) с помощью системы **BDP37-Cu** также было продемонстрировано методом конфокальной микроскопии. В клетках HeLa, инкубированных с красителем **BDP37** и раствором Cu^{2+} , наблюдалось первоначальное тушение флуоресценции вследствие образования комплекса **BDP37-Cu**. Последующее добавление глутатиона приводило к полному восстановлению флуоресценции до исходной интенсивности (Рис. 29.III).

В недавней работе Tong с соавт. [95] был предложен флуоресцентный нанокompозит **FeOOH-QD-BDP38** для детектирования глутатиона. Система представляет собой частицы метагидроксида железа (FeOOH), функционализированные молекулами **BDP38** (в литературном источнике **ATP-BODIPY**) (Рис. 30.II). Принцип работы зонда основан на off-on механизме: в присутствии GSH происходит восстановление FeOOH до ионов Fe^{2+} с последующей деградацией нанокompозита и высвобождением флуоресцирующего **BDP38** (Рис. 30.I). Пр продемонстрирована высокая стабильность системы – флуоресценция **BDP38** не изменялась в присутствии катионов металлов (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}), аминокислот, глюкозы и бычьего сывороточного альбумина. Низкоцитотоксичный (по данным МТТ-теста на клетках HCT116) нанокompозит успешно применяли для визуализации эндогенного GSH в клетках HCT116 методом конфокальной микроскопии (Рис. 30.III). Инкубация клеток с **FeOOH-QD-BDP38** приводила к интенсивному зеленому свечению, тогда как предварительная обработка клеток N-этилмалеимидом, блокирующим тиольные группы GSH, полностью подавляла флуоресцентный сигнал. Кроме того, была продемонстрирована эффективность **FeOOH-QD-BDP38** для количественного определения GSH в сыворотке крови. Количественный анализ GSH в сыворотке крови с помощью FeOOH-QD-BDP38 показал высокую точность (97.3–105.2%) и воспроизводимость (RSD 3.5–4.7%), что приемлемо для работы со сложными реальными образцами.

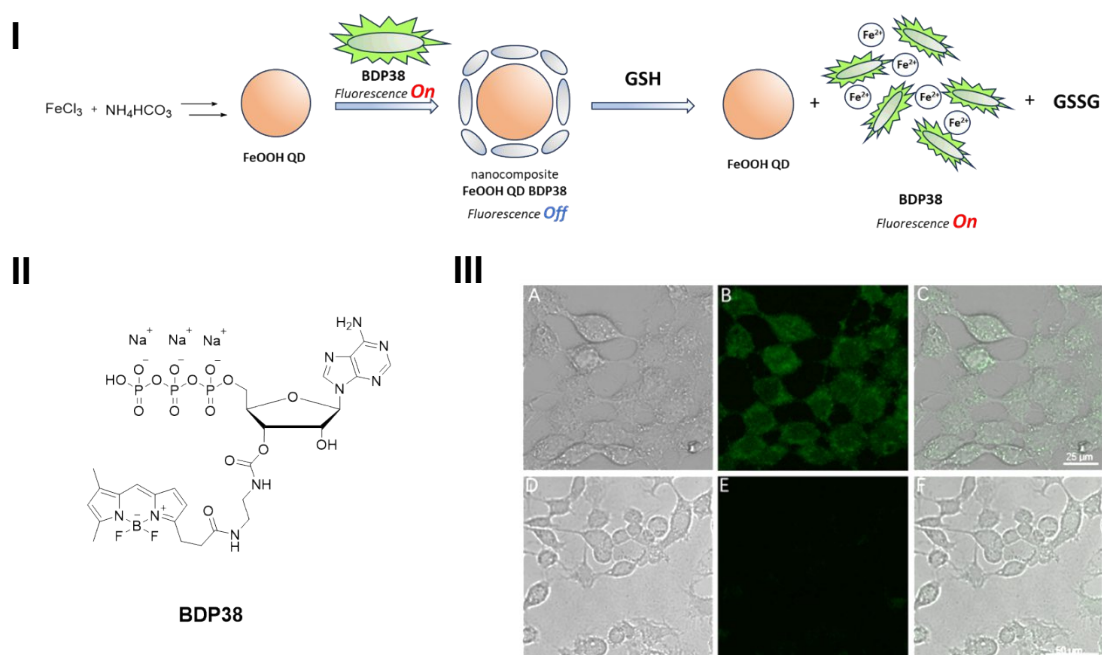


Рисунок 30. (I) Схематичное изображение принципа работы нанокompозита **FeOOH-QD-BDP38** для флуоресцентной визуализации клеточного глутатиона (GSH). (II) Структура флуоресцентной молекулы **BDP38**. (III) Конфокальные микрофотографии клеток HCT116 инкубированные нанокompозитом **FeOOH-QD-BDP38** без обработки N-этилмалеимидом (верхняя строка) и с предварительной обработкой (нижняя строка). Изображение заимствовано из Tong L. и соавт., 2024 [95].

В работе Wan и соавт. [96] был представлен флуоресцентный сенсор **BDP39** для селективного, чувствительного и быстрого обнаружения глутатиона (GSH) в присутствии других тиолов, в частности цистеина (Cys) и гомоцистеина (Hcy), как в растворах, так и в живых клетках. Мезо-арилтеллур-производное BODIPY (**BDP39**) было синтезировано путем реакции между мезо-хлорBODIPY **112** и диарилдителлуридом **113** в восстановительных условиях (NaBH₄) (Рис. 31.I). Дизайн флуоресцентной пробы **BDP39** типа off-on основана на первоначальном отсутствии флуоресценции из-за эффекта фотоиндуцированного переноса электрона (PET) от атома теллура к флуорофору BODIPY. Взаимодействие с глутатионом служит ключевым фактором, вызывающим селективное разрывание связи Te–C, что приводит к устранению PET-эффекта и интенсивному “включению” флуоресцентного сигнала (Рис. 31.II). Уникальная селективность **BDP39** в отношении GSH, как полагают авторы, объясняется наличием в молекуле глутатиона дополнительной заряженной карбоксильной группы, которая отсутствует у Cys и Hcy, что способствует усилению нуклеофильной активности тиольной группы и ускоряет расщепление Te-содержащей группы. Соединение **BDP39** продемонстрировало чувствительность к присутствию GSH: наблюдалось значительное усиление флуоресценции при 541 нм с увеличением квантового выхода (от $\Phi_{em} = 0$, до 0.73; PBS/MeCN = 9 : 1, по объему); предел

обнаружения GSH составил 1.7 нМ в линейном диапазоне концентраций 0–4 мкМ. Изучение авторами селективности показало высокую избирательность **BDP39** к GSH среди биологически релевантных молекул (Cys, Hcy, HS⁻, аминокислот, активных форм кислорода и др.) – только GSH индуцировал интенсивное «включение» флуоресценции. Методами конфокальной микроскопии была продемонстрирована способность **BDP39** детектировать внутриклеточный глутатион в живых клетках HepG2. Инкубация клеток с пробой вызывала интенсивную зеленую флуоресценцию, свидетельствующую о реакции с эндогенным GSH. Для подтверждения специфичности, внутриклеточный GSH был предварительно истощен с помощью N-этилмалеимида (NEM), что приводило к полному исчезновению сигнала. Последующее внесение этилового эфира глутатиона (GSH-OEt) надежно восстанавливало флуоресценцию, что доказывает селективность зонда и его применимость для мониторинга динамики GSH *in vivo*.

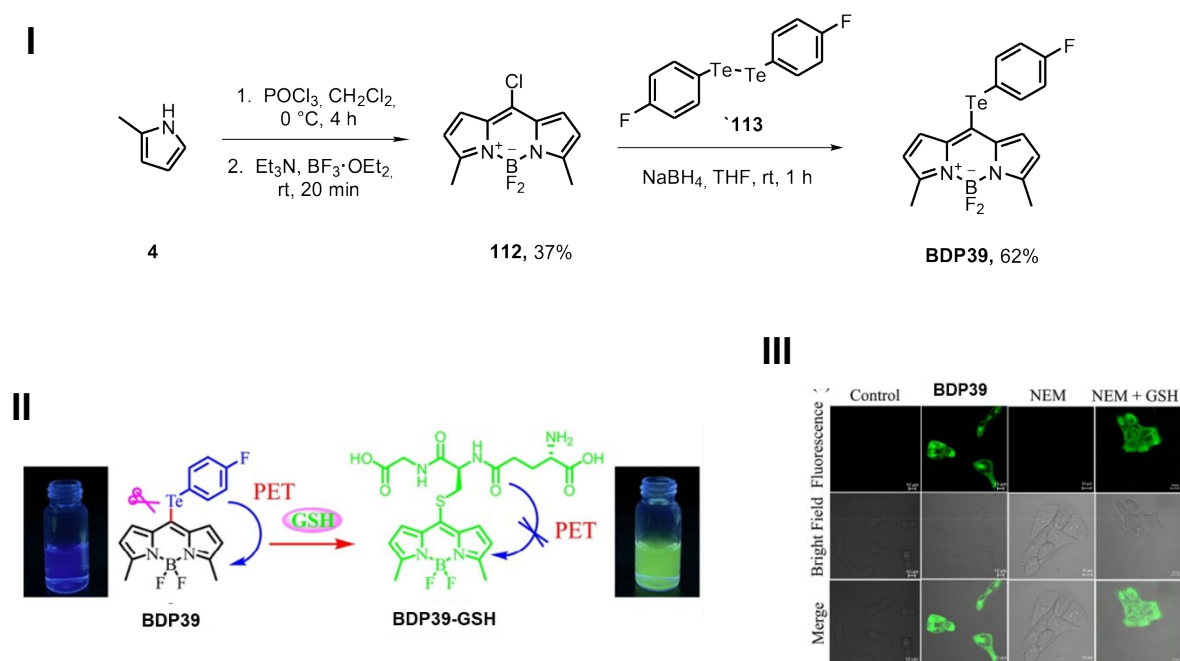


Рисунок 31. (I) Схема синтеза красителя **BDP39**. (II) Механизм флуоресцентного обнаружения GSH красителем **BDP39**. (III) Конфокальные флуоресцентные изображения клеток HepG2 инкубированные красителем **BDP39**: Контрольный эксперимент без красителя; предварительно обработанные NEM клетки; предварительно обработанные NEM и GSH. Изображение заимствовано из Wan Q.-H. и соавт., 2024 [96].

В работе Zeng с соавт. [97] сообщается о разработке новой флуоресцентной метки **BDP40** (MCB-NBD), сочетающей одновременно два фрагмента, гасящих флуоресценцию (бензоксадиазольного и сложноэфирного). Это не только обеспечивает разнообразные варианты флуоресцентного отклика, но и позволяет полностью подавить собственную флуоресценцию. Целевая молекула **BDP40** на основе BODIPY была получена из исходного **116** омылением с последующей реакцией этерификации в присутствии спирта **117**, Li₂CO₃ и ДМФА (Рис. 32.I). Исследования *in vitro* показали наличие спектрального отклика метки **BDP40** на присутствие

глутатиона (GSH), цистеина (Cys), гомоцистеина (Hcy) и сероводорода (H_2S), которое выражалось в увеличении флуоресценции в 140-180 раз в присутствии аналитов. Обладая стабильностью в физиологическом pH, хорошей фотостабильностью и высокой чувствительностью (пределы обнаружения для GSH, Cys, Hcy, H_2S составили 4.80, 7.57, 10.46 и 16.31 нМ соответственно), краситель **BDP40** был изучен для окрашивания биотиолов внутри клеток L-O2. Клетки L-O2, инкубированные с ацетоаминофеном (APAP, жаропонижающий препарат, имитирующий лекарственное поражение) и с **BDP40** не флуоресцируют. Однако последующая обработка растворами биотиолов (Cys/Hcy/GSH/ H_2S) приводит к возникновению флуоресценции (Рис 32.II). Большая часть данной работы посвящена *in vivo* применению красителя **BDP40**. А именно продемонстрирована способность обнаружения эндогенных биотиолов в разведенной плазме мышей с лекарственным поражением печени, а также визуализация динамики эндогенных биотиолов при ферроптозе немелкоклеточного рака легкого (Рис. 32.III; 32.IV).

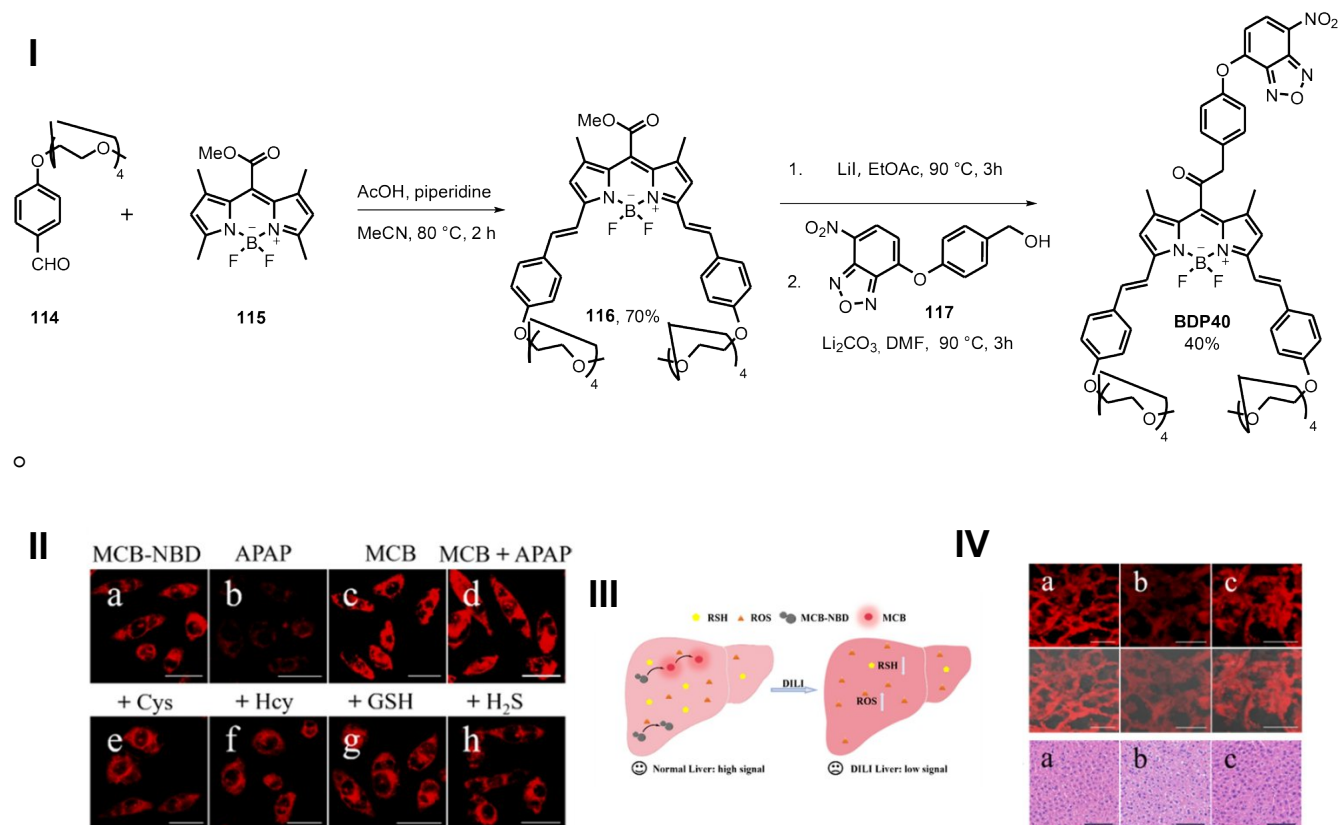


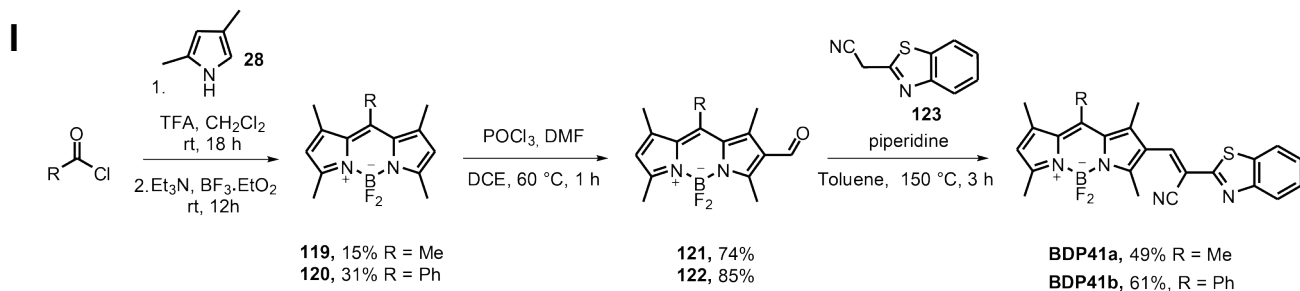
Рисунок 32. (А) Конфокальные фотографии клеток L-O2, инкубированные только с **BDP40** (a); с APAP и **BDP40** (b); только с **116** (c); с APAP и **116** (d). Клетки, предварительно инкубированные APAP и **BDP40**, с последующей обработкой 100 мкМ раствором Cys (e), Hcy (f), GSH (g) и H_2S (h). (Б) Схематическая иллюстрация лекарственного поражения печени (DILI). (С) *In vivo* визуализация повреждения печени у мышей с помощью **BDP40**. Изображение заимствовано из Zeng Q. и соавт., 2024 [97].

II.4. Параметры клеточной микросреды

Клеточная вязкость считается одним из ключевых факторов физиологической среды в клетках, тесно связанным с множеством важных процессов, таких как транспорт веществ, метаболизм, передача сигналов и апоптоз [98]. Аномальные изменения уровня вязкости часто приводят к возникновению различных заболеваний и дисфункций органов, включая сахарный диабет, атеросклероз и нейродегенеративные расстройства[99-101]. В последнее время активно разрабатываются новые флуоресцентные зонды для контроля вязкости клеток. Некоторые из этих зондов способны отслеживать вязкость различных органелл, включая митохондрии, лизосомы, липидные капли, цитоплазму и другие структуры.

В работе Li и соавт. [102] были разработаны флуоресцентные метки **BDP41a,b** (в литературном источнике **5QSZ** и **BQSZ** соответственно), предназначенные для отслеживания изменений вязкости в липидных каплях (LD) живых клеток. Бензотиазолсодержащие производные BODIPY **BDP41a,b** были синтезированы в соответствии со схемой на Рисунке 33.I. Синтез включал следующие стадии: сначала был получен каркас BODIPY (**119,120**), который затем подвергли формилированию в условиях реакции Вильсмейера—Хаака (POCl_3 , ДМФА) с получения альдегидов **121** и **122**. Ключевой реакцией получения целевых соединений **BDP41a,b** стала реакция конденсации этих формилпроизводных с 2-цианометилбензотиазолом **123** в присутствии пиперидина в качестве основания.

Принцип работы флуоресцентных проб **BDP41a,b** основан на эффекте скрученного внутримолекулярного переноса заряда (Twisted Intramolecular Charge Transfer – TICT), что делает их флуоресцентный отклик высокочувствительным к микроокружению клеточной среды. Применение красителей **BDP41a** и **BDP41b** для визуализации вязкости в клеточных линиях SH-SY5Y показало, что в условиях низкой вязкости не наблюдалось значимой флуоресценции, однако последующая обработка клеток липополисахаридом и монензином, индуцирующими повышение вязкости, провоцировала интенсивное "включение" красной флуоресценции с увеличением сигнала до 5 раз (Рис. 33.IIa; 33.IIb). Красители **BDP41a** и **BDP41b** характеризовались избирательным накоплением в липидных каплях, что подтверждалось высокой колокализацией их флуоресценции с сигналом коммерческого маркера BODIPY 493/503, селективного к LD (коэффициент корреляции Пирсона 0.74 и 0.72 соответственно; Рис. 33.IIc; 33.IId).



II

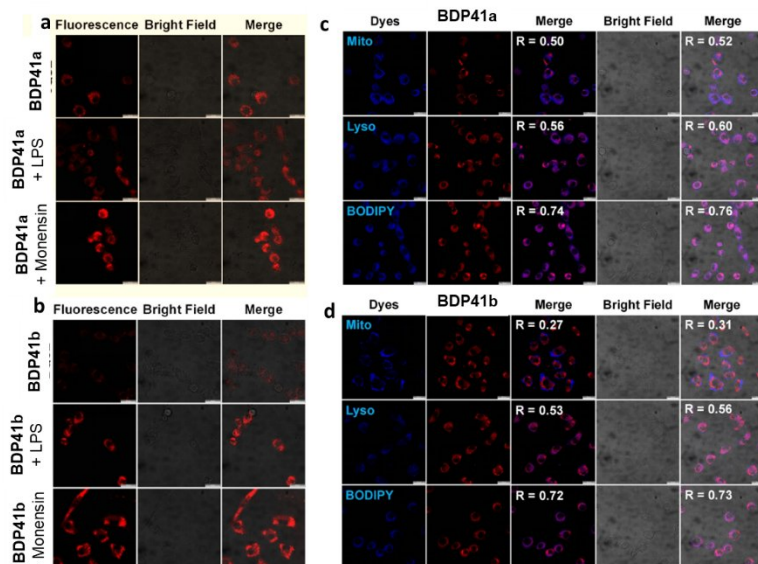


Рисунок 33. (I) Схема синтеза флуоресцентных красителей **BDP41a,b** (II) Конфокальные флуоресцентные изображения (a) **BDP41a** или (b) **BDP41b** (5 мкМ), демонстрирующие вязкость клеток SH-SY5Y. Клетки предварительно инкубировали без добавок, с ЛПС или монензином (5 мкМ) в течение 40 минут, а затем инкубировали с зондами **BDP41a** или **BDP41b** (5 мкМ) на протяжении 30 минут. Анализ ко-локализации органелл (c) **BDP41a** и (d) **BDP41b** (5 мкМ) в клетках SH-SY5Y.; для Mito-Tracker-Blue, Lyso-Tracker-Blue или BODIPY 493/503. Изображение заимствовано из Li K. и соавт., 2024 [102].

В работе Li и соавт. [103] также была продемонстрирована ключевая роль бензотиазольного фрагмента в обеспечении высокой чувствительности флуоресцентных меток к вязкости. Авторами были разработаны два соединения **BDP42a,b** (в литературном источнике **BSZ-Ph** и **BSZ-R** соответственно), синтезированные в соответствии со схемой Рисунка 34.I. Синтез включал конденсацию альдегида **124** с 2-аминотиофенолом в присутствии кислоты (TsOH) с образованием бензотиазолпроизводного **125**, который вводился в конденсацию Кляйзена с альдегидами с получением целевых **BDP42a,b**. Соединения **BDP42a** и **BDP42b** характеризуются выраженной зависимостью флуоресцентного отклика от вязкости – сигнал усиливается с увеличением доли глицерина в системе глицерин-вода. В клеточных моделях (линия SH-SY5Y) красители **BDP42a,b** демонстрируют способность отслеживать повышение вязкости, вызванное клеточным стрессом. Обработка липополисахаридом (LPS), монензином и

нистатином приводит к интенсивному "включению" красной флуоресценции. Маркеры **BDP42a** и **BDP42b** характеризовались избирательным накоплением в липидных каплях, что подтверждалось высокой колокализацией их флуоресценции с сигналом коммерческого маркера BODIPY 493/503, нацеленного на LD (Рис. 34.Пс; 34.Пд). Коэффициент корреляции Пирсона для **BDP42a** и **BDP42b** составил 0.92 и 0.96 соответственно.

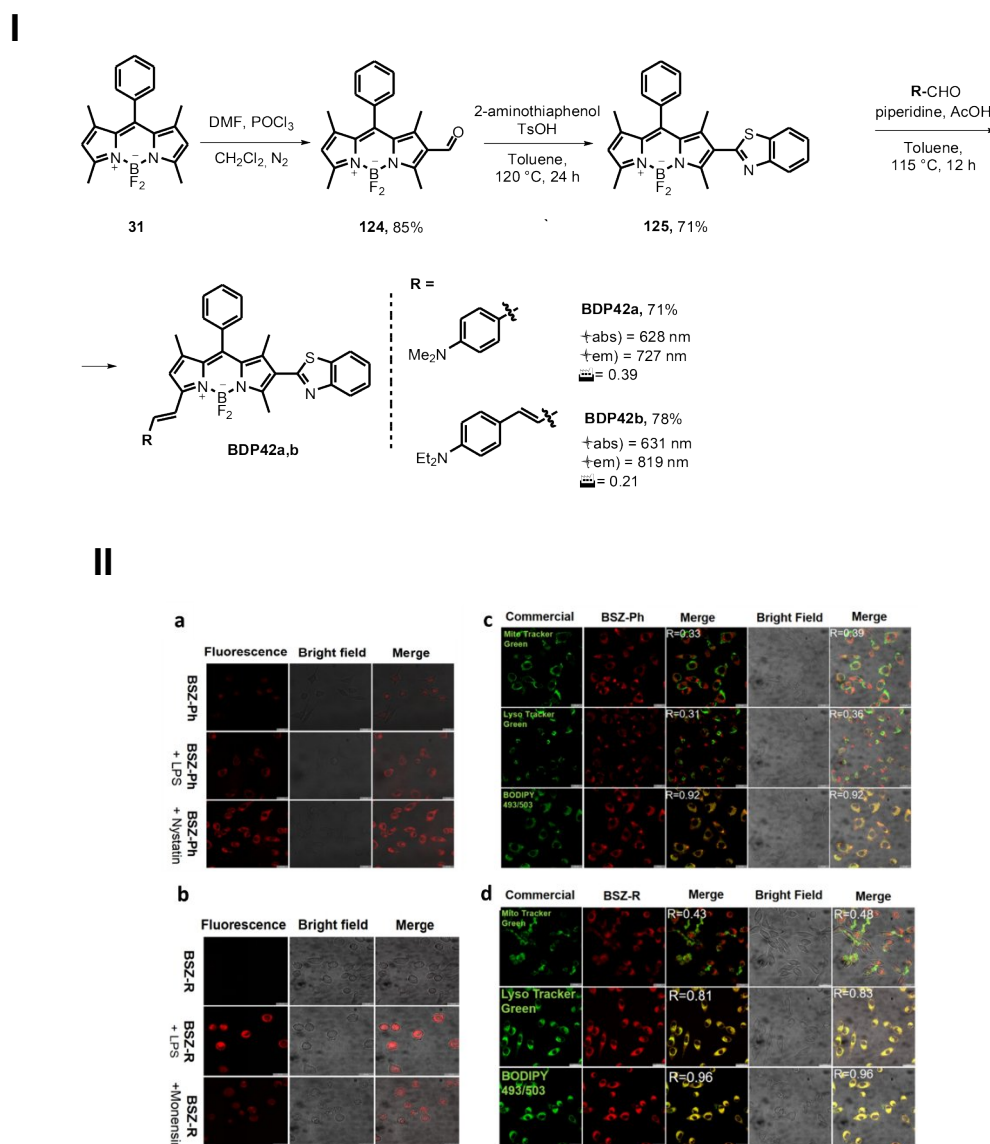


Рисунок 34. (I) Схема синтеза флуоресцентных красителей **BDP42a** и **BDP42b**. (II) Конфокальные микрофотографии клеток SH-SY5Y инкубированных с **BDP42a** (a,c) и **BDP42b** (b,d). (a,b) Визуализация внутриклеточной вязкости за счет предварительной обработки клеток с липосахаридом (LPC), монензином и нистатином. (c,d) Микрофотографии клеток SH-SY5Y инкубированных с **BDP42a,b**, также инкубированных с коммерческими красителями Lyso-Tracker-Green, Mito-Tracker-Green, BODIPY 493/503. Наложения изображений для сравнения локализации (merge). Изображение заимствовано из Li K. и соавт., 2024 [103].

В исследовании Wan и соавт. [104] были разработаны АПЕ-активные флуоресцентные маркеры **BDP43a** и **BDP43b** для отслеживания вязкости в живых клетках. Ключевая стадия

синтеза целевых соединений включала конденсацию альдегида **126**, несущего флуорофор BODIPY с соответствующими ариламинами **127** и **128** (Рис. 35.I). Принцип действия соединений **BDP43a** и **BDP43b** основан на off-on механизме, который запускается при ингибировании внутримолекулярного вращения в вязкой среде. Эксперименты с водно-глицериновыми и водно-ацетонитрильными смесями подтвердили, что в маловязких средах фрагмент с C=N связью в мезо-положении свободно вращается, вызывая тушение флуоресценции. При увеличении вязкости или в агрегатах это вращение подавляется, запуская «включение» флуоресценции. Красители **BDP43a,b** проявили чувствительность к вязкости в живых клетках HeLa. Их флуоресценция оставалась низкой в условиях нормальной вязкости, но значительно усиливалась при её повышении с помощью липосахаридов и монензина (Рис. 35.III,c,d). Исследование внутриклеточной локализации методом конфокальной микроскопии на клетках HeLa выявило селективное накопление маркеров в лизосомах и митохондриях (Рис. 35.IIIa,b).

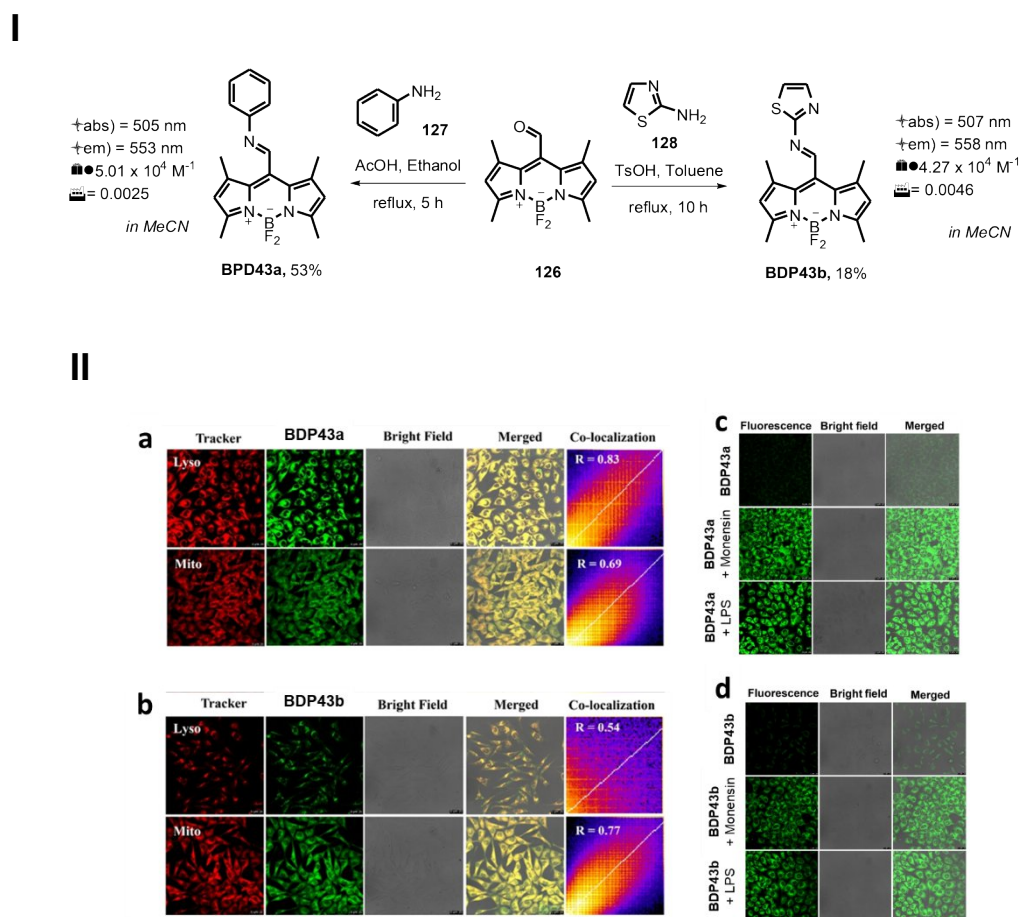


Рисунок 35. (I) Схема синтеза флуоресцентных красителей **BDP43a** и **BDP43b**. (II) (a,b) Микрофотографии клеток HeLa инкубированных с **BDP43a** (a) и **BDP43b** (b), также инкубированных с коммерческими красителями Lyso-Tracker-Red, Mito-Tracker-Red. Светопольное изображение. Наложения изображений для сравнения локализации (merge). Конфокальные микрофотографии клеток HeLa инкубированных с **BDP43a** (c) и **BDP43b** (d). (c,d) Визуализация внутриклеточной вязкости за счет предварительной обработки клеток с липосахаридом (LPS), монензином. Изображение заимствовано из: Wan Q.-H. и соавт., 2024 [104].

Колокализация с Lyso-Tracker-Red и Mito-Tracker-Red выявила избирательное накопление зонда **BDP43a** в лизосомах (Коэффициент корреляции Пирсона $R = 0.83$) и митохондриях ($R = 0.69$). В отличие от него, **BDP43b** демонстрирует высокую селективность к митохондриям ($R = 0.77$) и значительно меньшую — к лизосомам ($R = 0.54$).

В продолжении исследования AIE-активных *мезо*-замещенных BODIPY для изучения внутриклеточной вязкости Shi с соавт. [105] разработали соединения **BDP44a** и **BDP44b**, содержащие тиазольный или бензотиофеновый фрагмент в *мезо*-положении. Соединения **BDP44a** и **BDP44b** были синтезированы из пиррола **35** и соответствующих альдегидов **129** и **130** с использованием классического подхода к сборке каркаса BODIPY (Схема 1, Рис. 36.I).

Чувствительность полученных маркеров на изменение вязкости, основанная на подавлении внутримолекулярного вращения, была подтверждена авторами в модельных средах. Эксперименты с водно-глицериновыми смесями показали, что флуоресценция усиливается в ответ на рост вязкости по классическому off-on механизму.

Способность производных **BDP44a** и **BDP44b** отслеживать изменения вязкости была успешно продемонстрирована в живых клетках HeLa. Слабый флуоресцентный сигнал в нативных условиях резко усиливался при искусственном повышении внутриклеточной вязкости с помощью липосахаридов и нистатина (Рис. 36.IV; 36.V). Исследование внутриклеточной локализации методом конфокальной микроскопии на клетках HeLa выявило накопление маркеров в лизосомах и митохондриях (Рис. 36.II; 36.III). Ко-локализация с Lyso-Tracker-Red и Mito-Tracker-Red показала, что производное **BDP44a** эффективно накапливается в лизосомах и митохондриях (Коэффициент корреляции Пирсона $R = 0.83$ в обоих случаях), тогда как **BDP44b** демонстрирует значительно более низкое накопление в данных органеллах ($R = 0.54-0.55$).

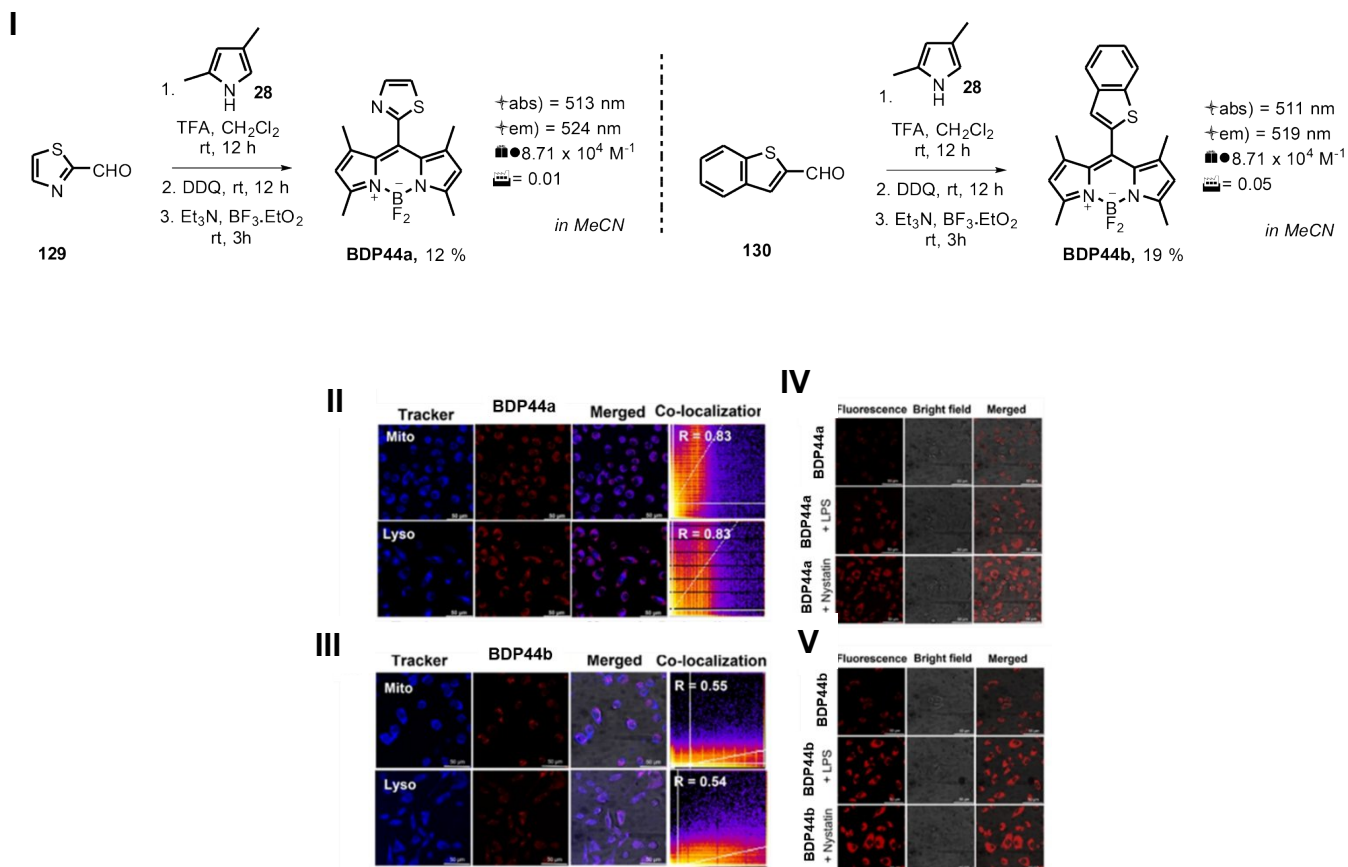


Рисунок 36. (I) Схема синтеза флуоресцентных красителей **BDP44a** и **BDP44b**. (II;III) Микрофотографии клеток SH-SY5Y инкубированных с **BDP44a** и **BDP44b**, также инкубированных с коммерческими красителями Lyso-Tracker-Blue, Mito-Tracker-Blue. Наложения изображений для сравнения локализации (merge). (IV;V) Визуализация внутриклеточной вязкости клеток SH-SY5Y за счет предварительной обработки клеток с липосахаридом (LPC) или нистатином. Изображение заимствовано из: Shi W.-J. и соавт., 2023 [105].

Таким образом, BODIPY является высокопродуктивной платформой для разработки флуоресцентных маркеров, применяемых в биохимических и биологических исследованиях. Ключевое преимущество красителей-BODIPY заключается в широких возможностях направленной модификации её оптических и сенсорных характеристик. Так, расширение π -сопряжённой системы или введение донорно-акцепторных фрагментов позволяет точно контролировать спектральные свойства ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 500–900 нм), адаптируя краситель к конкретным экспериментальным условиям. Замещение в мезо-, α - или β -положениях ядра даёт возможность селективно активировать такие механизмы управления флуоресцентным откликом, как PET, FRET, ICT, TICT или AIE, что обеспечивает высокоспецифичное распознавание целевых аналитов. Широкое структурное разнообразие производных BODIPY открывает перспективы для их использования в визуализации параметров внутриклеточного микроокружения (например, вязкости) и множества внутриклеточных компонентов: от органелл и ферментов до белков и малых биомолекул.

Анализ литературы, посвященной разработке флуоресцентных маркеров на основе BODIPY, показал, что большинство исследований сфокусировано на производных, модифицированных по 3-, 5- и *мезо*-положениям флуорофора, в то время как производные, замещённые по 2-,6-положениям, остаются относительно малоизученными, несмотря на их перспективные свойства. В частности, такие структуры могут представлять особый интерес благодаря удобству построения линейных π -сопряжённых систем и полимерных архитектур, формированию жёстких донор-акцепторных систем, возможности обеспечивать уникальные фотофизические свойства, недостижимые для других изомеров.

Отметим также, что среди флуоресцентных маркеров, таргетированных на белковые мишени, лишь в единичных исследованиях красители были сконструированы на основе стероидов, универсальных биорегуляторов биологических процессов обмена веществ, роста, полового развития человека. Между тем, такие соединения имеют значительный потенциал в биологических исследованиях, поскольку могут расширить понимание механизмов гормональной регуляции.

III. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Флуоресцентная визуализация представляет собой современный инструмент биомедицинских исследований, применяющийся для обнаружения молекул, структур и физиологических процессов в живых клетках и тканях. Она лежит в основе методов конфокальной микроскопии и микроскопии сверхвысокого разрешения, позволяющих изучать биологические объекты нанометрового масштаба. Высокая специфичность, чувствительность и неинвазивность сделали флуоресцентную визуализацию одним из наиболее востребованных методов наблюдения за динамикой внутриклеточных ионов [106], изменением уровня pH [107], активностью ферментов, экспрессией генов и локализацией белков в режиме реального времени [108, 109].

Ключевыми характеристиками флуоресцентных маркеров, применяющихся в визуализации, являются высокое сродство и специфичность к целевой мишени. Флуоресцентные маркеры, как правило, состоят из сигнальной группы (флуорофор или хромофор) и “рецепторного модуля”, отвечающего за селективность накопления или связывания в клетке. Рациональный выбор “рецепторного модуля” и способа его связывания с ядром флуорофора являются ключевыми аспектами направленной разработки флуоресцентных маркеров. В качестве “рецепторного модуля” может выступать как функциональная группа чувствительная к параметрам внутриклеточной микросреды (например: чувствительные к изменению pH – амины, чувствительные к изменению вязкости – стерически нагруженные арильные заместители, чувствительные к изменению полярности – арильные остатки с донорно-акцепторными группами), так и биологически активное соединение, селективно связывающееся внутри клетки с целевым белком или рецептором (например: природные биорегуляторы и синтетические лекарственные препараты). Оптимизация оптических свойств современных красителей ориентирована на достижение помимо высокой селективности, также и высокой яркости, фотостабильности, биодоступности, низкой токсичности, а также на работу в диапазоне длин волн возбуждения и испускания, попадающем в биологически прозрачное оптическое окно.

Направленная разработка красителей для флуоресцентной биовизуализации осложняется тем фактом, что флуоресцентные молекулы часто демонстрируют значительные различия в поведении в условиях *in vitro* (в кювете) и *in vivo* (в клетке или организме)[110]. Параметры, оптимизированные в буферных растворах — такие как яркость, фотостабильность и квантовый выход, — могут существенным образом меняться во внутриклеточной среде. Это связано с рядом факторов: неоднородной клеточной вязкостью, изменением локального pH, наличием активных форм кислорода, а также неспецифическим связыванием с белками и органеллами, что приводит к увеличению фонового сигнала и снижению специфичности [111-115]. В связи с чем, развитие

области флуоресцентной визуализации сопряжено с накоплением массива данных о взаимосвязи структура красителя – свойства, а также поиском новых функциональных групп для модификации флуорофоров, перспективных для разработки флуоресцентных зондов с улучшенными характеристиками.

Целью настоящей работы стали синтез, исследование фотофизических свойств и оценка перспективности использования для биовизуализации новых производных 4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-с-индацена (BODIPY) **I-III**, несущих в качестве “рецепторного модуля” карбо- и гетероциклические остатки: pH-чувствительный амин макроциклического строения – циклен (структура **I**), донорно/акцепторно-замещенные 1,3,4-тиадиазолы и 1,3-бензазолы (структура **II**), а также природный нейростероид - аллопрегнанонон (структура **III**) (Рис. 1).

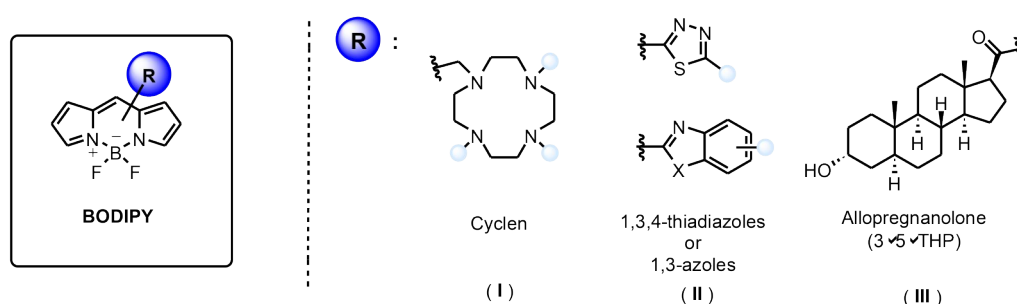


Рисунок 1. Производные BODIPY с карбо- и гетероциклическими фрагментами.

Выбор BODIPY в качестве флуорофора был обусловлен тем, что красители этого ряда, как правило, обладают рядом важных с точки зрения биовизуализации свойств. А именно, они демонстрируют высокие значения молярного коэффициента экстинкции и квантового выхода, что обеспечивает яркую флуоресценцию даже при низких концентрациях. Кроме того, в ряду BODIPY за счёт варьирования функциональных заместителей можно тонко настраивать спектральные характеристики красителей (сдвигать максимумы поглощения и испускания в длинноволновую область), липофильность, селективность и биосовместимость. Что в совокупности, делает BODIPY удобной платформой для создания флуоресцентных красителей, свойства которых *in vitro* (в кювете), успешно воспроизводятся в живых системах *in vivo*.

Выбор в качестве “рецепторного модуля” для модификации флуорофорного ядра BODIPY - циклена (структура **I**), функционализированных 1,3,4-тиадиазолов и бензаннелированных 1,3-азолов (структура **II**), аллопрегнанонона (структура **III**), был направлен на достижение чувствительности к микропараметрам внутриклеточной среды и таргетной доставки молекул красителя в экспериментах на клетках. Подробнее критерии выбора функциональных групп рассматриваются далее в начале каждого раздела главы «Обсуждение результатов».

В первой части работы представлены результаты разработки и исследования первых АІЕ-активных цикленовых производных BODIPY. Продемонстрирована перспективность их использования в качестве флуоресцентных красителей для селективной визуализации лизосом в клетках HeLa.

Во второй части работы приведены результаты по синтезу и систематическому изучению фотофизических свойств впервые синтезированных C2/C6-производных BODIPY, модифицированных 1,3,4-тиадиазольными и бензаннелированными 1,3-азольными заместителями.

В третьей части работы обсуждается синтез, биологическая активность и применение для визуализации нейронов в срезах тканей головного мозга ранее неизвестного производного аллопрегнанолонa меченного флуорофором BODIPY.

Нумерация рисунков, схем и таблиц в настоящей главе является сквозной и не связана с нумерацией, принятой в главе «Обзор литературы».

III.1. AIE-активные цикленовые производные BODIPY

Класс красителей BODIPY характеризуются интенсивным поглощением и флуоресценцией в видимой области спектра, при этом квантовые выходы флуоресценции часто приближаются к единице в разбавленных растворах. Однако из-за небольших стоксовых сдвигов и планарной π -сопряжённой структуры, которая способствует образованию агрегатов посредством π - π -стекинга и водородных связей, большинство красителей ряда BODIPY не флуоресцируют в концентрированных растворах и в твёрдом состоянии.

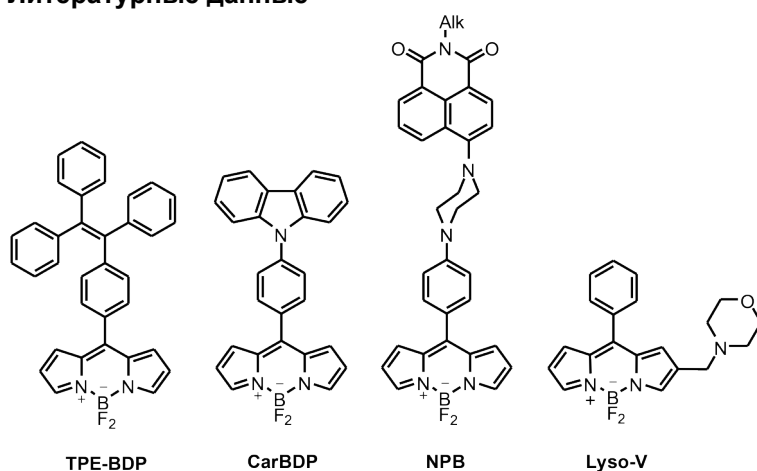
Эффект агрегационно-индуцированной эмиссии (AIE) может быть использован для преодоления тушения люминесценции, вызванной агрегацией молекул BODIPY [116, 117]. Красители BODIPY, обладающие AIE эффектом, обычно слабо излучают в разбавленных органических растворителях, но демонстрируют увеличение интенсивности излучения при агрегации в присутствии воды или в твёрдом состоянии. Механизмы AIE для красителей BODIPY в настоящий момент активно исследуются, и, преимущественно, разгорание флуоресценции при агрегации BODIPY рассматривается как результат ограничения внутримолекулярного движения (RIM) или J -агрегации [118].

Благодаря своим исключительным оптическим свойствам, AIE-активные красители на основе BODIPY обладают большим потенциалом в качестве детекторов изменения микропараметров среды в контексте биовизуализации [119]. Эффективность фотосенсибилизации и фототермического преобразования AIE-генов на основе BODIPY расширяет область применения в диагностике опухолей и терапии с визуальным контролем, такие как фотодинамическая терапия и фототермическая терапия [120-122]. Кроме того, в последние годы они зарекомендовали себя, как красители для маркировки клеточных органелл, в том числе лизосом [123, 124].

Дисфункция лизосом обычно приводит к развитию различных заболеваний человека, включая нейродегенеративные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, лизосомальные болезни накопления и так далее [125]. Мониторинг и отслеживание в реальном времени динамических изменений лизосом имеют большое значение для диагностики и лечения этих заболеваний. Наличие характерной для лизосом кислой среды в диапазоне pH от 3.8 до 5.5 обеспечивает преимущественное накопление молекул со значениями pKa между 4 и 6 внутри этих органелл. В качестве лизосомотропных агентов чаще всего выступают липофильные амины (такие как морфолин), проникающие внутрь органелл путём пассивной диффузии или активного транспорта [25]. Хотя амино-производные BODIPY-красители хорошо известны и применяются для визуализации лизосом [24], в литературе до сих пор лишь для небольшой части из них

известен АЕ эффект [25]. В частности, одними из наилучших характеристик среди известных АЕ-активных BODIPY-производных, нацеленные на лизосомы, обладают красители **CarBDP** (Xue et al. [33]) и **NPB** (Pandey et al. [126]) (Рис. 2). Большинство известных BODIPY АЕгенов обладают рядом недостатков, включая низкие квантовые выходы флуоресценции (Φ_{em}) в агрегированном состоянии, склонность к выпадению в осадок, а также нелинейный отклик на изменения параметров среды. В связи с чем, сохраняется высокий интерес к разработке новых структурных мотивов для BODIPY-красителей, которые сочетали бы эффект АЕ с улучшенными фотофизическими свойствами и возможностью эффективной визуализации лизосом.

Литературные данные



Целевые структуры

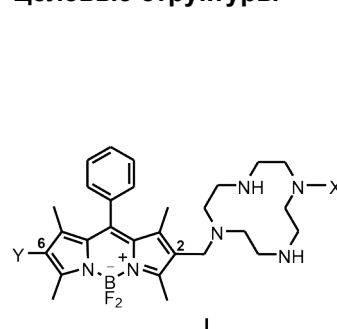


Рисунок 2. Литературные примеры АЕ-активных производных BODIPY и целевые структуры.

Для достижения АЕ-эффекта в ряду BODIPY, как правило, используется введение в каркас красителя объёмных “пропеллеро-образных” заместителей (АЕ-люминесцентного элемента — тетрафенилэтилена), влияющих на планарность π -системы BODIPY (Рис. 2) [116, 117, 123, 124]. Относительно недавно, Л. Ван и соавторы, а также Х. Ван и соавторы [127-129] показали, что введение во второе положение ядра BODIPY через метиленовый мостик относительно небольшого аминного заместителя, такого как морфолин (структура **Lyso-V**), провоцирует образование наноразмерных агрегатов излучающих в вязких и водных средах (Рис. 2).

Отталкиваясь от литературных данных, мы предположили, что АЕ-активными красителями с перспективой применения для внутриклеточной маркировки лизосом могут оказаться замещённые по 2- и 6-му положениям ядра BODIPY через метиленовые мостики цикленовые производные **I**, неописанные ранее в литературе (Рис. 2). Выбор циклена, в качестве “рецепторного модуля” среди аминов различного строения, был обусловлен следующими

факторами: 1) высокая водорастворимость циклена (34 мг/мл) была способна обеспечить растворимость целевых BODIPY производных **I** в средах с высоким содержанием воды; 2) четырех ступенчатое протонирование аминогрупп макроцикла могло наделять pH-чувствительностью красители **I** в широком интервале значений кислотности и основности среды (от 2 до 11); 3) снижение конформационной подвижности цикленового фрагмента при протонировании и комплексообразовании с катионами металлов могло способствовать агрегации красителей **I** в водных (pH ~ 7) и биологических средах.

III.1.1. Синтез цикленовых производных BODIPY

На первом этапе работы мы обратились к синтезу целевых производных BODIPY замещённых по 2- и 6-положениям цикленовыми фрагментами через метиленовые мостики. В качестве подхода для получения аза-макроциклическими производных BODIPY (AM-BODIPY) было предложено использовать реакцию восстановительного аминирования 2-моно и 2,6-бисформил-BODIPY **I** цикленами **II**, способную обеспечить получение широкого структурного ряда красителей, в том числе симметричного, несимметричного, линейного, циклического, димерного и полимерного строения за счёт варьирования соотношения реагентов **I/II** и заместителей при атомах азота макроцикла **II** (Рис. 3).

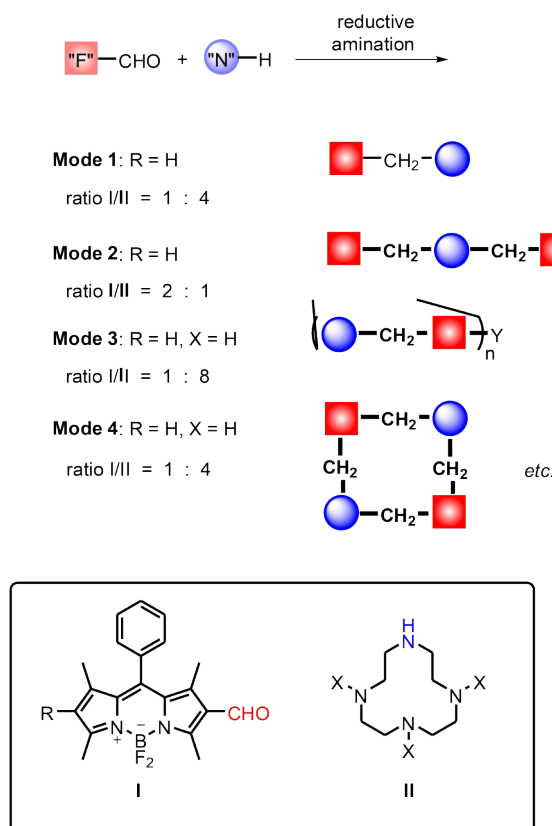


Рисунок 3. Восстановительное аминирование, как стратегия синтеза аза-макроциклических производных BODIPY.

Отметим, что до нашей работы восстановительное аминирование в синтезе азамacroциклических производных не использовалось. Известные методы введения азамacroциклических остатков в ядро BODIPY включают реакции нуклеофильного замещения хлор- [130-132] производных BODIPY, азид-алкиновое циклоприсоединение с участием азидзамещенных BODIPY и разнообразные реакции amino-содержащих BODIPY [133-135].

Оптимизация восстановительного аминирования была проведена с использованием в качестве модельной реакции конденсации 2-формил-BODIPY **1** и циклена (**3**) (Таблица 1). Варьирование параметров реакции включало перебор восстановителей (NaBH_4 , $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, NaBH_3CN), соотношений реагентов, кислотных добавок (AcOH), температурных режимов (rt – $65\text{ }^\circ\text{C}$) и растворителей (2,2,2-трифторэтанол, 1,2-дихлорэтан, ТГФ, ДМФА, MeOH). Было показано, что принципиальным условием для образования целевых продуктов восстановительного аминирования **5a** и **6** является присутствие избытка уксусной кислоты в реакционной смеси (Таблица 1, строки 5-10). Предположительно кислая среда, не только активирует альдегидную группу, но и нейтрализует высокоосновные центры циклена. Наилучший результат был достигнут при проведении реакции с четырехкратным избытком циклена в присутствии 5.6 экв. триацетоксиборгидрида и 8.0 экв. уксусной кислоты в дихлорэтано при комнатной температуре (Таблица 1, строка 8). Полная конверсия исходного альдегида **1** была достигнута за 24 часа, в результате чего с выходами 50% и 20% были выделены продукты моно- и бис-замещения циклена флуорофором BODIPY **5a** и **6**.

Таблица 1. Оптимизация условий реакции.

№	Циклен (3), экв.	[H], экв.	Растворитель	T, °C	Время реакции, h	Выход 5a , %	Выход 6 , %
без добавки AcOH							
1	1.0	NaBH_4 1.4 экв.	2,2,2-трифторэтанол	45	2	-	-
2	1.0	$\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ 1.4 экв.	2,2,2-трифторэтанол	45	2	-	-

3	0.5	NaBH(OAc) ₃ 1.4 экв.	1,2-дихлорэтан	Rt	24	-	-
4	5	NaBH(OAc) ₃ 1.4 экв.	1,2-дихлорэтан	Rt	24	-	-
с добавкой AcOH							
5	1	NaBH(OAc) ₃ 1.4 экв.	ТГФ	Rt	24	7 ^b	-
6	1	NaBH(OAc) ₃ 1.4 экв.	ДМФА	Rt	24	11 ^b	-
7	1	NaBH(OAc) ₃ 1.4 экв.	1,2-дихлорэтан	Rt	24	31 ^b	-
8	4	NaBH(OAc) ₃ 5.6 экв.	1,2-дихлорэтан	Rt	24	50 ^c	20 ^c
9	4	NaBH ₃ CN 2.0 экв.	MeOH	65	16	25 ^b	-
10	4	NaBH ₃ CN 2.0 экв.	MeOH	65	4	42 ^b	-

^a Условия реакции: BODIPY **1** (50 мг, 0.14 ммоль, 1.0 экв.), циклен **3** (0.5 – 4.0 экв.), восстановитель (1.4 - 5.6 экв.), AcOH (пропорционально кол-ву циклена: циклен/AcOH, 1 : 2), растворитель (1.0 mL), в инертной атмосфере аргона, 20 - 65 °C, 2 - 24 h. ^b Выход определен методом аналитической ВЭЖХ. ^c Выход после хроматографической очистки.

С использованием отработанных условий путём восстановительного аминирования из 2(6)-формил производных BODIPY **1**, **2** и цикленов **3**, **4**, была синтезирована серия красителей AM-BODIPY, включающая линейные состава (циклен)_{1+n}(BODIPY)_{1+m} **5a-b**, **6**, **8a-d**, а также макроцикл **9** (Схема 1). *N*-замещенный продукт **5b** был получен из 1,4,7-трис(*трет*-бутоксикарбонилметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекана (**4**) с выходом 5%, против 50% для незамещенного аналога **5a**. Низкий выход продукта **5b** (5%) был обусловлен низкой конверсией стерически нагруженного исходного нуклеофила **4** (три-*трет*-бутил 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7-триацетат). Реакцией циклена (**3**) с двукратным избытком 2-формил-BODIPY **1** с выходом 14% был получен продукт бис-замещения **6**. Было показано, что побочным продуктом снижающим выход целевых AM-BODIPY является спирт **7**, образующийся в результате восстановления формильной группы в BODIPY **1**. Вовлечение в реакцию с увеличенным вдвое избытком реагентов (циклен (**3**), NaBH(OAc)₃, AcOH) 2,6-бисформил-BODIPY **2** позволило получить продукт бис-цикленовое производное **8a** и линейные димеры **8b-d** с концевыми группами (циклен, CH₂OH и H), выделенные из реакционной смеси продуктов **8(m)** методом препаративной ВЭЖХ. Дополнительно, были отработаны условия получения макроцикла **9**, который был выделен с выходом 10% в реакции 2,6-бис-формил-BODIPY **2** с 4 экв. циклена (**3**) в присутствии 5.6 экв. NaBH(OAc)₃ и 8 экв. уксусной кислоты при порционном добавлении восстановителя при комнатной температуре.

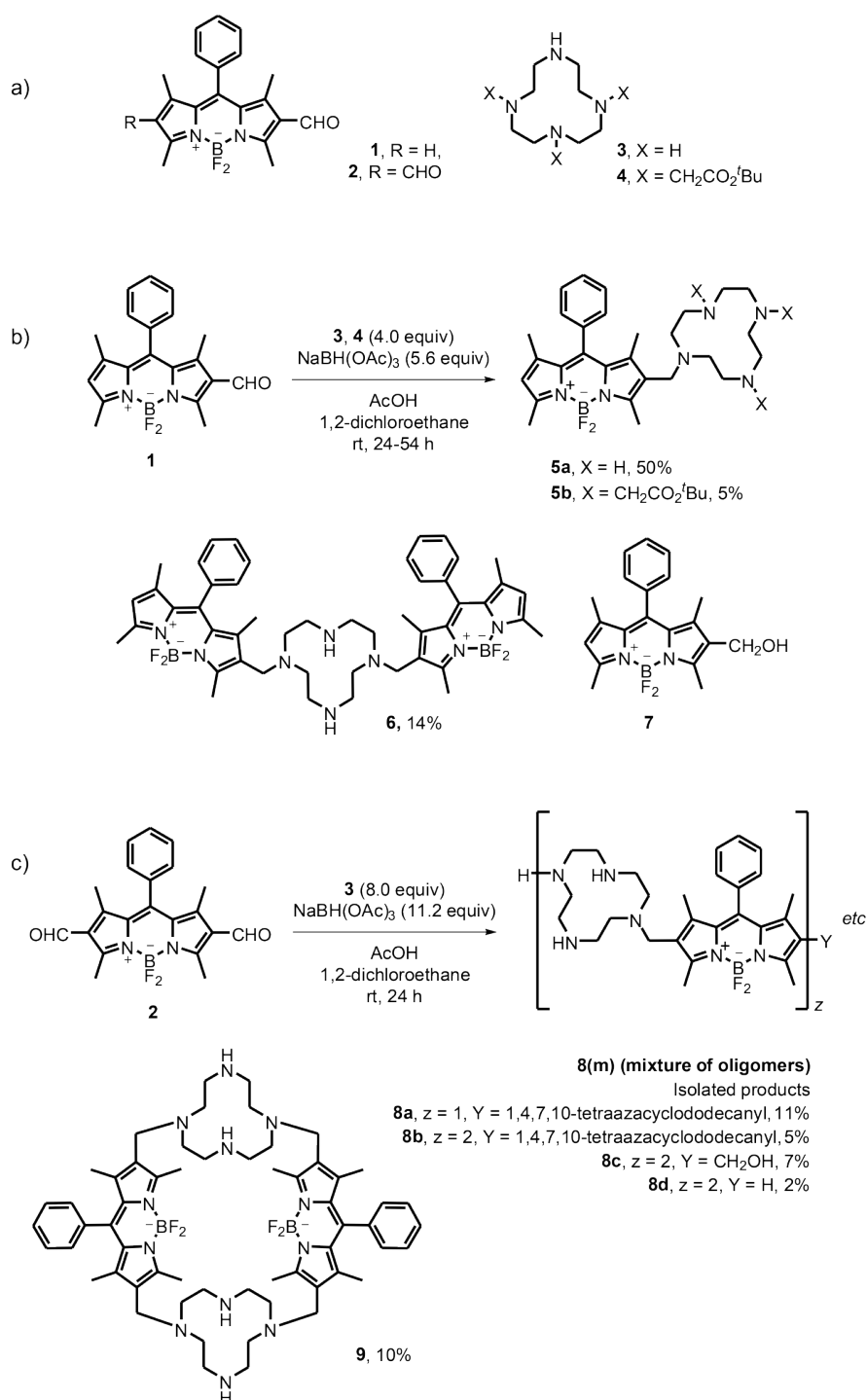


Схема 1. а) Структуры 2(6)-формил-BODIPY **1**, **2** и аза-макроциклов **3**, **4**. б) Синтез (AM)₁(BODIPY)₁ **5a**, **с** и (AM)₁(BODIPY)₂ **6**. в) Получение смеси олигомеров **8(m)** с последующем выделением индивидуальных химических структур: (AM)₂(BODIPY)₁ **8a**; линейных димеров (AM)_{1+n}(BODIPY)_{1+m} **8b–d** и макроцикла **9**.

Низкие выходы продуктов **8** и **9** были обусловлены образованием побочных продуктов, осложнявших их получение в аналитически чистом виде. Все соединения были выделены с помощью препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием в

качестве элюента систему 0.1% водного раствора трифторуксусной кислоты (ТФУК) и ацетонитрила. AM-BODIPY **5a**, **b**, **6**, **8a-d** и **9** полученные в виде трифторацетатов были охарактеризованы с применением ^1H , ^{13}C , ^{11}B и ^{19}F ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS).

В спектрах ^1H ЯМР всех исследуемых соединений, за исключением *N*-замещённого производного **5b**, характеристичным являлся синглет метиленовых протонов линкера ($-\text{CH}_2-$) в области 3.62–3.59 м.д., связывающего флуорофор BODIPY с азамacroциклическим фрагментом. Для всех соединений наблюдались уширенные сигналы в диапазоне 3.30–2.65 м.д., соответствующие протонам метиленовых групп $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}-$ макроциклического лиганда. Для симметрично-замещённых производных **6** и **9** в данной области регистрировались только два сигнала, что подтверждало их 1,7-бисзамещение. Для соединений **5a,b**, **6** и **8d** характеристичным сигналом являлся синглет протона в 6-м положении ядра BODIPY в области 6.27–6.13 м.д. В спектрах соединений **7** и **8c** характеристичным являлся синглет гидроксиметильной группы ($-\text{CH}_2-\text{OH}$) в области 4.42–4.38 м.д.

В спектрах ^{13}C ЯМР в области 55–40 м.д. наблюдались слабоинтенсивные и уширенные сигналы атомов углерода, непосредственно связанных с атомами азота макроцикла ($\alpha\text{-CH}_2$ -группы), что было связано с быстрой квадрупольной релаксацией ядер ^{14}N . Для солей соединений **5a**, **8a**, **8b**, **8c** наблюдались характеристичные сигналы трифторуксусного противоиона: кватер в области 117.91 м.д. и кватер в области 162.54 м.д. Кроме того, для олигомерных структур **8b,8c** и циклического производного **9** не наблюдались сигналы четвертичных ароматических атомов углерода, что объясняется наличием множественных конформаций в растворе, приводящих к уширению сигналов ниже уровня детектирования.

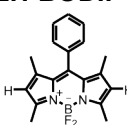
В спектрах ^{19}F ЯМР для соединений **5a,b,6,7,8a,b** наблюдался характеристичный для BODIPY системы кватер BF_2 -группы в области (-)146.6 – (-)145.9. В случае более олигомерных структур **8c**, **8d**, и макроцикла **9** наблюдался мультиплет, что было обусловлено наложением сигналов от нескольких борфторидных групп.

III.1.2. Фотофизические свойства цикленовых производных BODIPY

Синтезированные AM-BODIPY **5a-b**, **6**, **8a-c** и **9** были исследованы с помощью комплекса фотофизических методов. Для выявления АЕ-активных соединений исследования методами УФ и флуоресцентной спектроскопии проводились в трёх средах: ацетонитриле, фосфатном буфере (PBS, pH = 7.4) и в воде. В качестве спектральных параметров, значимых с точки зрения разработки флуоресцентных красителей для биовизуализации, рассматривались: максимумы поглощения (λ_{abs}), максимумы испускания (λ_{em}), коэффициенты экстинкции (ϵ_{abs}), квантовые

выходы флуоресценции (Φ_{em}) и Стоксовых сдвигов. Полученные обобщённые данные представлены в Таблице 2. В качестве вещества сравнения в рамках оценки влияния цикленовых остатков на фотофизические свойства ядра BODIPY был использован 1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен (**2H-BODIPY**, Таблица 2, строка 1).

Таблица 2. Фотофизические свойства AM-BODIPY в ацетонитриле и водных растворах. ^[a]

№	Соед. ^[b]	Растворитель	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$, нм	ϵ_{abs} [10 ⁴ моль ⁻¹ л см ⁻¹]	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$, нм	Стоксов сдвиг [см ⁻¹]	Φ_{em} ^[c] [%]
1 ^[d]	2H-BODIPY 	MeCN	497	4.8	511	551	52
		PBS	-	-	-	-	-
2	5a	MeCN	504	7.3	516	461	6
		PBS	504	6.2	513	348	56
		H ₂ O	504	-	513	348	60
3	5b	MeCN	498	7.8	512	549	40
		PBS ^[e]	498	3.9	512	549	50
4	6	MeCN	504	10.5	517	499	11
		PBS	507	4.5	511	163	7
5	8a	MeCN	510	9.5	524	524	3
		PBS	508	7.4	520	455	46
		H ₂ O	508	-	520	455	49
6	8b	MeCN	509	10.3	519	379	10
		PBS	509	9.6	519	379	11
7	8c	MeCN	509	14.5	523	526	7
		PBS	507	8.6	517	381	12
8	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] Данные для 1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифторборадиаиндацена (**2H-BODIPY**) взяты из литературного источника [136]. ^[e] Спектры регистрировали с добавлением 20% MeCN.

Было показано, что спектры поглощения красителей на основе циклена **5a**, **6** и **8a–c** в ацетонитриле и буферных растворах представляют собой спектра выраженный пик поглощения, который соответствует π – π^* переходу, с максимумом поглощения ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$) при 504–510 нм. AM-BODIPY **5b** полученный из *N*-замещенного циклена, характеризовался полосой поглощения при 498 нм (Таблица 2, строка 3), совпадающей с $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ **2H-BODIPY** (Таблица 2, строка 1), что может

свидетельствовать об отсутствии значимого влияния *N*-замещенного аза-макроциклического фрагмента на электронные свойства красителя. Профиль поглощения макроцикла **9** был двухвершинным с максимумами при 487 нм и 504/505 нм (Таблица 2, строка 8). Раздвоение спектра поглощения соединения **9** можно объяснить экситонным взаимодействием между субъединицами BODIPY через пространство, которое усиливается за счёт образования конформационно жёсткой циклической структуры [137]. Полученные профили спектров поглощения и испускания растворов соединений **5a-b**, **6**, **8a-c** и **9** в ацетонитриле представлены на Рисунке 4.

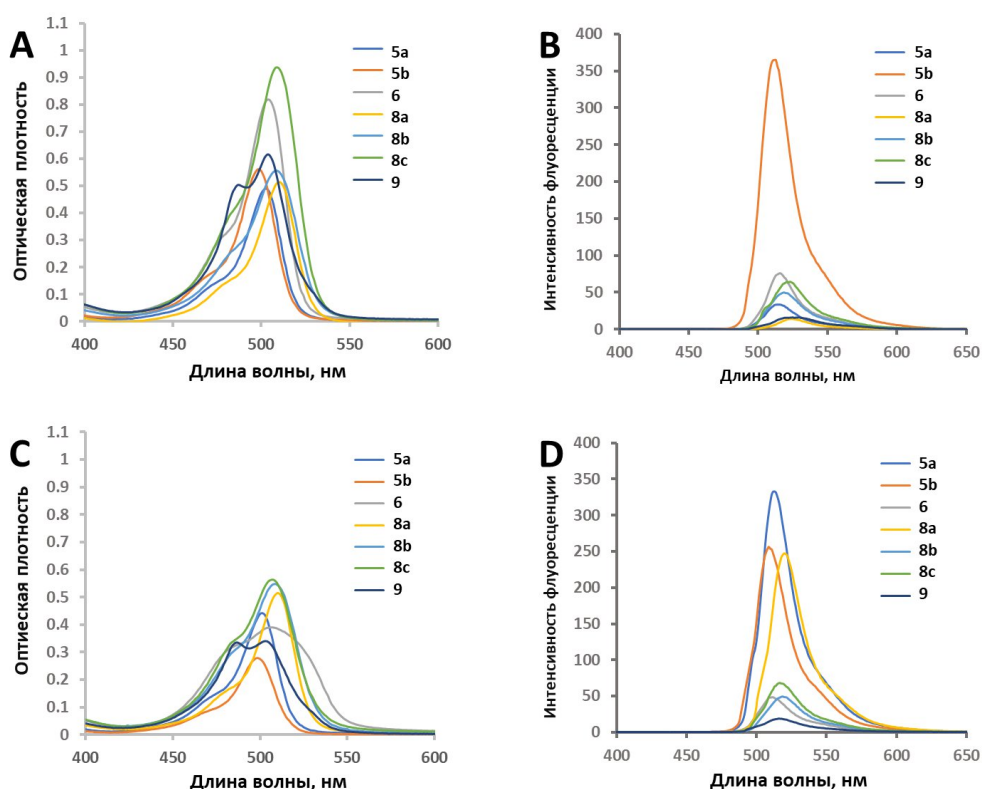


Рисунок 4. Спектры поглощения и испускания красителей АМ-BODIPY в MeCN (А и В). Спектры поглощения и испускания красителей АМ-BODIPY в водном буфере (С и D). ([**5a**] = 7 μM , [**5b**] = 7 μM ; [**6**] = 8 μM ; [**8a**] = 5.5 μM ; [**8b**] = 5.5 μM ; [**8c**] = 6.5 μM ; [**9**] = 7 μM для спектров поглощения, [**5a**] = 0.7 μM , [**5b**] = 0.7 μM ; [**6**] = 0.8 μM ; [**8a**] = 0.55 μM ; [**8b**] = 0.55 μM ; [**8c**] = 0.65 μM ; [**9**] = 0.7 μM для спектров испускания).

Коэффициенты экстинкции (ϵ_{abs}) АМ-BODIPY в ацетонитриле были выше, чем в водных растворах. При этом было найдено, что для линейных структур состава (циклен)_n(BODIPY)_m молярные коэффициенты хорошо коррелируют с соотношением *n/m*. Максимальное значение ϵ_{abs} , равное $14.5 \cdot 10^4 \text{ моль}^{-1} \text{ л см}^{-1}$ (MeCN), было зафиксировано для красителя (AM)₂(BODIPY)₂ **8c** с максимальным относительным содержанием хромофорной единицы (Таблица 2, строка 7).

В то время как для соединений **5a,b** и **8a,b** с соотношением фрагментов 1:1, 2:1, 3:2 значения ϵ_{abs} находятся в диапазоне от 7.3 до 10.3×10^4 моль⁻¹ л см⁻¹ в ацетонитриле и от $3,9$ до $6,2 \times 10^4$ моль⁻¹ л см⁻¹ в буферных растворах.

Было найдено, что соотношение АМ- и BODIPY-фрагментов в молекуле существенно влияет на флуоресцентные свойства АМ-BODIPY. Красители состава (АМ)₁(BODIPY)_{1+m} (где $m = 0,1$) **5a,b** и **6** демонстрировали максимумы испускания ($\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$) в области 511–517 нм, тогда как для соединений (АМ)_{1+n}(BODIPY)_{1+m} (где $n = 1,2$; $m = 1,2$) **8a–c** наблюдалось смещение $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ до 517–524 нм. Примечательно, что макроцикл **9** обладал наиболее длинноволновым максимумом испускания ($\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 530$ нм) в ряду АМ-BODIPY.

АМ-BODIPY **5a**, **6**, **8a–c** и **9**, содержащие NH-группы, слабо флуоресцировали в ацетонитриле; квантовые выходы флуоресценции (Φ_{em}) для них составили 3–11%. В то же время, N-замещённый АМ-BODIPY **5b** демонстрировал в ацетонитриле 40% Φ_{em} . Разница в квантовых выходах структурно близких соединений **5a** и **5b**, вероятнее всего, связана с возможностью протекания фотоиндуцированного переноса электрона (PET) между NH-группами циклена в **5a** и ядром BODIPY, приводящего к тушению флуоресценции последнего [138].

При переходе от ацетонитрильных к буферным растворам (PBS) мы сделали важное наблюдение, а именно, что флуоресценция красителей АМ-BODIPY **5a,b** и **8a–c**, усиливается (Таблица 2, строки 2,3 и 5-8). Исключение составил бис-BODIPY-замещённое цикленовое производное **6**, который является наиболее гидрофобным в ряду синтезированных АМ-BODIPY (Таблица 2, строка 4). Красители состава (АМ)₁(BODIPY)₁ (**5a**) и (АМ)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 2, строки 2,5), что исключает влияние ионов буфера на разгорание флуоресценции. Примечательно, что в водных растворах Φ_{em} красителей **5a** и **8a** были значительно выше, чем у известных лизосом-направленных BODIPY-зондов [24], в том числе AIE-активный NPB ($\Phi_{\text{em}} = 7\text{--}15\%$) [126].

Кроме того, было найдено, что соединения **5a** и **8a** обладают твердофазной люминесценцией.¹ Съёмку проводили для образцов, полученных способом медленного испарения низкоконтентрированных растворов (CH₂Cl₂ / MeCN, 10⁻⁵ М) на кварцевой подложке. В качестве характеристичных примеров на Рисунке 5 представлены спектры поглощения и испускания для соединений **5a** и **8a**. Данные для красителей **5b**, **6**, **8b,c** и **9** приведены в Приложении 1. Для всей серии АМ-BODIPY **5a-b**, **6**, **8a-c**, **9** наблюдались более широкие полосы

¹ Автор выражает благодарность д.х.н. С.Л. Селектор за помощь в проведении эксперимента.

в спектрах поглощения с более выраженным плечом при ~ 470 нм и батохромным сдвигом $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ на $\sim 4\text{--}11$ нм по сравнению со спектрами поглощения, зафиксированными в растворах. Также в спектрах плёнок наблюдается более выраженный батохромный сдвиг $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (на $15\text{--}42$ нм), при этом появляются дополнительные максимумы излучения 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.

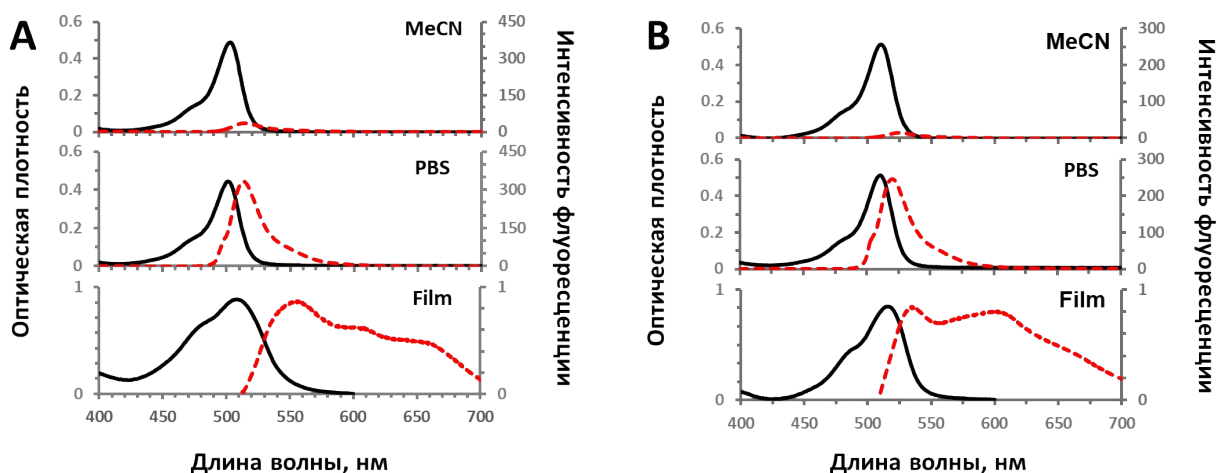


Рисунок 5. Спектры поглощения и испускания AM-BODIPY **5a** (A) и **8a** (B) в тонких плёнках и растворах ($[\mathbf{5a}] = 7 \mu\text{M}$; $[\mathbf{8a}] = 5.5 \mu\text{M}$ для поглощения, $[\mathbf{5a}] = 0.7 \mu\text{M}$; $[\mathbf{8a}] = 0.55 \mu\text{M}$ для эмиссии).

Поскольку в серии AM-BODIPY соединения **5a** и **8a** продемонстрировали наибольшее разгорание флуоресценции при переходе от ацетонитрильных растворов к водным, они были выбраны в качестве соединений-лидеров для дальнейших исследований. А именно, 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. 6). Было показано, что флуоресцирующие агрегаты $(\text{AM})_1(\text{BODIPY})_1$ **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. 6A,B; для водных растворов – Приложение 2). Раствор более гидрофильного $(\text{AM})_2(\text{BODIPY})_1$ **8a** оставался слабо флуоресцирующим ($F_{\text{em}} < 3\%$) вплоть до 40% объёмной доли воды, а максимальная интенсивность флуоресценции достигается при 100% (для PBS-растворов – Рис. 6C,D; для

водных растворов – Приложение 3). 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[116, 117] включая те, что предназначены для внутриклеточной маркировки лизосом (**CarBDP**: F_w 50–60% [33], **NPB**: F_w 70–99%[126]).

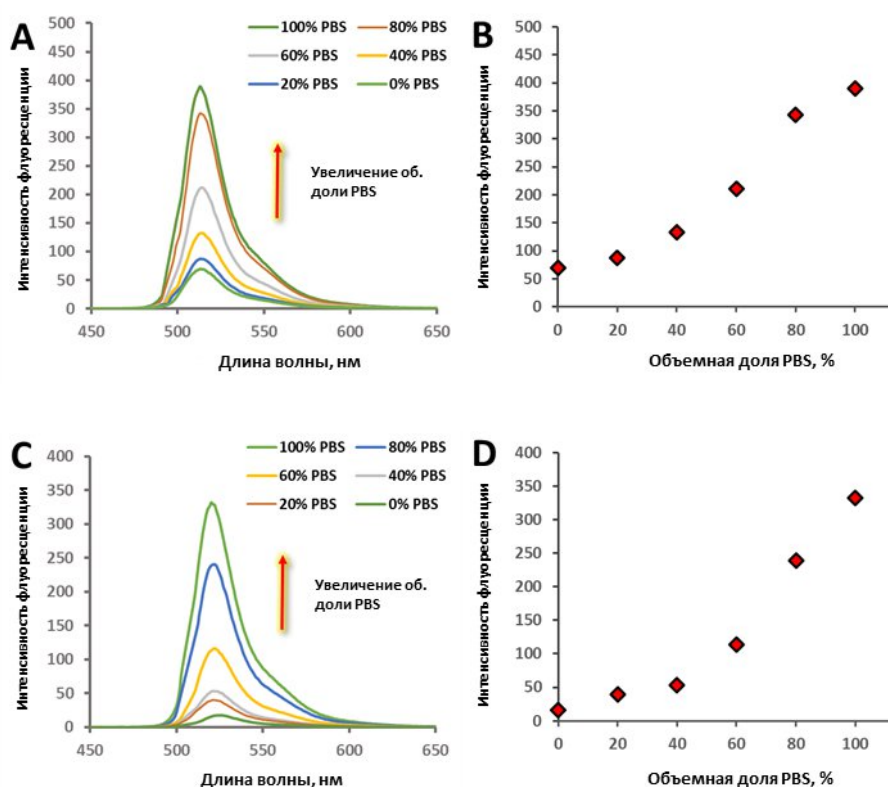


Рисунок 6. Спектры флуоресценции AM-BODIPY **5a** (A) и **8a** (C) ($[5a] = 0.7$ мкМ; $[8a] = 0.55$ мкМ) в смесях MeCN/PBS с различным содержанием воды. Соответствующие графики зависимости интенсивности флуоресценции от доли PBS (B и D).

Кроме того, было показано, что положение λ_{em}^{max} и его интенсивность в спектрах испускания водных растворов AM-BODIPY **5a** и **8a** зависят от концентрации красителей. При концентрациях 1.0×10^{-6} М λ_{em}^{max} были зафиксированы при 513 нм для красителя **5a** и 520 нм для красителя **8a** (Рис. 7). По мере увеличения концентрации красителей вплоть до 1.0×10^{-4} М наблюдалось батохромное (примерно, на 10 нм смещение) λ_{em}^{max} для обоих AM-BODIPY. Кроме того, интенсивность флуоресценции достигала своего максимального значения при концентрациях AM-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.

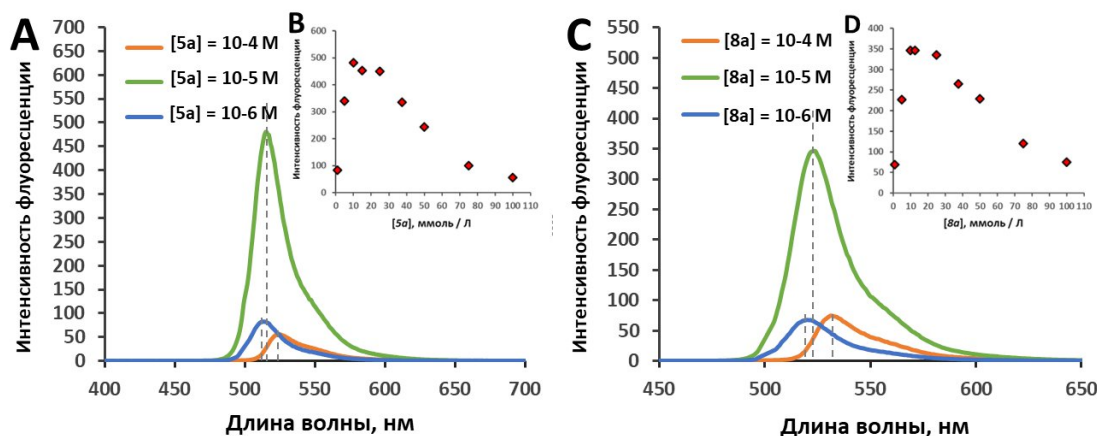


Рисунок 7. Спектры флуоресценции красителей AM-BODIPY **5a** (A, B) и **8a** (C, D) в буферных растворах с различной концентрацией. На вставках: соответствующие графики зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации красителя.

Гидродинамический диаметр агрегатов красителя **5a** в буферном растворе был определён с помощью метода динамического рассеяния света (ДРС)² и составил 72 нм (Рис. 8А, чёрная линия). Данные сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) показали почти сферические частицы со средним диаметром 56 нм (Рис. 8В). Гидродинамический диаметр агрегатов красителя **5a** превышал размер частиц, измеренный СЭМ, вероятно, из-за включения в водных растворах сольватированных молекул воды в состав агрегатов. Схожесть распределения размеров, полученных методами SEM и DLS, указывает на то, что крупные частицы присутствовали в растворе, а не образовались в процессе подготовки образца. Образование наночастиц, вероятно, обусловлено гидрофобными взаимодействиями, а не электростатическими силами, так как частицы имеют нулевой дзета-потенциал. Данные СЭМ для красителя **8a** приведены в Приложении 4. В СЭМ помимо сферических частиц также наблюдались наноразмерные сrostки. Отклонение формы корреляционной функции от монотонного спада (ДРС) свидетельствовало о нарушении монодисперсности системы.

² Автор выражает благодарность к.х.н. Н.А. Саполетовой и к.х.н. С.Е. Кушнир за помощь в проведении ДРС- и СЭМ- экспериментов и анализ результатов.

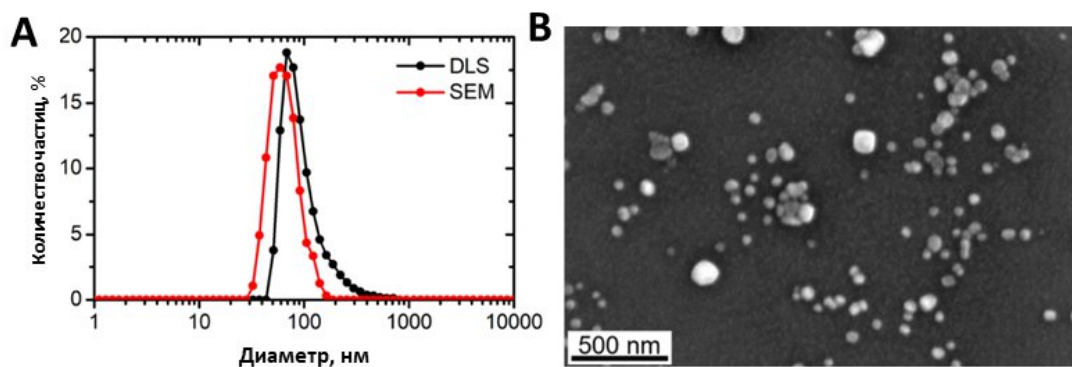


Рисунок 8. Морфология агрегатов красителя **5a**. (А) Распределение частиц по размерам в PBS растворе (10 μM), основанное на данных динамического рассеяния света (ДРС) и серии изображений сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Данные ДРС представляют собой гидродинамический диаметр, а данные СЭМ — диаметр окружности той же площади. (В) Изображение частиц на кремнёвой подложке, полученное с помощью СЭМ.

Предположение о взаимном расположении молекул красителя **5a** в агрегатах (Рис. 9) было сделано на основе квантово-химических расчётов в рамках теории TD-DFT с использованием функционала ωB97XD и базисного набора Def2-SVP.³ Расчёты проводились для димерных систем **(5a)₂-A1** и **(5a)₂-A2**, представляющих собой пары молекул **5a**, сближенных таким образом, что в первом случае цикленовый фрагмент одной из молекул находится между флуорофорными фрагментами BODIPY красителя, а во втором случае флуорофорные фрагменты расположены в непосредственной близости друг к другу. Результаты первого возбуждённого синглетного состояния расчётов показали, что **(5a)₂-A1** имеет $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 450$ нм (сила осциллятора $f = 0.3754$), а **(5a)₂-A2** имеет $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 573$ нм (сила осциллятора $f = 0.0003$). Второе возбужденное синглетное состояние для **(5a)₂-A2** демонстрировало интенсивное поглощение с силой осциллятора $f = 1.0038$. Кроме того, было показано, что первое возбужденное состояние **(5a)₂-A1** представляет собой практически чистый переход ВЗМО $\rightarrow$ НСМО+1, причем ВЗМО в значительной степени локализована на фрагменте циклена. Основной вклад в наиболее интенсивный переход **(5a)₂-A2** также давал ВЗМО $\rightarrow$ НСМО+1 переход, где ВЗМО является π -орбиталью, сосредоточенной на ядрах BODIPY. По совокупности, можно предполагать, что процесс фотоиндуцированного переноса электрона (ПЕТ) для **(5a)₂-A2** оказывает меньшее влияние на его люминесцентные свойства по сравнению с **(5a)₂-A1**. Таким образом, мотив **(5a)₂-A2** является более предпочтительным для формирования высокофлуоресцентных агрегатов красителя **5a** по сравнению с конфигурацией **(5a)₂-A1**.

³ Автор выражает благодарность к.х.н. И.С. Голованову за любезно предоставленные результаты.

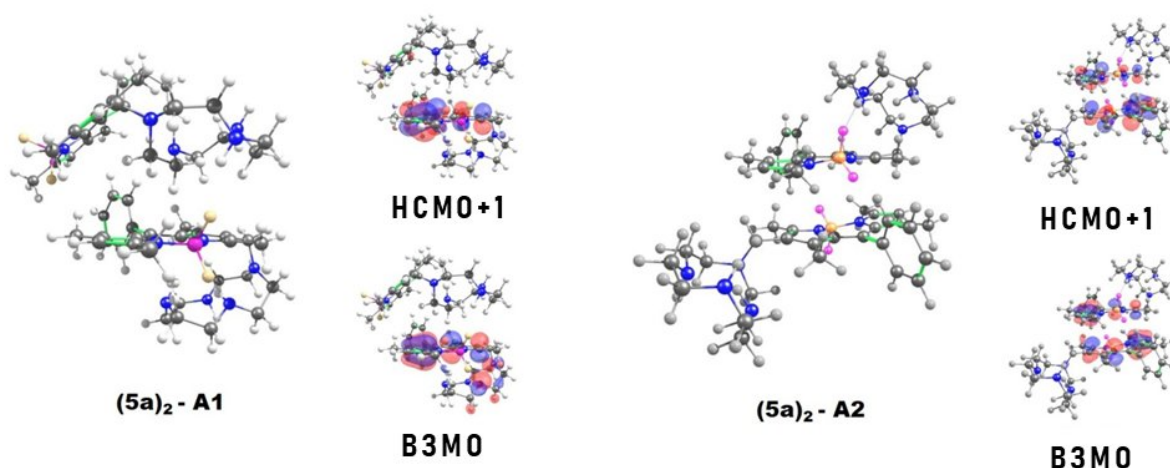


Рисунок 9. Оптимизированные геометрии и граничные молекулярные орбитали (ГМО) модельных систем **(5a)₂-A1** и **(5a)₂-A2**.

III.1.3. Флуоресцентная маркировка лизосом

На следующем этапе была проведена экспериментальная оценка перспективности использования производных AM-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 была проведена оценка влияния вязкости среды на спектры испускания красителей **5a** и **8a** (Рис. 10). Было обнаружено, что для соединения **5a** при увеличении доли глицерина в метаноле (F_g) свыше 60% флуоресценция усиливается в 2.5 раза, в то время как, для соединения **8a** максимальное разгорание в 2.0 раза было зафиксировано в чистом глицерине. Постепенное повышение вязкости (η) от 4.8 ($F_g = 20\%$) до 905 ($F_g = 100\%$) сП сопровождалось непрерывным ростом интенсивности флуоресцентного излучения растворов обоих соединений. Обнаруженные эффекты, вероятнее всего, обусловлены RIM (ограничением внутримолекулярного движения) мезо-фенильного и цикленовых фрагментов в результате агрегации AM-BODIPY **5a** и **8a** [139]. Примечательно, что чувствительность **5a** и **8a** к F_g сопоставима с таковой для красителя NPВ ряда BODIPY, разработанного для внутриклеточной маркировки лизосом [126].

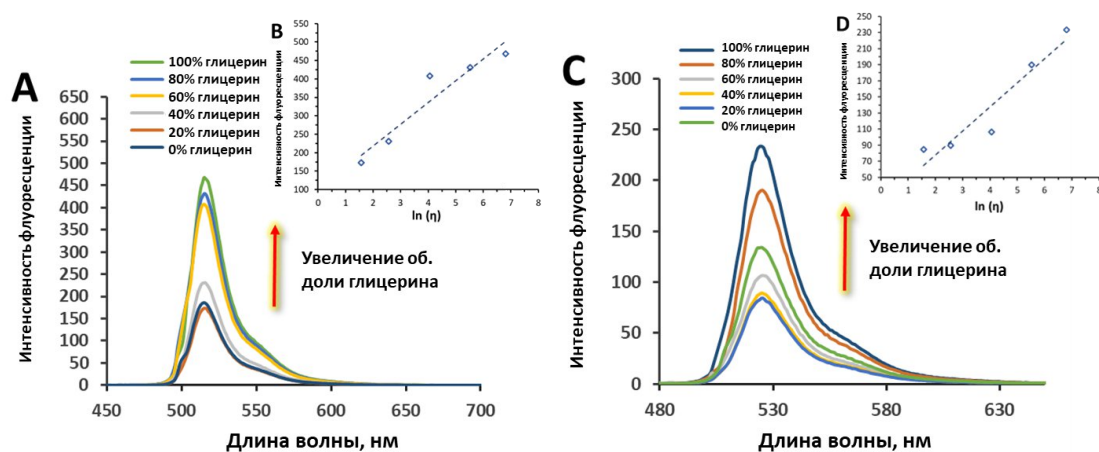


Рисунок 10. Спектры испускания красителей AM-BODIPY **5a** (A) и **8a** (B) ($[5a] = 0.7 \mu M$; $[8a] = 0.55 \mu M$) в метаноле с различным содержанием глицерина.

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. 11A). Кроме того, охлаждение растворов красителей AM-BODIPY **5a** и **8a** с 50 °C до 25 °C сопровождалось увеличением интенсивности флуоресценции также примерно в три раза (для **5a** — Рис. 11A, для **8a** — Рис. 11D). Диапазон температур был выбран так, чтобы охватить температурные требования протоколов биовизуализации. Между интенсивностью излучения и температурой была найдена линейная зависимость в диапазоне от 50 °C до 25 °C. Мы предполагаем, что зависимость интенсивности флуоресценции водных растворов красителей AM-BODIPY **5a** и **8a** от температуры связана с обратимым разрушением флуоресцентных наноразмерных агрегатов при нагревании. Так, для красителя **5a** была продемонстрирована возможность пятикратного нагревания/охлаждения, сопровождающегося тушением/разгоранием флуоресценции без существенных изменений в спектрах испускания (Рис. 11C). В случае соединения **8a** наблюдалось постепенное уменьшение интенсивности флуоресценции растворов по мере повторения циклов нагревания/охлаждения (Рис. 11F), что было связано с разложением красителя.

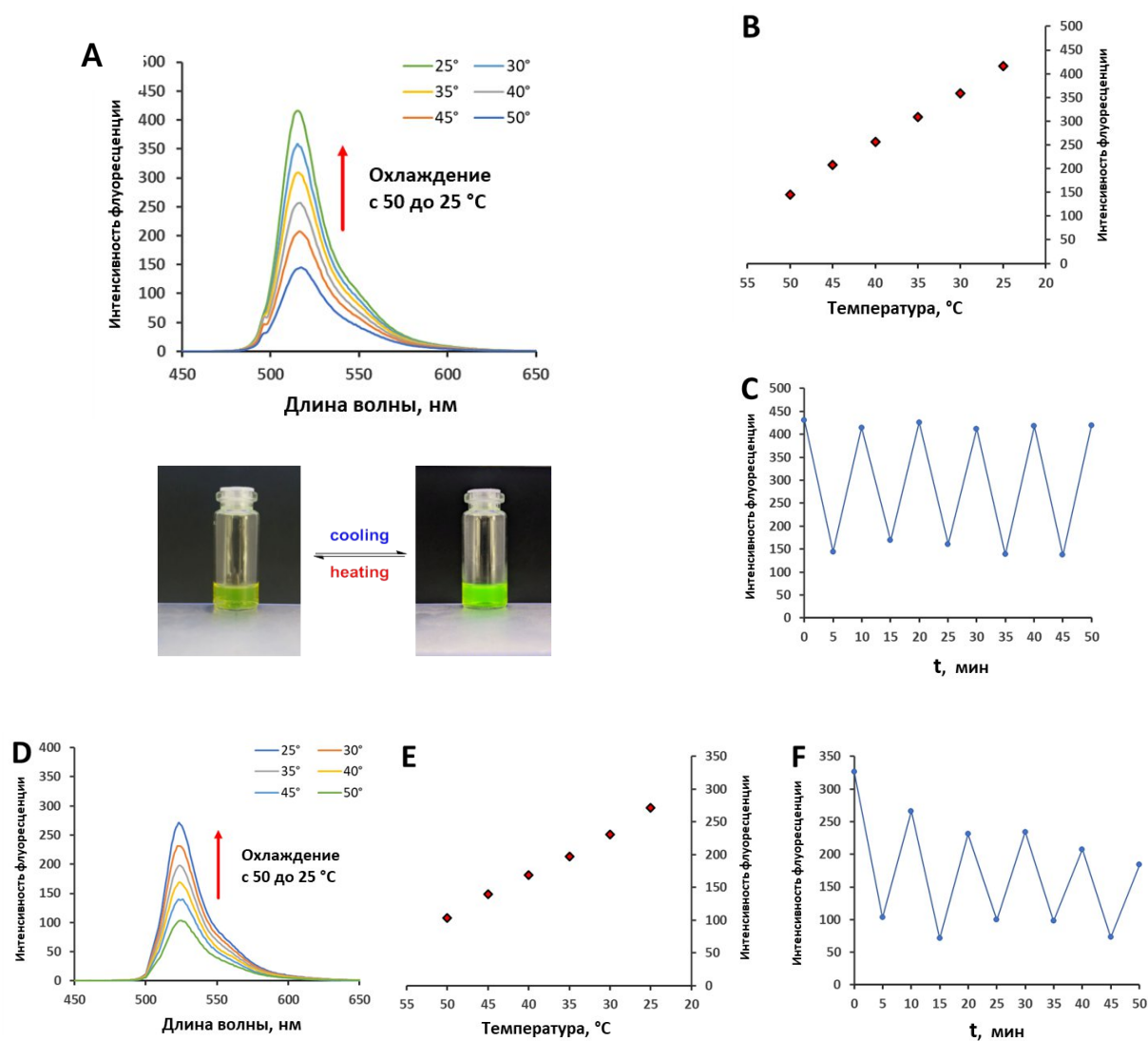


Рисунок 11. Спектры испускания соединений AM-BODIPY **5a** (7 μM) и **8a** (5.5 μM) в буферных растворах при разной температуре. (A, D) Спектры флуоресценции и фотографии растворов при 25 °C - 50 °C. (B, E) Кривые зависимости интенсивности $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ красителей от температуры растворов. (C, F) Тест на обратимость «тушения-разгорания» флуоресценции в пределах 5 циклов изменения температуры растворов от 25 °C до 50 °C.

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 (Рис. 12).

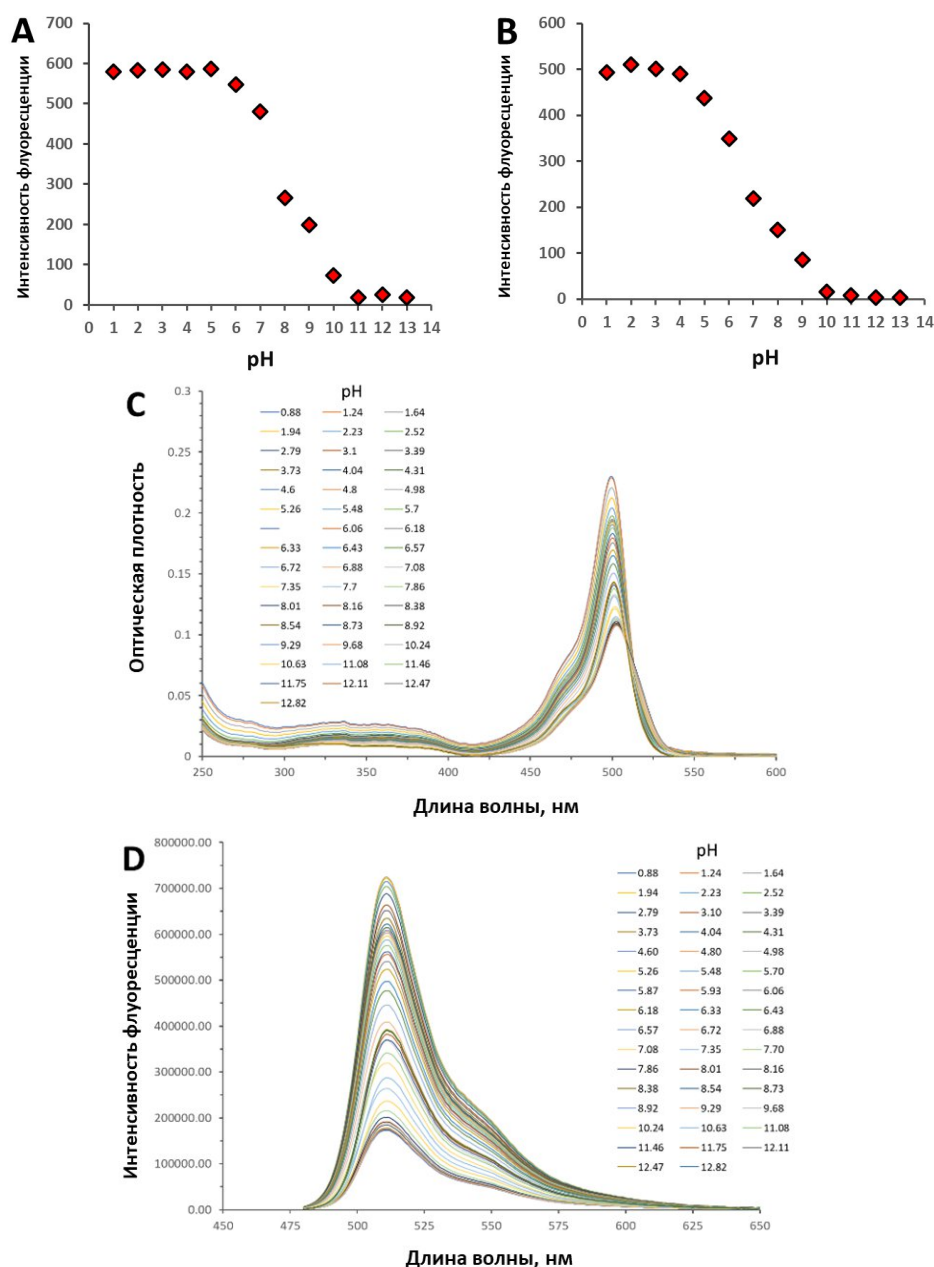


Рисунок 12. Графики зависимости интенсивности флуоресценции от уровня pH для AM-BODIPY **5a** (A) и **8a** (B) в водных растворах ($[\mathbf{5a}] = 7 \mu\text{M}$; $[\mathbf{8a}] = 5.5 \mu\text{M}$). (C) Спектрофотометрическое pH титрование **5a** ($[\mathbf{5a}]_{\text{tot}} = 3.45 \mu\text{M}$, $I = 0.1 \text{ M NaClO}_4$, pH = 0.88–12.82). (D) Флюорометрическое pH титрование **5a** ($[\mathbf{5a}]_{\text{tot}} = 3.45 \mu\text{M}$, $I = 0.1 \text{ M NaClO}_4$, $\lambda_{\text{ex}} = 475 \text{ nm}$, pH = 0.88 – 12.82).

В рамках сравнения с литературными аналогами, краситель ряда BODIPY **NPB**, разработанный для визуализации лизосом, чувствителен к изменению pH лишь в диапазоне 3.0–7.0 [126].

Для определения констант протонирования красителя **5a** было проведено pH-метрическое титрование.⁴ Полученные спектры спектрофотометрического и флюорометрического pH

⁴ Автор выражает благодарность к.х.н. А.С. Абелю за помощь в проведении фотометрического и флуоресцентного

титрований, наряду с кривыми титрования приведены на Рисунках 12С-D, а также в Приложении 5. Значения констант протонирования составили $pK_{a1} = 10.5687$, $pK_{a2} = 6.8103$ и $pK_{a3} = 3.1895$, что согласуется с литературными данными для монозамещенных производных циклена [140-144].

Последующий анализ литературных данных показал, что аминные фрагменты, соединённые с ядром BODIPY через метиленовый линкер, могут выступать в роли гасителей флуоресценции по *a*-PET и *d*-PET механизмам, что определяется в первую очередь расстоянием между атомом азота амина и π -системой хромофора [129, 145]. Фотоиндуцированный перенос электрона (PET) представляет собой фундаментальный процесс, при котором молекула, перешедшая в возбуждённое состояние после поглощения кванта света, вступает в реакцию переноса электрона. Этот механизм проявляется в двух основных формах: 1) окислительный перенос, при котором возбуждённая молекула принимает электрон от молекулы-донора (*a*-PET), и 2) восстановительный перенос, в ходе которого возбуждённая молекула сама выступает донором электрона для молекулы-акцептора (*d*-PET). Поскольку соединение **5a** имеет две исключительно высокие константы протонирования при pH близких к нейтральным оно должно существовать в виде частиц $[H_2(5a)]^{2+}$, в которых протоны локализованными на атомах азота **A** и **A'** цикленового фрагмента (Рис. 13). В сильнощелочной среде краситель **5a** переходит в непротонированную форму, в результате чего становится возможным эффективное тушение флуоресценции ядра BODIPY по механизму *a*-PET через сопряжения пар электронов атомов азота **A** и **B** циклена с π -системой хромофора. При снижении pH от 10 до 5 происходит поэтапное протонирование атомов **A, A'** и **B**, что приводит к устранению *a*-PET и разгоранию флуоресценции красителя. В сильнокислой среде для соединения **5a** может быть достигнуто полное протонирование всех атомов азота цикленового остатка, в том числе третичного атома **C**. В образующихся частицах состава $[H_4(5a)]^{4+}$, протонированный атом **C** может оттягивать электронную плотность ядра BODIPY, таким образом, вызывая гашение флуоресценции красителя по механизму *d*-PET [129]. Данная гипотеза, может объяснить экспериментально зафиксированное снижение интенсивности флуоресценции изученных цикленовых производных при $pH < 2$ (Рис. 12А,В).

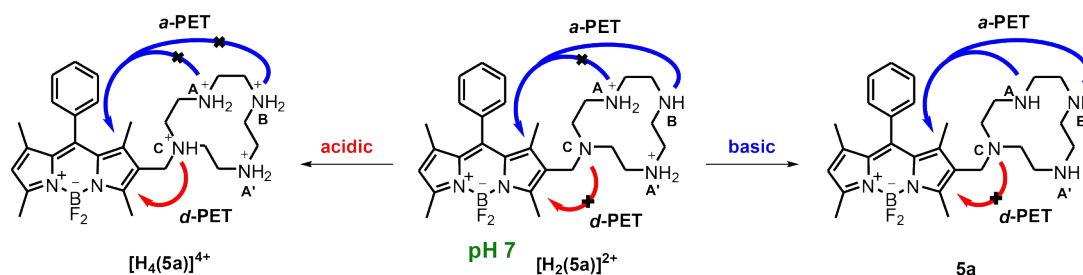
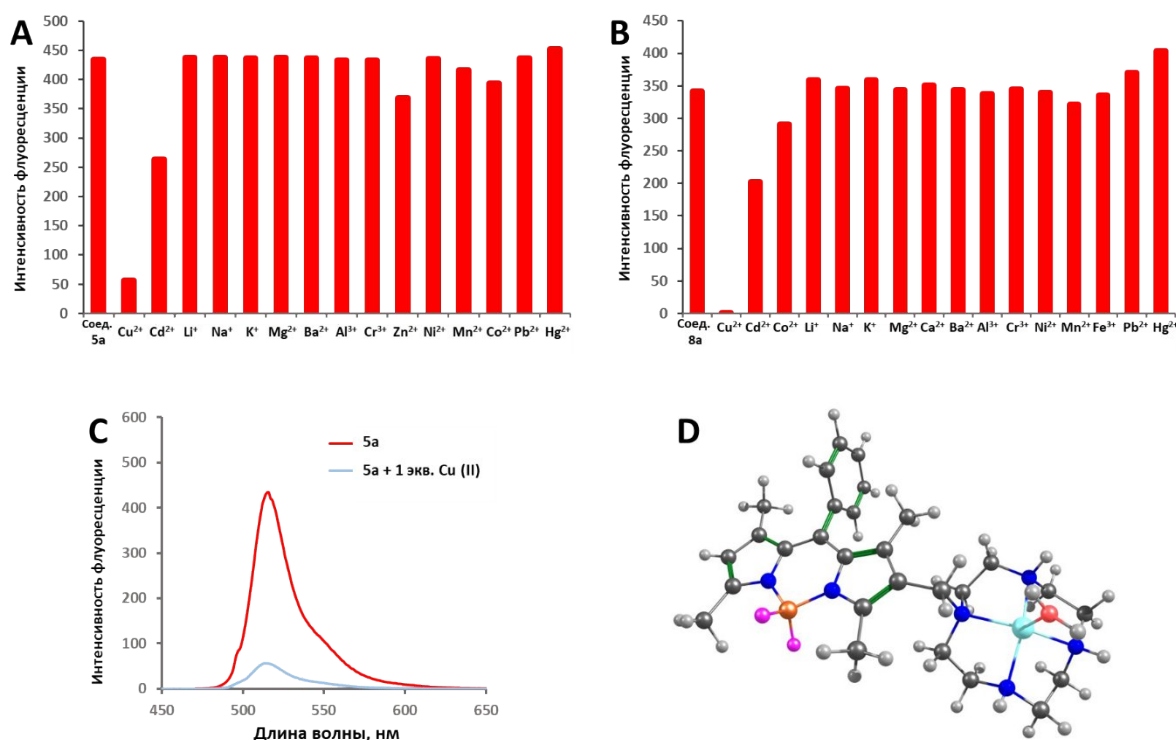


Рисунок 13. Предполагаемые механизмы гашения флуоресценции соединения **5a** при различных pH.

Дополнительно, была проведена оценка влияния катионов металлов на фотофизические свойства красителей **5a** и **8a** (Рис. 14). 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. 14А,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. 14А-С), вызванное, вероятнее всего, фотоиндуцированным окислительным переносом электронов от ядра BODIPY к иону металла [146]. Геометрически оптимизированная структура комплекса, образованного мономером красителя **5a** и катионом меди (II), представлена на Рисунке 14D.⁵



⁵ Автор выражает благодарность к.х.н. И.С. Голованову за любезно предоставленные данные по оптимизации геометрии комплекса меди (II) $[\text{Cu}(\mathbf{5a})]^{2+}$

Рисунок 14. Флуоресцентные отклики красителей АМ-BODIPY **5a** (А) **8a** и (В) на различные катионы металлов в водной среде. (С) Флуоресцентный отклик зонда **5a** (7 мкМ) при добавлении Cu^{2+} (7 мкМ) в буферных растворах, $\lambda_{\text{ex}} = 499$ нм. (D) Оптимизированная геометрия комплекса (метод меди (II) $[\text{Cu}(\mathbf{5a})]^{2+}$ DFT ZORA/ZORA-def2-SVP) в газовой фазе.

На следующем этапе работы была проведена оценка антипролиферативной активности АМ-BODIPY **5a** и **8a**. Оценку проводили с помощью МТТ-теста на клетках рака молочной железы MCF7. При длительном окрашивании (72 часа) соединение **5a** подавляло рост клеток с $\text{IC}_{50} = 5.6$ мкМ, тогда как **8a** не оказывало значительного влияния на пролиферацию или жизнеспособность раковых клеток даже в концентрации 50 мкМ. При кратковременной инкубации (менее 4 часов) антипролиферативный эффект красителя **5a** был невыраженным.

В связи с чем, для обоих АМ-BODIPY **5a** и **8a** была проведена серия экспериментов по флуоресцентному окрашиванию клеток MCF7.⁶ Было выявлено, что красители **5a** и **8a** имеют тенденцию к накоплению в клеточных органеллах (данные приведены в Приложении 6. Поскольку соединения **5a** и **8a** демонстрировали чувствительность к pH и вязкости среды — ключевым параметрам, используемым при разработке лизосом-специфичных меток, [25] мы предположили, что АМ-BODIPY **5a** и **8a** способны локализоваться в лизосомах. Последующие опыты выполняли на клетках HeLa, которые являются общепризнанной модельной системой для изучения лизосом [24].⁷ 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[147, 148]. Полученные изображения клеток HeLa, окрашенных АМ-BODIPY **5a**, **8a** и LysoTracker-Red представлены на Рисунке 15. 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 АМ-BODIPY **5a** хорошо коррелирует с данными для других лизосом-направленных BODIPY-зондов [24], включая AIE-активный **CarBDP** (PCC = 0.71) [33] и **NPB** (PCC = 0.60–0.88) [126].

⁶ Автор выражает благодарность к.б.н. А.М. Щербакову за предоставленные результаты.

⁷ Автор выражает благодарность к.б.н. Д.В. Самигуллину и Г.В. Субгатуллиной за предоставленные результаты.

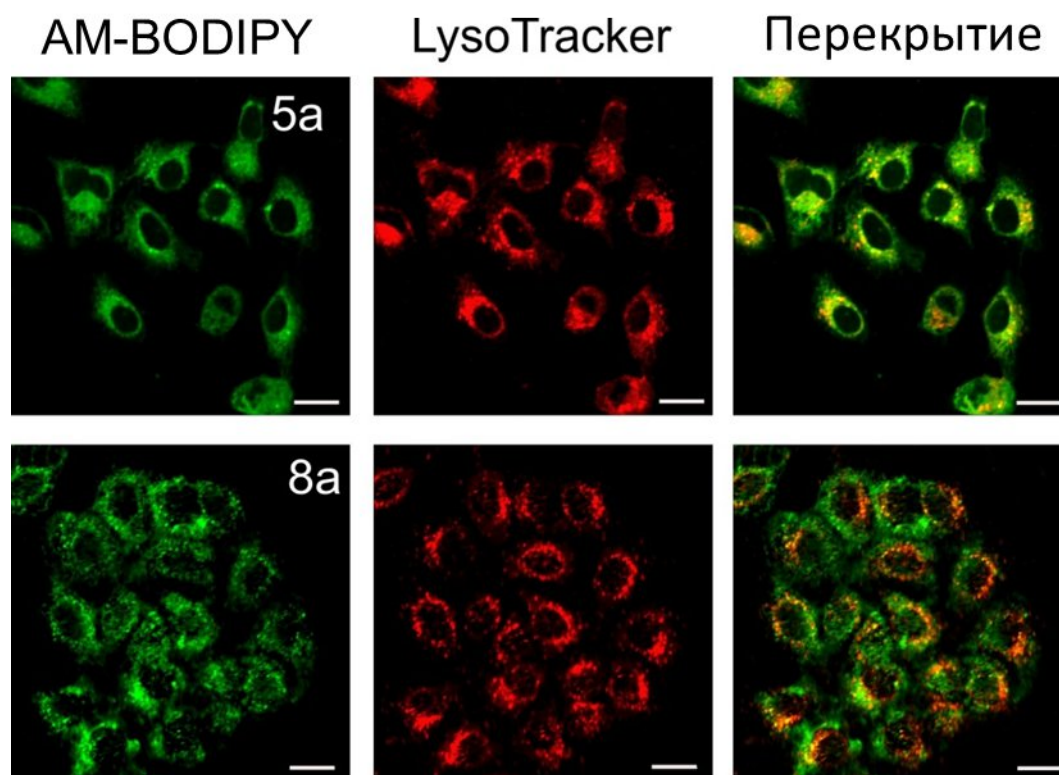


Рисунок 15. Локализация AM-BODIPY **5a** (5 мкМ) и AM-BODIPY **8a** (15 мкМ) в лизосомах клеток М-HeLa. Линейная шкала: 20 мкм.

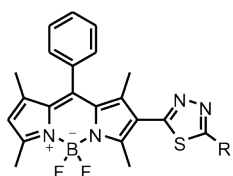
Можно отметить, что флуоресцентные зонды, способные отслеживать несколько аналитов и параметры микроокружения, востребованы в области диагностики заболеваний, в том числе связанных с нарушением функций лизосом [149, 150]. Растворы красители AM-BODIPY **5a** и **8a** эффективно реагируют на изменение содержания воды, вязкости, pH и температуры системы, демонстрируя флуоресцентный on-off отклик. Их достоинствами являются высокая чувствительность к параметрам микроокружения, линейный отклик на их изменение, биосовместимость, водорастворимость, стабильность при физиологически значимых температурах, совместимость с ионами металлов, присутствующими в биологических средах, включая физиологически важные K^+ и Na^+ . Красители **5a** и **8a** могут найти применение для изучения динамики и функций лизосом в живых клетках методом флуоресцентной визуализации. Благодаря селективности к Cu^{2+} , они могут служить лизосом-направленными зондами для исследования и диагностики нарушений внутриклеточного обмена меди, таких как болезнь Менкеса, болезнь Вильсона, болезнь Альцгеймера [151]. В качестве флуоресцентных молекулярных термометров эти красители представляют интерес для мониторинга температурно-зависимых процессов (например, гидролиз АТФ) и патологических состояний (например, гиперпирексии) [152].

Таким образом, в рамках первой части работы путем рациональной модификации хромофора аза-макроциклическими (АМ) фрагментами были разработаны новые водорастворимые АІЕ-активные производные BODIPY. Серия АМ-BODIPY линейной и циклической структуры была впервые получена методом восстановительного аминирования 2(6)-формил-BODIPY цикленами. Исследование взаимосвязи структура-функция показало, что АІЕ-поведение АМ-BODIPY зависит от соотношения АМ-фрагментов и хромофорных единиц. Наиболее выраженный АІЕ-эффект наблюдался для моно- и бис-циклен замещенных 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 обладают **5a** и **8a** биосовместимостью, устойчивы к физиологическим концентрациям клеточных ионов металлов и избирательно накапливаются в лизосомах, что делает их перспективными для биологических применений. Все эти свойства позволяют рассматривать АМ-BODIPY как перспективные структуры для создания флуоресцентных off-on зондов для биовизуализации.

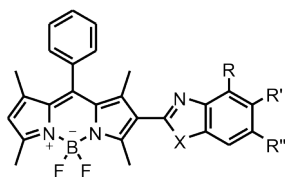
III.II. Синтез и изучение фотофизических свойств 2(6)-производных BODIPY, модифицированных 1,3,4-тиадиазольными и бензаннелированными 1,3-азольными заместителями

Во второй части работы мы обратились к синтезу и оценке фотофизических свойств 2-гетарилзамещённых производных BODIPY **II**, представленных на рисунке 16. В качестве объектов исследования были выбраны замещённые по 2,6-положениям ядра BODIPY 1,3,4-тиадиазольные производные **A** и бензаннелированные 1,3-азольные производные **B**.

Целевые соединения BODIPY II

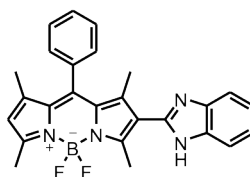


A



B

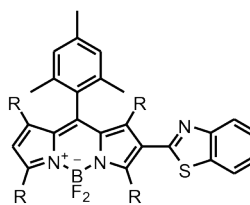
Литературные аналоги



C

Lysosome marker

Gonçalves, Raquel CR, et al., *Dyes and Pigments* 196 (2021): 109784.

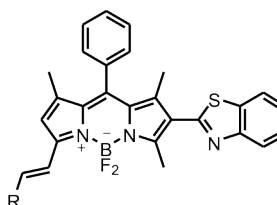


D

R = H, Me

Lipid droplets marker

Zhu, Jianping, et al., *Analysis & Sensing* 4.1 (2024): e202300049.



E

R = N,N-dimethyl-anilin-4yl
N,N-diethyl-anilin-4yl

Fluorescent viscosity probe

Guo, Xing, et al., *ACS Applied Materials & Interfaces* 16.32 (2024): 41916-41926.

Рисунок 16. Целевые соединения **II** и их литературные аналоги.

Известно, что 2,5-(гет)арил-1,3,4-тиадиазолы обладают значительным потенциалом в разработке флуоресцентных красителей [153-155]. Однако, BODIPY замещенные 1,3,4-тиадиазолы **A** и их свойства ранее в литературе описаны не были. Объединение планарных фрагментов 1,3,4-тиадиазола и BODIPY по типу **A** представляло интерес в контексте разработки красителей с высокой интенсивностью флуоресценции, достигающейся за счет снижения безызлучательной дезактивации возбужденных электронных состояний флуорофора **2H-BODIPY**. В то же время, варьирование функциональных заместителей R в 1,3,4-тиадиазольном фрагменте структур **A** могло обеспечить получение флуоресцентных красителей чувствительных к параметрам среды, таким как pH и полярность.

Среди множества известных гетероциклических производных BODIPY [156-162] структуры типа **B**, несущие 1,3-бензазольные остатки, представлены в литературе единичными примерами (Рис. 16). pH-Чувствительное бензимидазольное производное **C** было разработано группой Raposo M. для селективной флуоресцентной визуализации лизосом [163]. 8-Мезитил-2-бензотиазол BODIPY **D** предложен группой New E. в качестве маркера липидных капель [55], в то время как 8-фенил-3-арилиден-6-бензотиазол BODIPY **E** был описан в работе Li и соавт. [103] как флуоресцентный зонд вязкости среды. В то же время, 2-бензоксазолзамещенные производные BODIPY в литературе описаны не были. Синтез библиотеки соединений типа **B** и систематическое изучение их фотофизических свойств представляли интерес в контексте установления закономерностей взаимосвязи структура красителя – фотофизические свойства в ряду 1,3-азольных производных BODIPY.

В качестве стратегии синтеза общей для целевых структур **A** и **B** было предложено использовать конденсацию 2(6)-формил-замещенных BODIPY с биснуклеофилами – функционализированными тиогидрамидами, *орто*-фенилендиаминами, *орто*-аминтиофенолами, *орто*-аминофенолами, в окислительных условиях (Схема 2). Данный подход за счёт варьирования биснуклеофильной компоненты мог обеспечить широкую структурную вариативность получаемых красителей, необходимую для установления закономерностей взаимосвязи структура-фотофизические свойства и выявление красителей перспективных в контексте флуоресцентной биовизуализации. Интерес представляли фосфорил- и карбоксамид-замещенные 1,3,4-тиадиазолы, а также бензимидазолы, бензотиазолы и бензоксазолы несущие как электроно-донорные, так и электроноакцепторные функциональные группы.

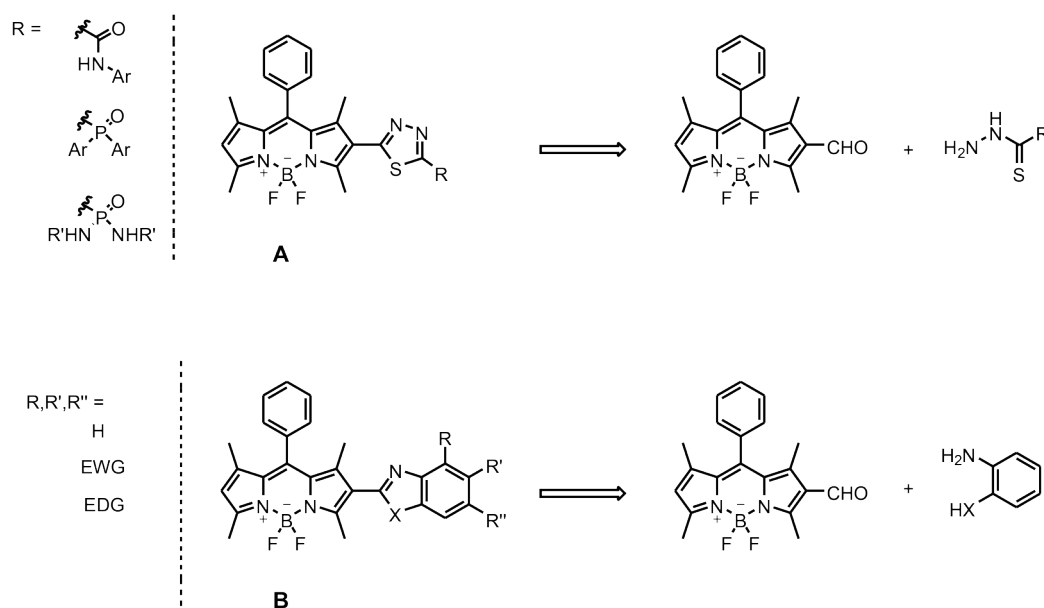


Схема 2. Ретросинтетический анализ структур **A** и **B**.

III.II.1. 1,3,4-Тиадiazольные производные BODIPY

III.II.1.1. Синтез и свойства фосфорилзамещенных 1,3,4-тиадiazольных производных BODIPY

Целевые фосфорилзамещенные 1,3,4-тиадiazольные производные BODIPY **11a-d** были получены с использованием двухстадийной *one-pot* методики, включающей на первой стадии выдерживание 2-формил-BODIPY **1** с гидразидами фосфорилтиомуравьиной кислоты [164-167] **10a-d** в присутствии кислотного катализатора и обработку окислителем - 2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохиноном (DDQ) на второй стадии (Схема 3). 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 **11a,b** с арильными заместителями при атоме фосфора составили 83% и 81%, соответственно, тогда как *трет*-бутильный амид **11c** был получен с 70% выходом. (PhNH)₂PO-замещенное производное **11d** было выделено с выходом лишь 16%, что было связано с высокой лабильностью гидразида фосфорилтиомуравьиной кислоты **10d** [164-167].

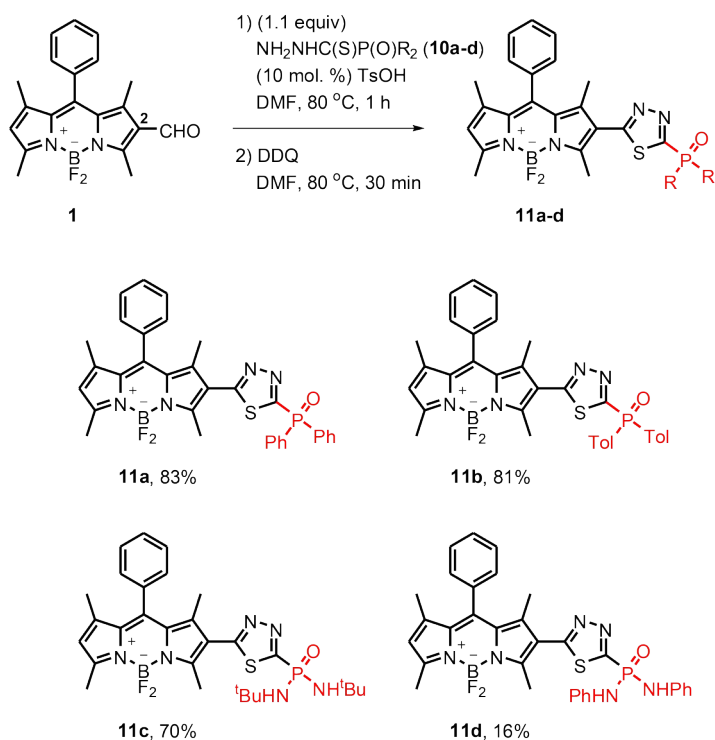


Схема 3. Синтез фосфорилзамещенных 1,3,4-тиадiazольных производных BODIPY **11**.

Распространение методики на 2,6-бисформил-BODIPY **2** позволило получить 2,6-бис-замещенные BODIPY **12a,b** с фосфиноксидными и фосфорилдиамидными группами. Реакции проводили с двукратными избытками гидразидов фосфорилтиомуравьиной кислоты **2a,c**. Выходы продуктов **12a** и **12b** составили 50% и 58%, соответственно (Схема 4).

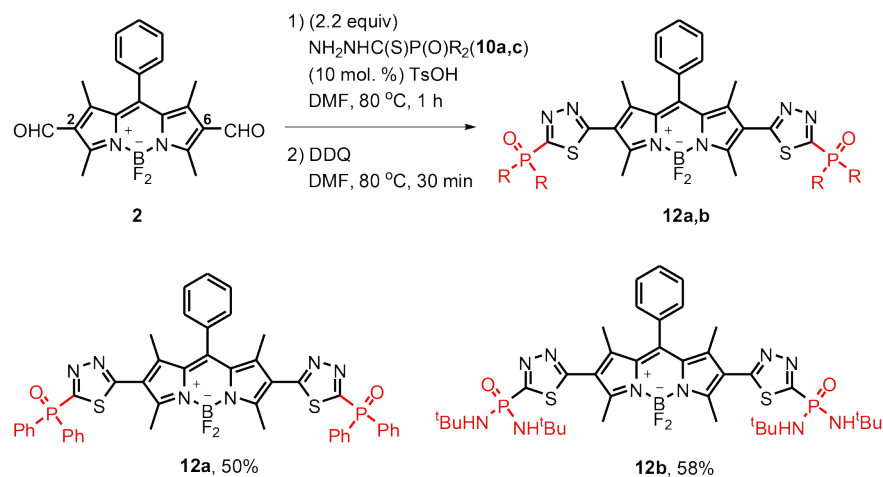


Схема 4. Синтез 2,6-бис-замещенных BODIPY производных **12**.

Структуры всех синтезированных фосфорилзамещенных 1,3,4-тиадиазольных производных BODIPY были подтверждены данными ЯМР-спектроскопии ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{11}B и ^{19}F . Ключевые химические сдвиги в спектрах ЯМР для соединений **11** и **12** в сравнении с экспериментальными данными для незамещенного аналога 1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифторборадиазаиндацена (**2H-BODIPY**) представлены в Таблице 3.

Таблица 3. Химические сдвиги соединений **11** и **12**.^[a]

№	Соединение	^{31}P NMR ♥ (ppm)	^{11}B NMR ♥ (ppm)	^{19}F NMR ♥ (ppm)	^1H ЯМР CH_3 - группы ♥ (ppm)
1	11a	19.62	0.78	-145.7	1.42, 1.60, 2.62, 2.86
2	11b	20.40	0.77	-145.7	1.40, 1.57, 2.61, 2.83
3	11c	2.17	0.78	-145.9	1.40, 1.56, 2.60, 2.80
4	11d	3.76	0.76	-145.7	1.42, 1.54, 2.62, 2.79
5	12a	19.70	0.81	-144.8	1.61, 2.88
6	12b	2.00	0.82	-144.8	1.58, 2.84
7	2H-BODIPY ^[b] 	-	0.79	-147.1	1.41, 2.60

^[a] Спектры были записаны в растворе CDCl_3 .

^[b] 1,3,5,7-Тетраметил-8-фенил-4,4-дифторборадиазаиндацен.

Было показано, что в спектрах ^{31}P ЯМР производных **11a,b** и **12a** характеристичные синглеты фосфиноксидных групп наблюдаются при ~ 20 ppm, тогда как химические сдвиги фосфамидных остатков соединений **11c,d** и **12b** наблюдаются 2-4 ppm. Соединения **11** демонстрировали характерный триплет в спектрах ^{11}B ЯМР и квартет в спектрах ^{19}F ЯМР с незначительными сдвигами по сравнению с соединениями **12** (Таблица 3). В спектрах соединений **11** и **12** не наблюдалось существенных изменений химических сдвигов ядер ^{11}B и ^{19}F по сравнению с незамещенным структурным аналогом **2H-BODIPY**[168]. Химические сдвиги метильных групп в спектрах ^1H ЯМР соединений **11** и **12** составили ~ 1.4 , ~ 2.8 и были близки по значению к таковым для **2H-BODIPY**, что указывает на слабые пространственные взаимодействия между 1,3,4-тиадиазольным остатком и метильными группами BODIPY в основном состоянии красителей.

На примере соединения **12b** структуры продуктов были подтверждены методом рентгеноструктурного анализа - CCDC 2446743 (Рисунок 17, Приложение 7). Монокристаллы красителя **12b** были получены методом медленной диффузии в системе дихлорметан-петролейный эфир. Следовые количества 2,3-дихлор-5,6-дицианогидрохинона, являющегося продуктом восстановления DDQ, способствовали кристаллизации соединения **12b**. В соединении **12b** двугранные углы между 1,3,4-тиадиазольными фрагментами и плоскостью BODIPY составляют 5° и 35° , что также указывает на незначительные стерические препятствия, создаваемые метильными группами BODIPY для вращения 1,3,4-тиадиазольного заместителя.

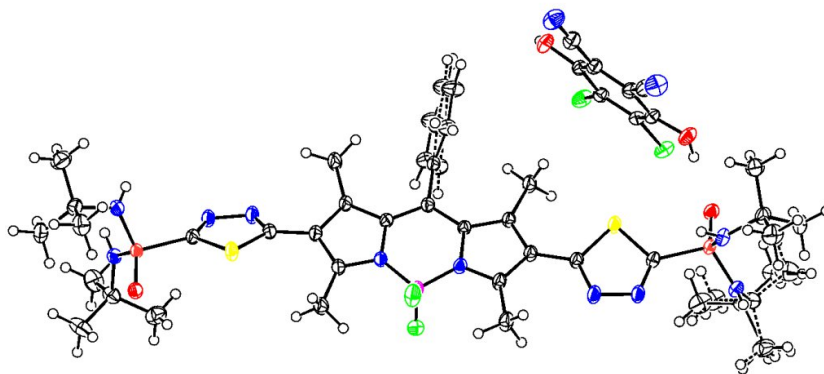


Рисунок 17. Кристаллическая структура BODIPY **12b** в комплексе с 4,5-дихлор-3,6-дигидроксифталонитрилом, изображенная с эллипсоидами смещений, соответствующими 50% уровню вероятности.

На следующем этапе 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 4, Рис. 18, S2-S7). Для оценки влияния 1,3,4-тиадиазольных заместителей во втором и шестом положениях ядра BODIPY на фотофизические свойства флуорофора данные, полученные для соединений **11** и **12**, сравнивались с литературными данными для **2H-BODIPY** в ацетонитриле [136].

Таблица 4. 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
7	2H-BODIPY ^[c]	MeCN	497	48345	511	-	551	52

^[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. ^[c] Данные для 1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацена (**2H-BODIPY**) взяты из литературы [136].

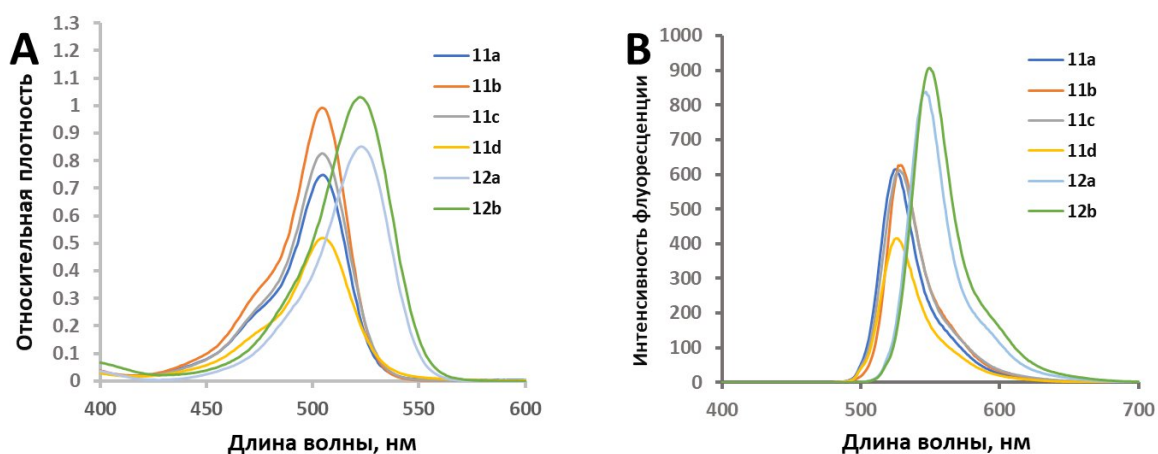


Рисунок 18. (А) Сравнение спектров поглощения соединений **11** и **12**, зарегистрированных в MeCN. (Использованная концентрация — 1×10^{-5} М.) (В) Сравнение спектров испускания соединений **11** и **12**, зарегистрированных в MeCN (концентрация красителя — 1×10^{-6} М.).

Было найдено, что 2-замещенные BODIPY **11** характеризуются интенсивной полосой поглощения с $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ 504-505 нм, соответствующей переходу $S_0 \rightarrow S_1$, с плечом при 480-490 нм (Рис. 18). 2,6-бис-замещенные BODIPY **12** обладали сходными спектрами поглощения, однако их полосы поглощения были сдвинуты bathochromно 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**), при этом были в 1.5-2.0 раза выше, чем ϵ_{abs} для **2H-BODIPY**.

Растворы соединений **11** в ацетонитриле 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. Кроме того, Стоксовы сдвиги для соединений **11** и **12** были больше, чем для **2H-BODIPY** ($754-876$ см $^{-1}$ для **11** и **12** против 551 см $^{-1}$ для **2H-BODIPY**). Также наблюдались bathochromные сдвиги на 7-26 нм ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$) и 14-39 нм ($\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$) для соединений **11** и **12** по сравнению с **2H-BODIPY**, причем сдвиг для соединений **12** был более выраженным. Существенных различий в спектрах поглощения и испускания между фосфиноксидами (**11a**, **11b**, **12a**) и фосфорамидами (**11c**, **11d**, **12b**) не наблюдалось. Эти наблюдения позволяют предположить, что введение 1,3,4-тиадиазольного кольца в 2(6)-положение ядра BODIPY изменяет электронные свойства флуорофора, тогда как вклад фосфорильного заместителя в этот процесс незначителен.

Влияние растворителя на спектральные характеристики соединений **11** и **12** - положения максимумов поглощения ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$) и испускания ($\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$), Стоксов сдвиг и квантовый выход флуоресценции (Φ_{em}) - анализировали с использованием моделей Липперта-Матага, Камлета-

Тафта и Каталана [169-171] при помощи онлайн-ресурса <http://solvatochrome.isc-ras.ru/49> (избранные данные представлены в Приложении 8). Для всех соединений была обнаружена линейная зависимость ($R^2 > 0.9$) между $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}/\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ и эмпирическими параметрами растворителя: поляризуемостью (SP), показателем преломления (nD) и ориентационной поляризуемостью (Δf). Это указывает, что поляризуемость растворителя влияет на положения максимумов поглощения и испускания соединений **11** и **12** независимо от структуры красителей. Зависимость Стоксова сдвига от Δf демонстрировала слабую линейную корреляцию (за исключением красителя **11d**), что свидетельствует о сопоставимых дипольных моментах основного и возбужденного состояний исследуемых соединений [172]. Для соединений **11c** и **12b**, содержащих $\text{PO}(\text{NH}^t\text{Bu})_2$ -заместители, наблюдалась хорошая линейная корреляция ($R^2 = 0.97$ и 0.92 соответственно) между Стоксовым сдвигом и параметром полярности растворителя ET(30). Эти данные, позволяют предположить, что возбужденные состояния красителей **11c** и **12b** стабилизируется средой в большей степени, чем основное состояние. Анализ данных Φ_{em} не выявил значимых корреляций для фосфорамидов **11c**, **12b** и фосфиноксидов **11a**, **12a** в рамках всех моделей, что свидетельствует о независимости их квантовых выходов флуоресценции от параметров молекулярного окружения. Линейная зависимость между Φ_{em} и ET(30), а также основностью растворителя SB ($R^2 = 0.97$) была обнаружена только для красителя **11d** с $\text{PO}(\text{NHPh})_2$ -группой, что может указывать на наличие специфических взаимодействий растворённое вещество/растворитель по типу кислота-основание[173].

С использованием в качестве модельного красителя **11c** была проведена оценка распределения ВЗМО и НСМО в фосфорилзамещенных 1,3,4-тиадиазольных производных BODIPY.⁸ Геометрию модельного соединения **11c** оптимизировали методами квантово-химических расчетов в газовой фазе: для основного состояния использовали метод DFT, а для первого возбуждённого синглетного состояния - метод TD-DFT с функционалом ωB97XD и базисным набором def2-SVP. Для верификации экспериментальных данных были рассчитаны спектры поглощения в УФ-видимой области и флуоресценции методом QD-SC-NEVPT2 SA-CASSCF(4,4). Расчётный максимум первого электронного перехода при 533 нм хорошо согласовывался с экспериментальным значением в 516 нм, полученным в 1,2-дихлорбензоле. Согласно анализу пространственного распределения ВЗМО и НСМО, представленному в дополнительных материалах, данный $S_0 \rightarrow S_1$ переход соответствует π - π^* -переходу (Приложение 9).

Оптимизация геометрии первого возбуждённого состояния выявила в нем незначительные структурные изменения по сравнению с основным состоянием (Приложение

⁸ Автор выражает благодарность к.х.н. И.С. Голованову за любезно предоставленные результаты.

10). В частности, наблюдалось вращение на 5.8° вокруг связи C7-C8 между тиadiaзольным фрагментом и ядром BODIPY, а также на 8.9° вокруг связи C9-C34, соединяющей фенильный заместитель с BODIPY-ядром. Эти изменения приводят к увеличению планарности молекулы в возбужденном состоянии.

Расчётная длина волны вертикальной эмиссии (572 нм) несколько превышала экспериментальное значение (537 нм), однако относительное отклонение составило не больше 6%. Дополнительно была оценена ширина запрещённой зоны ($E_{\text{gap}} = 2.74$ эВ) по данным моделирования спектров поглощения методом TD-DFT, что удовлетворительно согласуется с экспериментальным значением 2.31 эВ. Анализ карты разности электронных плотностей между основным и первым возбуждённым состояниями (Рис. 19) показал, что фосфорилзамещенный 1,3,4-тиadiaзольный фрагмент практически не влияет на перераспределение электронной плотности при возбуждении. Этот вывод подтверждается полной локализацией ВЗМО и НСМО на BODIPY-фрагменте молекулы, что свидетельствует о локализованном характере возбуждённых состояний без существенного переноса заряда между BODIPY и 1,3,4-тиadiaзольным молекулярными фрагментами.

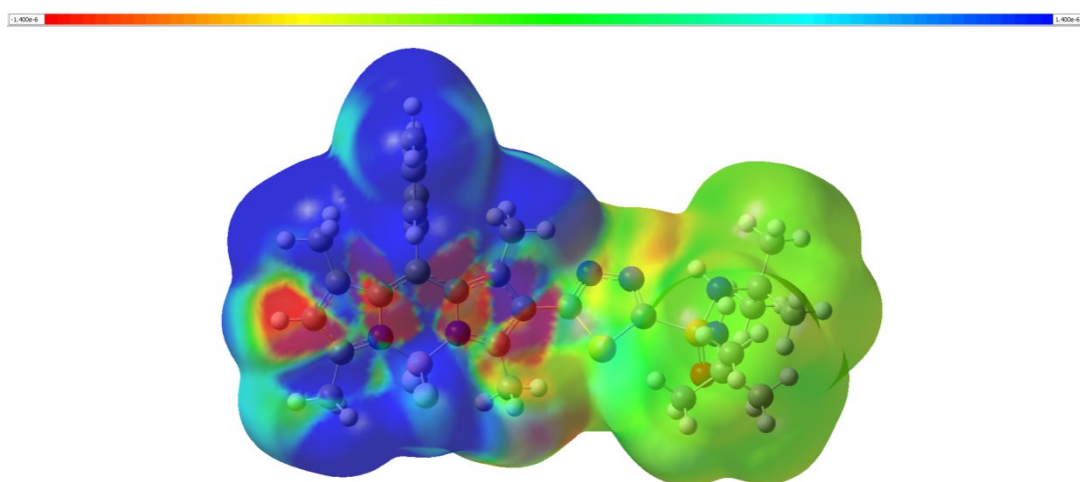


Рисунок 19. Изоповерхность электронной плотности основного состояния для соединения **11c**. Цветовая шкала соответствует величине разностной плотности. Уровень изоповерхности: 0.0001. Синим цветом обозначены области, где плотность в первом возбуждённом состоянии превышает плотность в основном состоянии.

Электрохимические свойства красителей **11a,c,d** и **12a** были исследованы методом циклической вольтамперометрии (Рис. 20, 21 и Приложение 11).⁹ Обратимый пик восстановления, соответствующий одноэлектронному восстановлению фосфиноксидной группы, был зафиксирован для фосфиноксид замещенного соединения **11a** ($E_{\text{red}}^{1/2} = -1.14$ В

⁹ Автор выражает благодарность

к.х.н. В.К. Лесникову за помощь в регистрации и анализе спектров ЦВА.

относительно Fc/Fc^+), соответствует (Рис. 20) [174]. Для соединения **12a** наблюдались два таких пика ($E_{red}^{1/2} = -0.9$ В и $E_{red}^{1/2} = -1.09$ В относительно Fc/Fc^+), вероятнее всего, соответствующие последовательному одноэлектронному восстановлению двух фосфиноксидных групп (Рис. 21). В измеренном диапазоне вольтамперограммы для $PO(NH^tBu)_2$ -замещенного производного **11c** подобные процессы восстановления не наблюдались. В то же время для соединения **11d**, содержащего группу $PO(NHPh)_2$, был зарегистрирован псевдообратимый пик восстановления ($E_{red}^i = -1.01$ В, относительно Fc/Fc^+ , $\Delta E_{red-ox} = 0.16$ В). Других значимых пиков окисления или восстановления в вольтамперограммах соединений **11a,c,d** и **12a** не наблюдалось, что согласуется со стабильностью к окислению и восстановлению в использованных условиях 1,3,4-тиадиазольного цикла и 1,3,5,7-тетраметил-8-фенил замещенного ядра BODIPY.

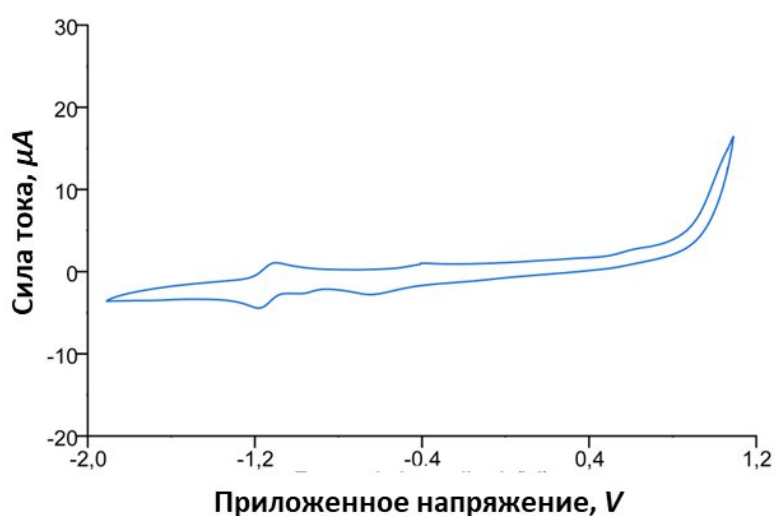


Рисунок 20. Характерная циклическая вольтамперограмма соединения **11a** (условия: 100 мМ ТВАРF₆ в ДМСО, рабочий и вспомогательный электроды - Pt-диск, электрод сравнения - Pt-проволока, скорость сканирования 100 мВ/с, относительно системы Fc/Fc^+).

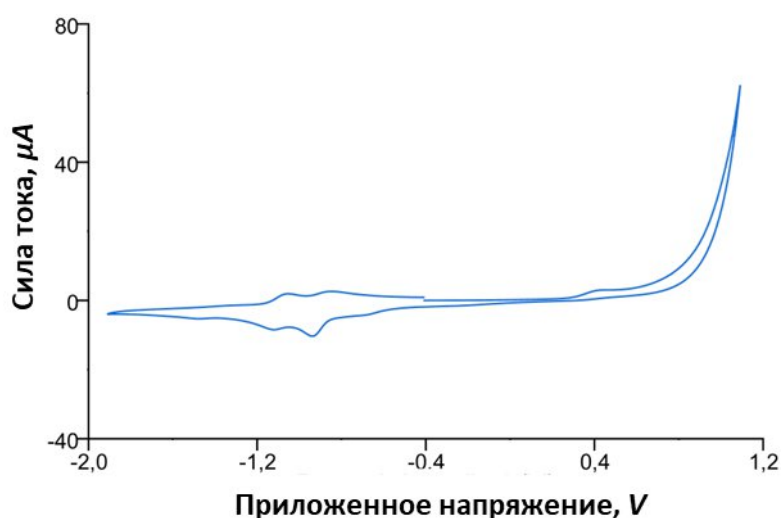


Рисунок 21. Характерная циклическая вольтамперограмма соединения **12a** (условия: 100 мМ ТВАРF₆ в ДМСО, рабочий и вспомогательный электроды - Pt-диск, электрод сравнения – Pt-проволока, скорость развёртки 100 мВ/с, относительно пары Fc/Fc^+).

Биосовместимость и токсичность являются ключевыми параметрами, которые необходимо учитывать при оценке пригодности красителей для биологической визуализации и применений в материаловедении. Антипролиферативная активность соединений **11a-d** и **12a,b** была оценена с помощью МТТ-теста.¹⁰ Было показано, что красители **11a,b,d** и **12a,b** не подавляют рост клеток MCF7 (IC_{50} выше 50 мкМ). Только соединение **11c** продемонстрировало ингибирующую активность в отношении клеток MCF7 с $IC_{50} = 10.03$ мкМ. Этот результат позволяет предположить, что стратегия C2(6) функционализации флуорофора - 8-фенил-1,3,5,7-тетраметил BODIPY, 1,3,4-тиазольными остатками наряду с фосфорильными заместителями не приводит к острой клеточной токсичности красителей.

Таким образом, нами была предложена эффективная стратегия синтеза новых производных BODIPY, функционализированных по 2(6) положениям флуорофора фосфор(V)-замещенными 1,3,4-тиадиазольными фрагментами. Целевые соединения были получены окислительной циклизацией 2(6)-формил-BODIPY с гидразидами фосфорилтиомуравьиной кислоты. Исследования физико-химических свойств синтезированных красителей показали, что фосфиноксид-содержащие производные BODIPY демонстрируют выраженную электрохимическую активность при низкой токсичности.

III.П.1.2. Синтез и свойства карбоксамидамещенных 1,3,4-тиадиазольных производных BODIPY

Целевые карбоксамидамещенные 1,3,4-тиадиазольные производные BODIPY были получены реакцией окислительного сочетания формил-BODIPY с тиогидразидами оксаминовых кислот по аналогии с фосфорилзамещенными производными (глава III.П.1.2). Было показано, что последовательная обработка смеси 2-формил-BODIPY **1** с *N*-арил тиогидразидами оксаминовых кислот **13a-g** в ДМФА при 80 °C сначала TsOH (10 мол. %), а затем DDQ приводит к соединениям **14a-d**, содержащим C(O)NHAr-фрагмент в 1,3,4-тиадиазольном цикле (Схема 5). Выходы продуктов **14a-d** не зависели существенным образом от природы заместителя в арильном остатке карбоксамидного фрагмента. Соединения **14b-g**, содержащие C(O)NH(*p*-MeC₆H₄), C(O)NH(*p*-MeOC₆H₄), C(O)NH(*p*-BrC₆H₄), C(O)NH(*p*-NMe₂C₆H₄), C(O)NH(2'-Cl-пиридин) функциональные группы были выделены методом колоночной хроматографии с выходами 60-75%. Низкий выход C(O)NHPh-замещенного производного **14a**, составивший 30%, был обусловлен сложностями его хроматографической очистки. Важно отметить, что карбоксамид-замещенные производные **14a-**

¹⁰ Автор выражает благодарность Д.И. Сальниковой за любезно предоставленные результаты.

g обладали ограниченной растворимостью (1-2 мг/мл) в органических растворителях, таких как хлороформ, ДМСО, ДМФА, тетрагидрофуран и 1,2-дихлорбензол.

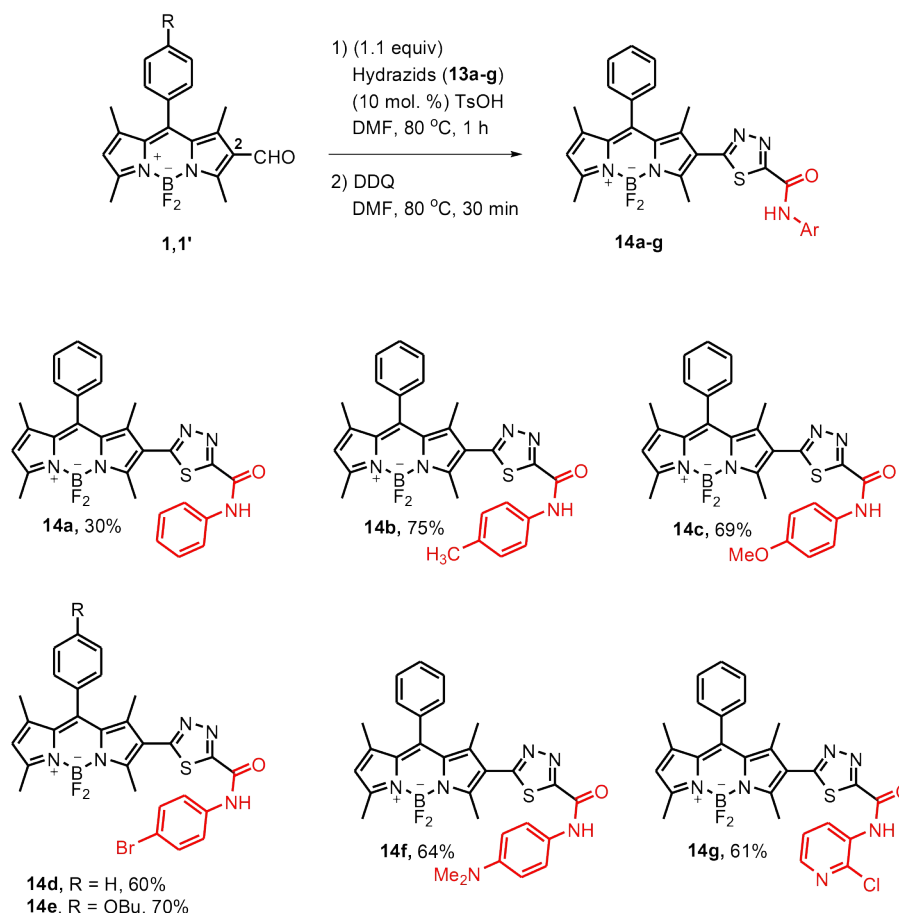


Схема 5. Синтез карбоксамидамещенных 1,3,4-тиадиазольных производных BODIPY.

На примере соединения **14f** была показана возможность химической модификации карбоксамидных фрагментов в красителях **14a-g** (Схема 6). Было показано, что его обработка Wos_2O в присутствии каталитического количества DMAP в среде дихлорметана при комнатной температуре приводит к *N*-Wos-производному **14h** с выходом 25%. Было установлено, что по сравнению со своим незамещенным аналогом **14f**, соединение **14h** обладает более высокой растворимостью в органических растворителях. В частности, в хлороформе она составила ~ 15 мг/мл.

Образование продукта **14h** было однозначно доказано методом рентгеноструктурного анализа (Рис. 22). Строение и состав соединений **14a-h** были подтверждены с использованием комплекса физико-химических методов исследования, в том числе ЯМР-спектроскопии (^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{11}B) и МАСС-спектрометрии высокого разрешения.

В спектрах ^1H ЯМР соединений **14a-g** наблюдался характеристичный уширенный синглет в области 9.14 – 9.06 м.д., соответствующий протону амидной группы амидного фрагмента. Для

соединения **14h** данный сигнал отсутствовал, однако наблюдался характеристичный синглет высокой интенсивности при 1.31 м.д., соответствующий протонам *Boc*-защитной группы. В спектрах ^{13}C ЯМР соединений **14a-g** в области 166.8 – 160.5 м.д. наблюдались характеристичные сигналы, соответствующие карбонильному атому углерода карбоксамидной группы и атомам углерода 1,3,4-тиадиазолового гетероцикла.

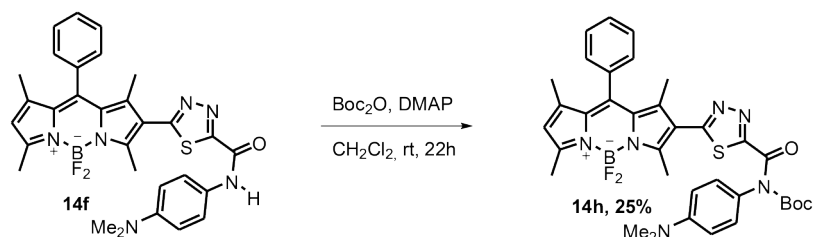


Схема 6. Синтез *N*-Boc-производного BODIPY **14h**.

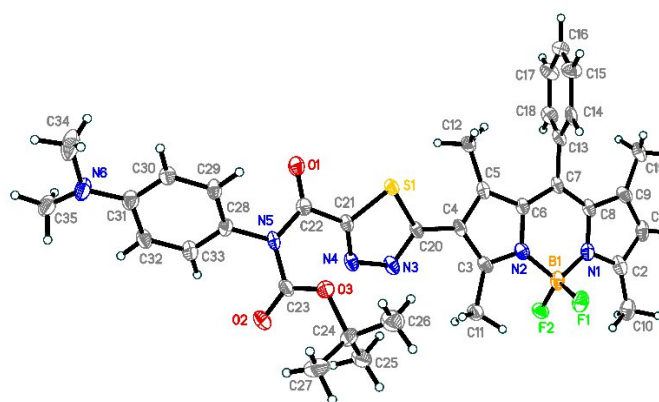


Рисунок 22. Общий вид рентгеновской структуры соединения **14h** с тепловыми эллипсоидами с вероятностью 50%.

Растворы соединений **14a-h** в ацетонитриле были исследованы методами УФ и флуоресцентной спектроскопии (Таблица 5, Рис. 23). В спектрах поглощения красителей **14a-h** наблюдалась интенсивная полоса поглощения ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 504\text{-}506$ нм), соответствующая переходу $S_0 \rightarrow S_1$, с характерным плечом при 470-490 нм (Рис. 23А). Коэффициенты экстинкции в ряду варьировали от $6.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ (**14e**, строка 6) до $11.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ (**14g**, строка 5) и были выше в 1.4-2.4 раз, чем ϵ_{abs} незамещенного **2H-BODIPY** (Таблица №5, строка 9). В спектрах испускания соединений **14a-h** наблюдались узкие полосы при $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 526\text{-}528$ нм с FWHM = $791\text{-}863 \text{ см}^{-1}$. Было показано, что растворы красителей **14c,f,h**, содержащих π -донорные заместителей - *p*-OMe, *p*-NMe₂, в арильных остатках карбоксамидных фрагментов, практически не флуоресцируют и характеризуются $\Phi_{\text{em}} < 1\%$ (строки 3,7 и 8). Соединения **8a,b,d,e,g** с C(O)NHPh, C(O)NH(*p*-MeC₆H₄), C(O)NH(*p*-BrC₆H₄), C(O)NH(2'-Cl-пиридин) функциональными группами, напротив, обладали высокими квантовыми выходами флуоресценции близкими к единице ($\Phi_{\text{em}} = 95\text{-}100\%$).

Таблица 5. 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	FWMH [см ⁻¹]	Стоксов сдвиг [см ⁻¹]	$\Phi_{\text{em}}^{[b]}$ [%]
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
9	2H-BODIPY ^[d]	497	48345	511	- [c]	551	52

^[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. ^[d] Данные для 1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифторборадиазиндацена (**2H-BODIPY**) взяты из литературы [136].

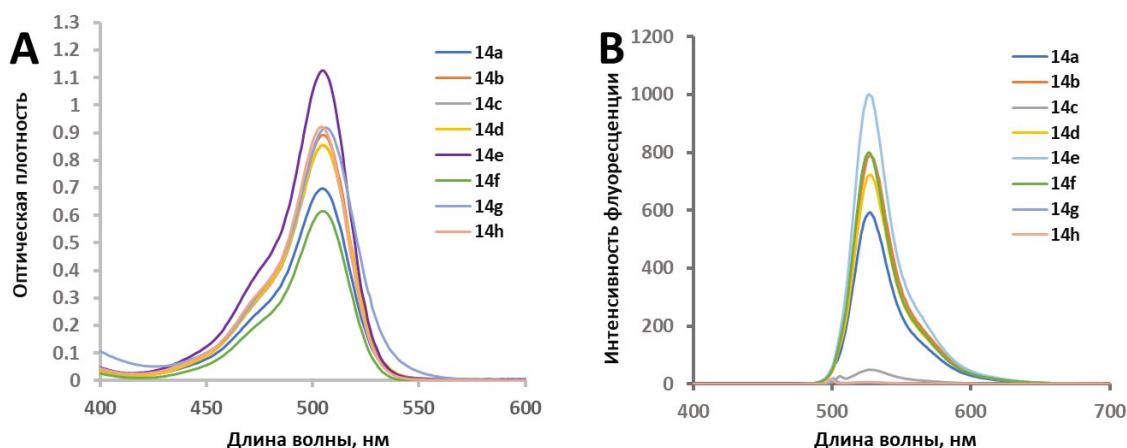


Рисунок 23. (А) Спектры поглощения растворов соединений **14a-h**, зарегистрированных в MeCN (концентрация красителя — 1×10^{-5} М.) (В) Спектры испускания растворов соединений **14a-h**, зарегистрированных в MeCN (концентрация красителя — 1×10^{-6} М.).

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 показала, позволила выявить для соединения **14c** зависимость Φ_{em} от

диэлектрической проницаемости среды (ξ) (Рис. 24). Было показано, что Φ_{em} линейно увеличивается с 1% до 83% в интервале $\xi = 47-9$, достигая максимума в 1,2-дихлорбензоле. Спектральные характеристики (λ_{abs}^{max} , ϵ_{abs} , λ_{em}^{max} , Φ_{em}) соединений **14a,b,d-h** существенным образом от растворителя не зависели.

Растворитель	ξ ^[c]	Φ_{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. ^[c] Данные диэлектрической проницаемости взяты из литературного источника [175]

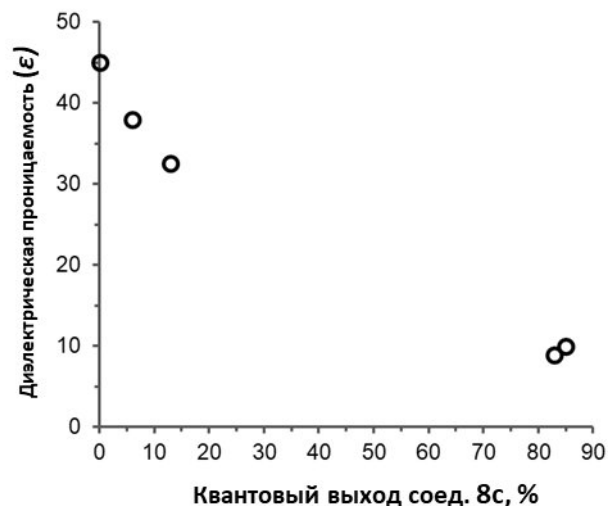


Рисунок 24. Зависимость Φ_{em} красителя **14c** от ξ растворителя.

Оценка влияния pH среды на спектры испускания синтезированных красителей позволила выявить pH-чувствительные производные **14f** и **14h**, содержащие *N,N*-диметиламинный заместитель. В присутствии трифторуксусной кислоты для соединений **14f** и **14h** было зафиксировано 37- и 59-кратное увеличение интенсивности максимума в спектрах испускания, соответственно (Рис. 25).

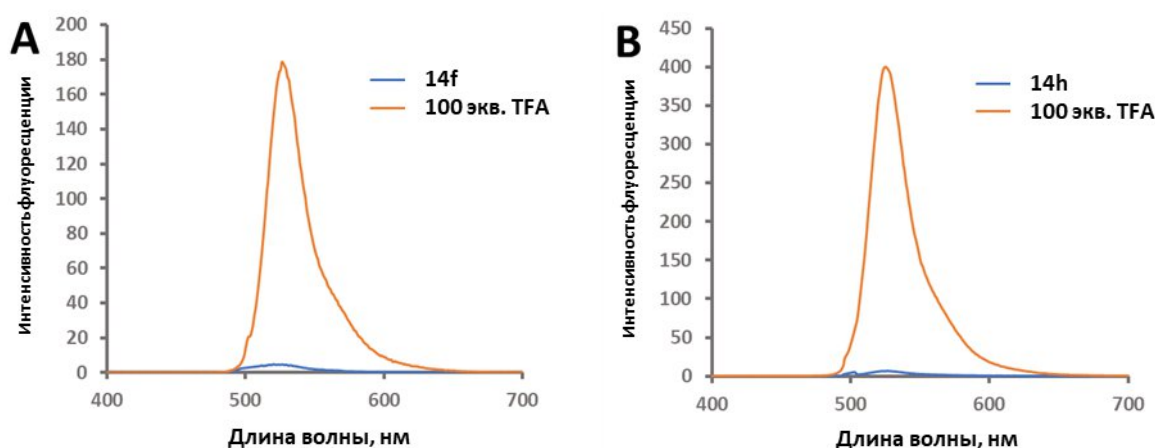


Рисунок 25. Спектры испускания соединений **14f** и **14h** в ацетонитриле (10^{-6} М) в отсутствие и присутствии кислоты (100 экв. TFA).

Таким образом, было показано, что C2-карбоксамидзамещенные 1,3,4-тиадиазольные производные BODIPY могут быть получены реакцией окислительного сочетания 2-формил-BODIPY с тиогидразидами оксиминовых кислот. Было найдено, что фотофизические характеристики, в первую очередь, квантовые выходы флуоресценции, полученных красителей зависят от функциональных заместителей в арильных остатках карбоксамидных фрагментов.

III.П.2. Синтез и свойства BODIPY, модифицированных бензаннелированными 1,3-азольными остатками

Введение 2-формилBODIPY **1** в реакцию с *орто*-фенилен диаминами **15a-i** в ДМФА в присутствии кислорода воздуха в качестве окислителя позволило получить 2-бензимидазолзамещенные производные BODIPY **16a-16h** (Схема 7). Выходы продуктов варьировались в диапазоне от 11% до 58% и были ниже для производных с электроакцепторными заместителями.

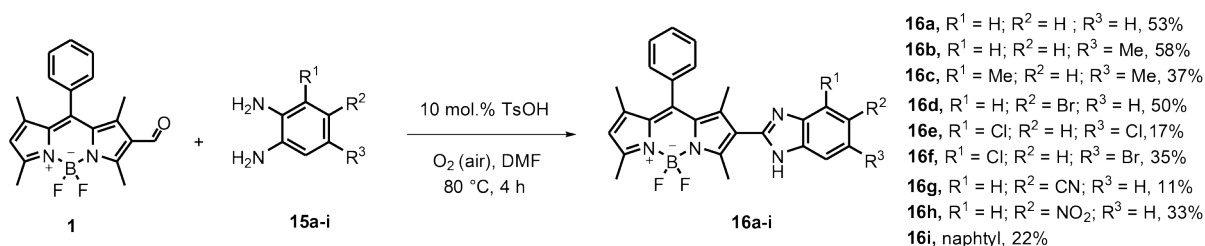


Схема 7. Синтез бензимидазолзамещенных производных BODIPY **16a-i**.

Реакцией 2-формил-BODIPY **1** с *орто*-аминофенолами **17** с использованием двухстадийной *one-pot* методики, включающей 1) выдерживание смеси при кипячении в 1,2-дихлорэтано в присутствии 10 мол. % TsOH в течение трёх часов, 2) дополнительное трёхчасовое кипячение в присутствии DDQ, была получена серия бензоксазолзамещенных производных BODIPY **18a-c** (Схема 8). Реакции протекали с образованием сложных смесей побочных продуктов, в связи с чем выходы соединений **18a-c** составили 25-48%.

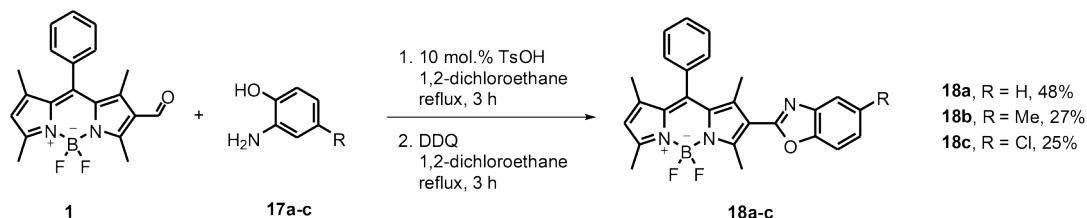


Схема 8. Синтез бензоксазолзамещенных производных BODIPY **18a-c**.

Распространение двухстадийной *one-pot* методики на *орто*-аминотиофенолы **19** позволило получить бензотиазолзамещенные производные BODIPY **20a-d** с выходами 33-47% (Схема 9). Строение и состав соединений **16,18** и **20** были подтверждены с использованием

комплекса физико-химических методов исследования, в том числе ЯМР-спектроскопии (^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{11}B) и МАСС-спектрометрии высокого разрешения.

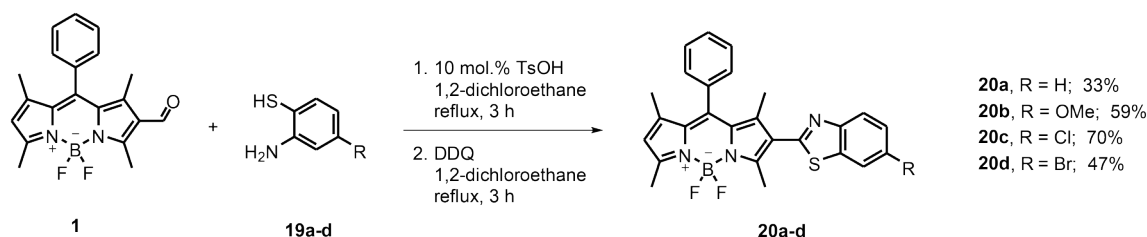


Схема 9. Синтез бензотиазолзамещенных производные BODIPY **20a-d**.

Растворы соединений **16**, **18** и **20** в ацетонитриле были охарактеризованы методами УФ и флуоресцентной спектрофотометрии (Рис. 26).

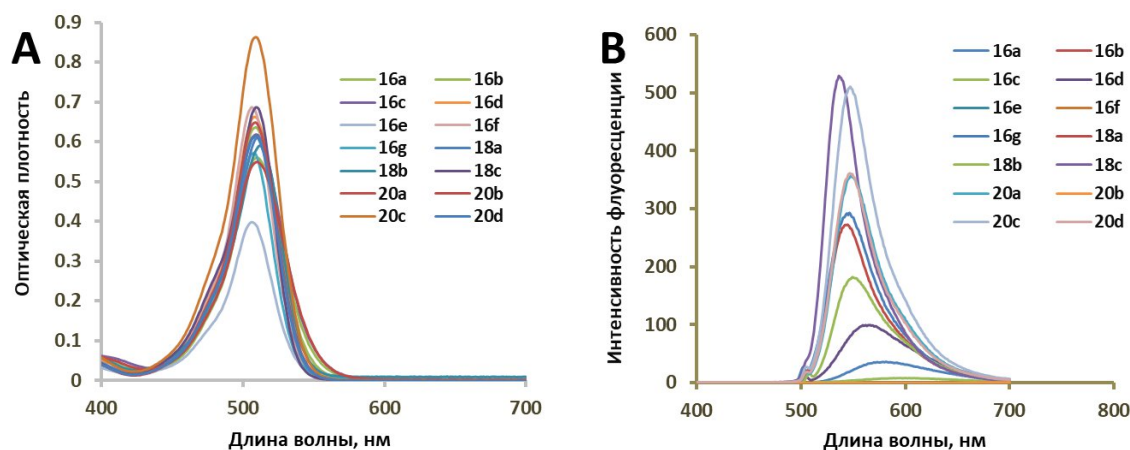
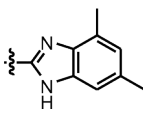
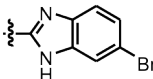
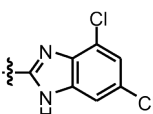
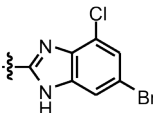
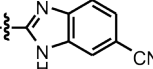
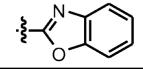
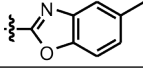
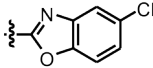
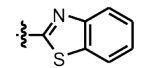
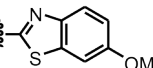
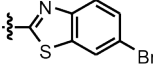
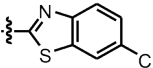


Рисунок 26. (А) Спектры поглощения соединений **16**, **18** и **20**, зарегистрированные в MeCN. (концентрация красителя — 1×10^5 М.) (В) Спектры испускания соединений **16**, **18** и **20**, зарегистрированные в MeCN (концентрация красителя — 1×10^6 М.).

Обобщённые данные в сравнении с данными для незамещенного литературного аналога 2H-BODIPY представлены в Таблице 6.

Таблица 6. Фотофизические данные для соединений **16**, **18** и **20**.^[a]

№	Соед.	R	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$, нм	ϵ_{abs} [моль ⁻¹ л см ⁻¹]	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$, нм	FWHM [см ⁻¹]	СТОКСОВ СДВИГ [см ⁻¹]	$\Phi_{\text{em}}^{[b]}$ [%]
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
15	2H-BODIPY ^[c]	-H	497	48345	511	-	551	52

^[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. ^[c] Данные для 1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4'-дифтор-4'-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацена (**2H-BODIPY**) взяты из литературного источника [136].

Было найдено, что максимумы в спектрах поглощения соединений **16,18** и **20** находятся в интервале 507-511 нм (λ_{abs}) и батохромно смещены на 10-13 нм по сравнению с λ_{abs} **2H-BODIPY** (Рис. 26А). 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 бромзамещенного бензотиазольного производного **20d**. Максимумы в спектрах испускания (λ_{em}) большинства красителей лежали в области 536–549 нм (Рис. 26В). Введение электронодонорных заместителей в 1,3-азольную систему приводило к батохромному сдвигу λ_{em} в область ~ 600 нм и увеличению Стоксовых сдвигов до 2941-2980 см⁻¹ (соединения **16b**, **16c** и **20b**).

Было найдено, что природа бензANNELированного 1,3-азольного остатка влияет на квантовые выходы флуоресценции (Φ_{em}) красителей. Для незамещенных 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 [176]. 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-замещенного бензотиазольного производного **20b**. Производные с электроакцепторными заместителями **16e-g**, напротив характеризовались высокими значениями Φ_{em} вплоть до 77% для нитрил-замещенного 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} (Рис. 27А-С).

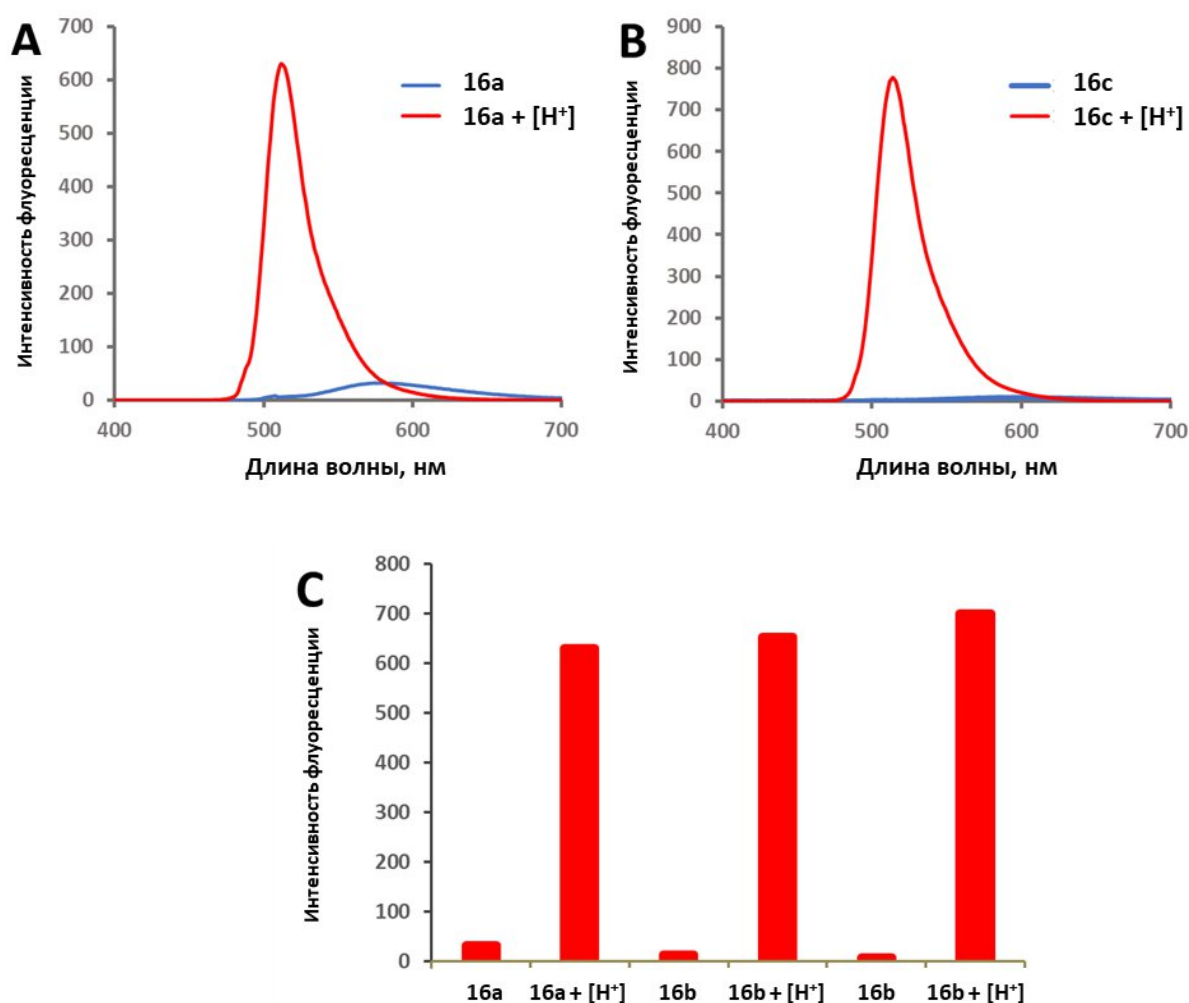


Рисунок 27. Спектры поглощения (А) и испускания (В) соединения **16с** (10^{-6} М) в отсутствие и присутствии HClO_4 (100 экв). (С) Флуоресцентные отклики красителей **16а-с** (10^{-6} М) в отсутствие и присутствии HClO_4 (100 экв).

Было найдено, что добавление перхлорной кислоты (HClO_4 , 100 экв.) к растворам красителей **16а-с** в ацетонитриле приводит к смещению максимумов в синюю область $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ на ~ 16 нм и $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ на 37 нм для **16а**, на 86 нм для **16б** и **16с**. Квантовые выходы флуоресценции (Φ_{em}) в присутствии HClO_4 составили 80% для **16а**, 83% для **16б** и 89% для **16с**.

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, бензоксазольных и бензотиазольных производных. Фотофизические исследования выявили ключевые закономерности, связывающие структуру соединений с их спектральными характеристиками.

По совокупности, в разделе III.II продемонстрировано, что 2(6)-производные BODIPY, модифицированные 1,3,4-тиадиазольными и бензаннелированными 1,3-азольными заместителями могут быть получены конденсацией 2(6)-формил-замещенных BODIPY с биснуклеофилами – функционализированными тиогидрамидами, орто-фенилендиаминами, орто-аминотиофенолами, орто-аминофенолами, в окислительных условиях. Разработанный подход обеспечил создание обширной библиотеки структур и выявление общих закономерностей в соотношении «структура – свойства» для данного класса красителей. В рамках исследования было установлено, что фотофизические свойства 1,3,4-тиадиазольных и 1,3-азольных производных BODIPY эффективно регулируются путём введения функциональных заместителей в гетероциклические фрагменты. Среди синтезированных соединений обнаружены редокс- и pH-чувствительные производные, а также краситель, откликающийся на изменение полярности среды. Обнаруженные фотофизические свойства позволяют рассматривать эти соединения в качестве перспективной платформы для создания флуоресцентных зондов, предназначенных для мониторинга локальной полярности, отслеживания динамики кислотности в биологических объектах и разработки средозависимых флуоресцентных маркеров.

III. III. Флуоресцентные конъюгаты аллопрегнанолонa и BODIPY для селективного окрашивания нейронов

В заключительной части работы мы обратились к разработке флуоресцентных конъюгатов на основе аллопрегнанолонa и BODIPY. Эндогенный нейростероид аллопрегнанолон ($3\alpha,5\alpha$ TNP, $3\alpha,5\alpha$ P) обладает седативным, анксиолитическим, противосудорожным действием и является одним из наиболее мощных позитивных аллостерических модуляторов рецепторов *гамма*-аминомасляной кислоты типа A (ГАМК_A) (Рис. 28) [177]. $3\alpha,5\alpha$ TNP играет ключевую роль в формировании и функционировании центральной нервной системы (ЦНС) человека. В связи с чем, изучение молекулярных механизмов действия $3\alpha,5\alpha$ 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.

В 2000-х годах профессор Стив Меннерик внёс значительный вклад в изучение транспорта нейростероидов, их клеточного накопления и механизмов взаимодействия с ГАМК_A-рецепторами, используя конъюгаты $3\alpha,5\alpha$ TNP с 7-нитробенз-2-окса-1,3-диазольного (NBD) флуорофором - C11-NBD- $3\alpha,5\alpha$ P, C2-NBD- $3\alpha,5\alpha$ P и C17-NBD- $3\alpha,5\alpha$ A (Рис. 28) [178-185]. Исследования выявили значительные недостатки флуоресцентных NBD- $3\alpha,5\alpha$ P производных, в том числе пониженную способность потенцировать токи и длительные периоды достижения равновесия по сравнению с $3\alpha,5\alpha$ P. Важно отметить, что конъюгаты $3\alpha,5\alpha$ P с другими флуорофорами, в том числе с BODIPY ранее в литературе не были описаны.

Мы предположили, что эффективной стратегией получения флуоресцентных красителей на основе $3\alpha,5\alpha$ TNP может стать введение BODIPY флуорофора в 21 положение нейростероида с использованием линкера варьируемой длины (Рис. 28). Рациональный дизайн целевых BODIPY- $3\alpha,5\alpha$ TNP учитывал необходимость сохранения α -конфигурации C3-гидроксильной группы и C20-карбонильной группы, поскольку эти функциональные заместители известны как критически важные для связывания с ГАМК_A-рецепторами [177]. В качестве линкеров были выбраны производные природных аминокислот, что обеспечило необходимую молекулярную гибкость целевых соединений.

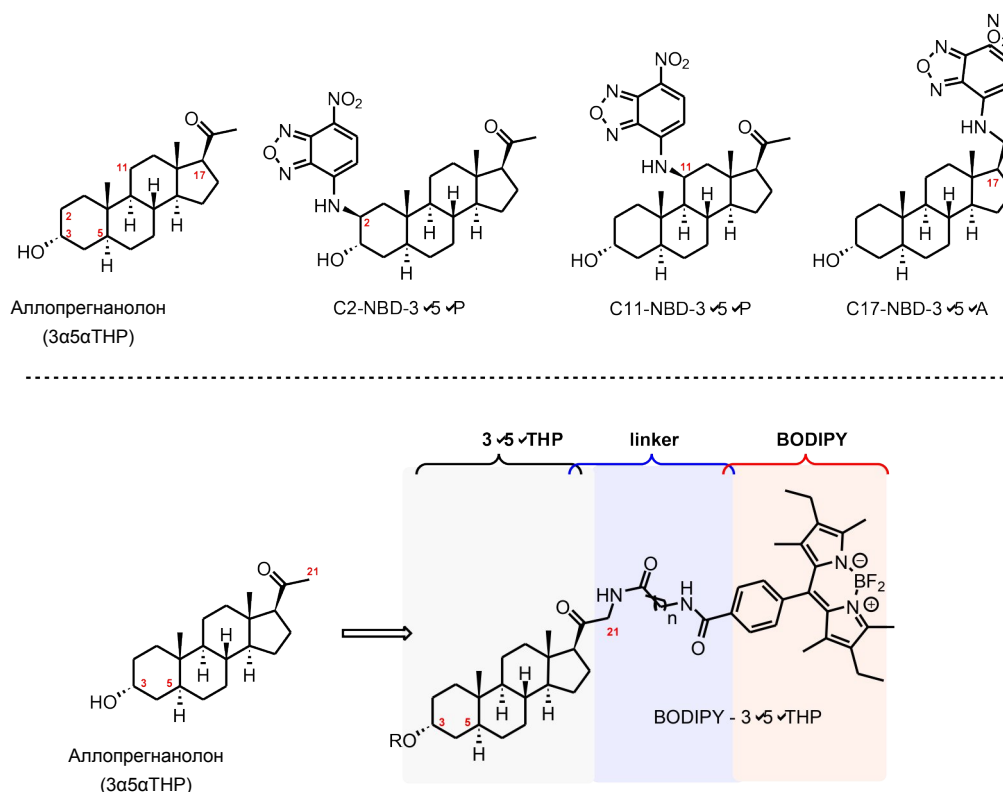


Рисунок 28. Аллопрегнанонон, флуоресцентные зонды NBD-3α5αP и целевые BODIPY-3α5αTHP.

III.III.1. Синтез конъюгатов BODIPY-3α5αTHP

Синтез соединений BODIPY-3α5αTHP проводили согласно Схеме 10. На первом этапе получали *N*-гидроксисукцинимидные эфиры аминокислот **23a,b** (строка а). Для этого аминогруппы соединений **21a,b** защищали обработкой Boc_2O , получая *Boc*-производные **22a,b**. Затем карбоксильные группы соединений **22a,b** активировали с помощью *N*-гидроксисукцинимид в стандартных условиях [186].

Далее были получены целевые производные 3α,5α-THP **28a,b**, содержащие линкерные фрагменты (строка б). Синтез проводили из предшественника **24** через последовательное бромирование по положению С-21 (бромид **25**), нуклеофильное замещение азид-ионом (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 3α-гидроксильной группы стероида.

Заключительная стадия синтеза конъюгатов BODIPY-3α5αTHP **I** и **II** включала активацию карбоксильной группы BODIPY красителя **29** *N*-гидроксисукцинимидом с последующей обработкой аминами **28a,b** (строка с). Соединение BODIPY-3α5αTHP **III**, содержащее концевую гидроксильную группу, было получено щелочным гидролизом трифторацетатного фрагмента в

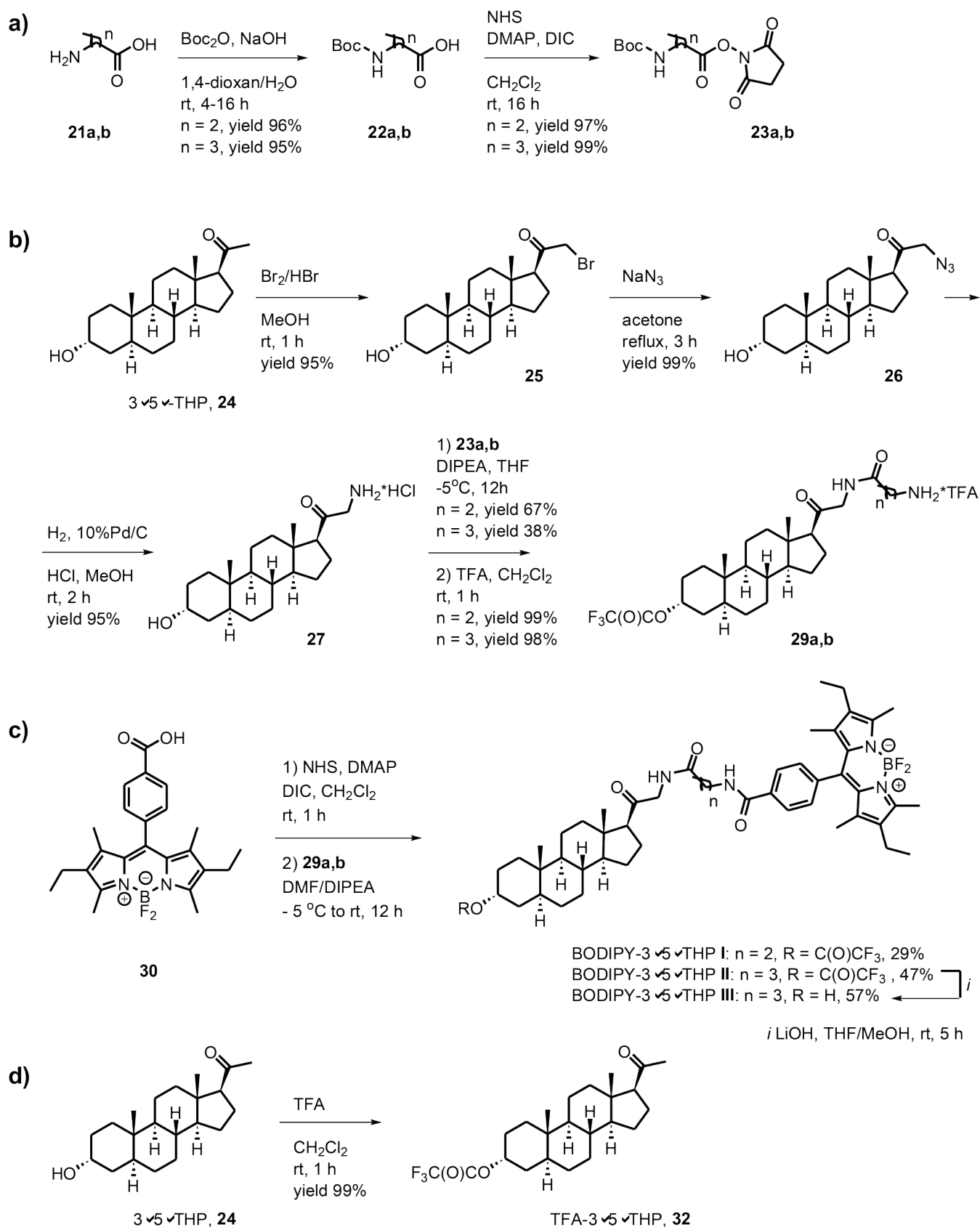


Схема 10. Синтез флуоресцентных конъюгатов BODIPY-3α5αTHP I-III и трифторацетатного производного TFA-3α5αTHP 30.

конъюгате **II**. Выходы BODIPY-3 α 5 α THP с учётом всех синтетических стадий составили 13% для **I**, 12% для **II** и 7% для **III**.

Для проведения биологических исследований в качестве соединения-сравнения был синтезирован трифторацетат 3 α 5 α -THP (TFA-3 α 5 α THP, строка d). Обработка 3 α 5 α -THP (**24**) в мягких условиях позволила получить TFA-3 α 5 α THP **30** с количественным выходом.

Структура и состав всех синтезированных соединений были подтверждены с использованием комплекса физико-химических методов анализа, в том числе ^1H , ^{13}C , ^{11}B и ^{19}F ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS).

В спектрах ^1H ЯМР целевых продуктов BODIPY-3 α 5 α THP **I-III** наблюдались характеристичные сигналы в области 4.25–3.50 м.д., соответствующие протонам метиленовых групп ($\alpha\text{-CH}_2$), связанных с атомами азота амидных фрагментов (-NH-C(O)-), а также характеристичные уширенные синглеты в областях 7.48-7.45 м.д. и 6.56-6.36 м.д., соответствующие протонам амидных групп (-NH-C(O)-) карбоксамидных фрагментов. В ароматической области спектров наблюдались характеристичные дублеты при 7.98 м.д. и 7.37 м.д., соответствующие протонам *para*-замещенного бензольного кольца, конъюгированного с ядром BODIPY. Для соединений BODIPY-3 α 5 α THP **I, II** и **32**, содержащих -OC(O)CF_3 -группу в 3-положении стероидного фрагмента, наблюдался характеристичный мультиплет при 5.23 м.д., соответствующий протону, расположенному в α -положении к сложноэфирному фрагменту.

В спектрах ^{13}C ЯМР соединений BODIPY-3 α 5 α THP **I-III** и **32** наблюдался характеристичный сигнал карбонильной группы аллопрегнанолонового каркаса в области 210.6-205.9 м.д. В области 173.6-165.2 м.д. регистрировались характеристичные сигналы карбонильных атомов углерода карбоксамидных групп.

В спектрах ^{19}F ЯМР соединений BODIPY-3 α 5 α THP **I, II** и **32** наблюдался характеристичный синглет при -75.26 м.д. CF_3 -группы трифторацетатного фрагмента. Для целевых BODIPY-3 α 5 α THP **I-III**, содержащих BODIPY фрагмент, наблюдался квартет в области от -145.60 до -146.70 м.д. соответствующий BF_2 -группе.

III.III.2. Фотофизические свойства конъюгатов BODIPY-3 α 5 α THP

Фотофизические характеристики BODIPY-3 α 5 α THP оказались сходными с таковыми для NBD-3 α 5 α R красителей и полностью соответствуют стандартам флуоресцентных зондов, используемых в биовизуализации [187]. Полученные данные систематизированы в Таблице 7 и на примере BODIPY-3 α 5 α THP **I** представлены на Рисунке 29 (данные для BODIPY-3 α 5 α THP **II,III** см. в Приложении 12). Соединения BODIPY-3 α 5 α THP **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⁻¹см⁻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-3α5αTNP варьировались в диапазоне 72-79%.

Таблица 7. Фотофизические свойства BODIPY-3α5αTNP^[a]

№	BODIPY-3α5αTNP	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$, нм	ϵ_{abs} [моль ⁻¹ Л см ⁻¹]	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$, нм	Стоксов сдвиг [см ⁻¹]	$\Phi_{\text{em}}^{\text{[b.]}}$ [%]
1	I	524	45933	537	462	72
2	II	524	51054	538	497	79
3	III	524	55377	537	462	78

^[a] Спектры были записаны в смеси MeCN:H₂O (1:1) при 298 К.

^[b] Флуоресцеин использован в качестве стандарта ($\Phi = 0.95$ в 0.1 М растворе KOH в EtOH, $\lambda_{\text{ex}} = 494$ нм). Все значения Φ_{em} получены в MeCN при $\lambda_{\text{ex}} = 519$ нм и скорректированы с учётом изменения показателя преломления.

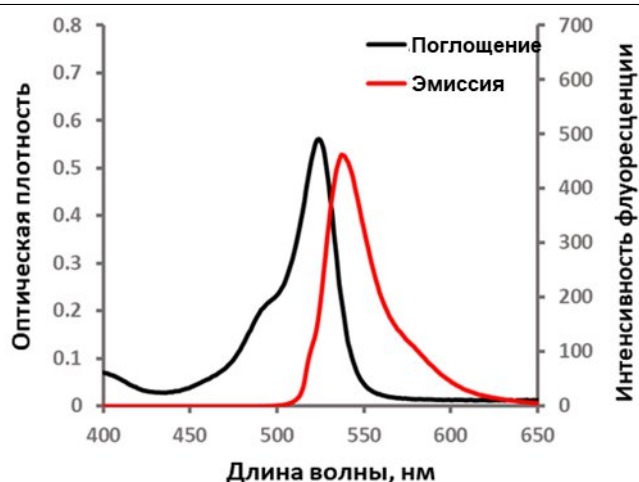


Рисунок 29. Спектры поглощения (чёрная линия) и испускания (красная линия) соединения BODIPY-3α5αTNP III в смеси H₂O/MeCN (1 : 1, об.). Концентрации: 10⁵ М (для регистрации поглощения), 10⁶ М (для регистрации испускания).

III.III.3. Биологические исследования BODIPY-3α5αTNP

На следующем этапе была проведена оценка способности конъюгатов BODIPY-3α5αTNP I-III и TFA-3α5αTNP оказывать модулирующее действие на ГАМК-индуцированные токи в клетках Пуркинью. В качестве препарата-сравнения использовался 3α5αTNP.¹¹ В качестве контрольного ответа использовали 0.3 мкМ ГАМК. Учитывая ограниченную растворимость

¹¹ Автор выражает благодарность С.Н. Колбаеву за любезно предоставленные результаты.

меченых соединений (до 10 мкМ), все вещества тестировали в концентрационном диапазоне 0.03-10 мкМ.

Значение EC_{50} для TFA-3 α 5 α THP составило 0.2 ± 0.08 мкМ и было сопоставимо с данными для 3 α 5 α THP ($EC_{50} = 0.37 \pm 0.14$ мкМ). Из всех исследованных конъюгатов наименьшую модулирующую активность проявил BODIPY-3 α 5 α THP **I**. При максимальной тестируемой концентрации (10 мкМ) наблюдалось увеличение амплитуды тока до $140 \pm 14\%$ от контрольного уровня (100%, $n = 7$, где n - количество независимых экспериментов или количество исследуемых нейронов), и хоть результат был достоверен (статистическая значимость $p = 0.04$), он был значительно слабее эффектов других соединений. В то же время, BODIPY-3 α 5 α THP **II** и **III** демонстрировали четкую дозозависимость с монотонным усилением ГАМК-эргических токов. Максимальный эффект BODIPY-3 α 5 α THP **II** при 10 мкМ составил $220 \pm 25\%$ ($n = 6$), а для BODIPY-3 α 5 α THP **III** $380 \pm 26\%$ ($n = 6$). Оба эффекта были высоко достоверны ($p < 0.01$). Расчетные значения EC_{50} были определены методом линейной интерполяции при условии, что эффект при 10 мкМ соответствует E_{max} , и составили ~ 0.2 мкМ для BODIPY-3 α 5 α THP **II** и ~ 3 мкМ для BODIPY-3 α 5 α THP **III**. Таким образом, несмотря на то, что эффекты TFA-3 α 5 α THP и 3 α 5 α THP на нейроны Пуркинье мозжечка были схожи, для конъюгатов BODIPY-3 α 5 α THP наличие трифторацетатной группы при C3 гидроксильной группе стероидного ядра снижало способность модулировать ГАМК-индуцированные токи (см. сравнение соединений **I**, **II** и **III**).

Для определения возможного перекрытия сайтов связывания BODIPY-3 α 5 α THP и 3 α 5 α THP, наиболее активное соединение BODIPY-3 α 5 α THP **III** и 3 α 5 α THP применяли совместно с ГАМК (0.3 мкМ). Было обнаружено, что при совместном применении 0.1 мкМ 3 α 5 α THP и 10 мкМ BODIPY-3 α 5 α THP **III** амплитуда ответа значительно снижалась до $77 \pm 2\%$ ($n = 7$, $p < 0.001$) по сравнению с применением только 3 α 5 α THP. Наблюдаемое ингибирование можно объяснить перекрытием сайтов связывания BODIPY-3 α 5 α THP **III** и 3 α 5 α THP в ГАМК_A-рецепторах. Поскольку BODIPY-3 α 5 α THP **III** обладает меньшей эффективностью, чем 3 α 5 α THP, можно предположить, что он действует как частичный агонист ГАМК_A-рецепторов, уменьшая общий эффект 3 α 5 α THP при связывании с нейростероидным сайтом ГАМК_A-рецепторов [178, 188, 189].

Полученные данные по способности BODIPY-3 α 5 α THP влиять на ГАМК-индуцированные токи сопоставимы с ранее описанными для NBD-3 α 5 α P, для которых также отмечалось тридцатикратное увеличение EC_{50} по сравнению с 3 α 5 α THP [182]. Несмотря на сниженную активность, конъюгат BODIPY-3 α 5 α THP **III** сохранил способность связываться с нейростероидным сайтом ГАМК_A-рецепторов и демонстрировал фармакологический профиль, характерный для частичных агонистов ГАМК_A-рецепторов. В связи с чем, соединение BODIPY-3 α 5 α THP **III** было далее протестировано в качестве флуоресцентного красителя для визуализации распределения нейронов в тканях мозга.¹²

¹² Автор выражает благодарность С.Н. Колбаеву и Д.В. Самигуллину за предоставленные результаты.

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 [190-192]. Конъюгат BODIPY-3 α 5 α TNP **III** продемонстрировал диффузное окрашивание с общими закономерностями распределения в нейрональных тканях мозжечка (Рис. 30) и гиппокампа (Рис. 31). Внутри нейронов наблюдалось преимущественное накопление красителя вблизи клеточных мембран. Такая картина указывает на преимущественное накопление BODIPY-3 α 5 α TNP **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 TNP **III** проведённая для слоя клеток Пуркинье (Рисунки 30А,Б), показала, что время полураспада флуоресцентного сигнала красителя ($\tau_{1/2}$) составляет 1200 ± 36 с ($n=5$).

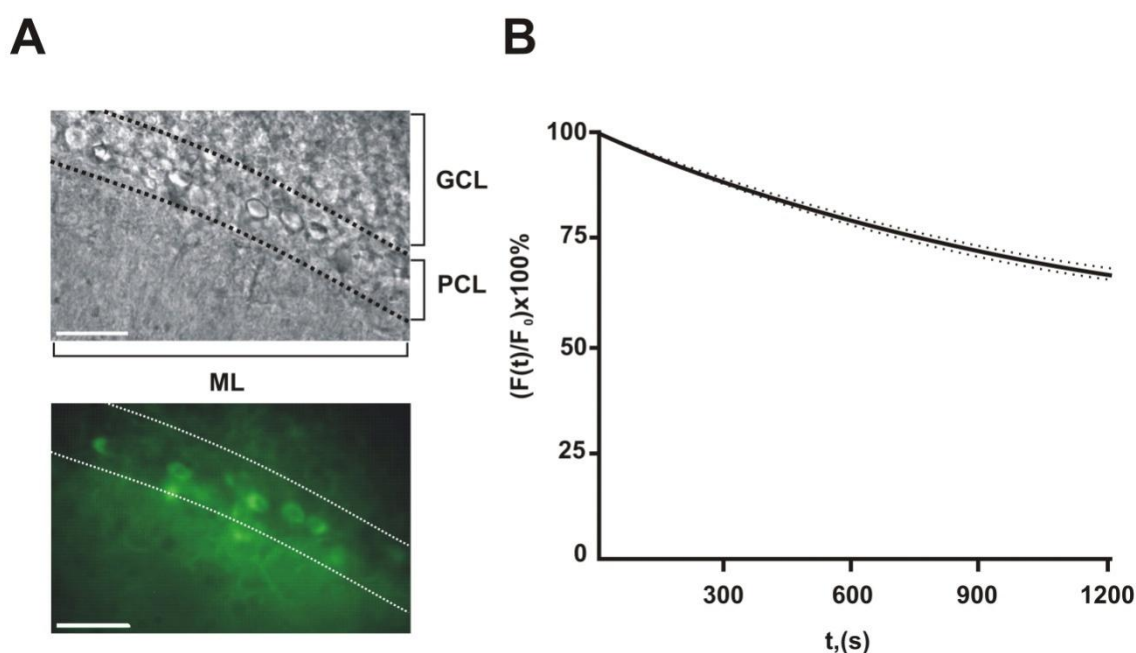


Рисунок 30. Широкопольные изображения среза мозжечка крысы в проходящем свете (верхняя панель) и при флуоресцентном освещении (нижняя панель) (А). Границы молекулярного слоя (ML), слоя клеток Пуркинье (PCL) и зернистого слоя (GCL) обозначены черными (верхняя панель) или белыми (нижняя панель) пунктирными линиями. Масштабная линейка 50 мкм. (В) Усредненная временная динамика интенсивности флуоресценции. Сплошная линия — результат моноэкспоненциальной аппроксимации, пунктирные линии — $\pm$ стандартная ошибка среднего.

Для оценки внутриклеточной локализации соединения BODIPY-3 α 5 α TNP **III** в тканях гиппокампа был применён подход на основе колокализационного анализа с селективным

маркером астроцитарной глии — сульфородамино 101 (SR101) [193]. Конфокальная микроскопия ключевых областей гиппокампа (субикулум, поля CA1-CA3, зубчатая извилина) не выявила значимого перекрытия сигналов BODIPY-3 α 5 α THP **III** и SR101 (Рис. 31; и Приложение 13). Количественный анализ подтвердил отсутствие колокализации: коэффициент корреляции Пирсона (PCC) достоверно отличался от нуля ($p < 0.01$), но не превышал 0.3, что свидетельствует о фоновом уровне накопления соединения в астроцитах. Данные предварительные результаты свидетельствуют об избирательности BODIPY-3 α 5 α THP **III** в отношении основных типов нейронов по сравнению с астроцитарными клетками.

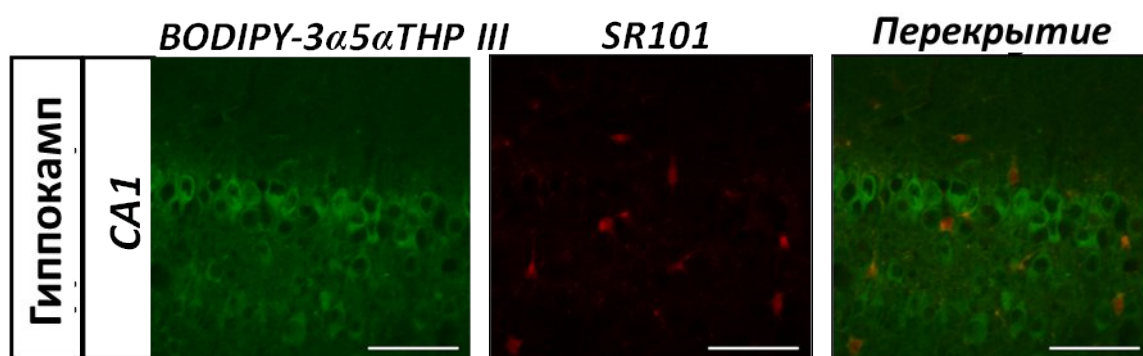


Рисунок 31. Конфокальные микрофотографии распределения BODIPY-3 α 5 α THP **III** и SR101 в области CA1 гиппокампа на нефиксированном срезе мозга крысы. Слева показано распределение BODIPY-3 α 5 α THP **III**, в центре - флуоресцентный сигнал SR101, справа представлено совмещенное изображение. Масштабная 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 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. Наиболее активное соединение BODIPY-3 α 5 α THP **III** вызывало дозозависимое усиление ГАМК-ергических токов с максимальным эффектом $380 \pm 26\%$. Сохранение селективности меченых BODIPY соединений к сайту связывания 3 α 5 α THP на ГАМК_A-рецепторах позволяет классифицировать их как частичные агонисты данного сайта. Флуоресцентная микроскопия с двойным окрашиванием SR101 показала, что BODIPY-3 α 5 α THP **III** эффективно метит клетки Пуркинье и селективно визуализирует нейрональные популяции в срезах гиппокампа, даже в присутствии астроцитов. Новые конъюгаты 3 α 5 α THP-BODIPY могут служить перспективной основой для изучения поглощения, транспорта и биотрансформации нейростероидов. Достоинством предложенной оригинальной стратегия создания флуоресцентных конъюгатов 3 α 5 α THP с использованием линкеров на основе природных

аминокислот является возможность в перспективе контролируемо изменять ключевые характеристики красителей, включая их липофильность, фармакокинетические параметры и спектральные свойства, что особенно важно для таргетной разработки флуоресцентных зондов для биологических исследований связанных с нейростероидами процессов ЦНС.

Подводя общий итог выполнения работы, можно отметить, что нами впервые разработаны синтетические подходы к C2/C6-производным BODIPY, модифицированным цикленовыми, 1,3,4-тиадиазолиновыми, бензоксазольными остатками, а также к BODIPY производным аллопрегнанолона. 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*-замещенными анилинами. Отработан многостадийный метод синтеза первых конъюгатов аллопрегнанолона 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. Демонстрировано, что введение 1,3,4-тиадиазолиновых 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.

IV. 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)-циклензамещенные 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)-замещенных 1,3,4-тиадиазольными/бензаннелированными 1,3-азольными остатками, основанный на реакции окислительного сочетания 2(6)-формил-BODIPY с тиогидразидами/*орто*-замещенными 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 аллопрегнанола и BODIPY. Продemonстрировано, 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.

V. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Структуры всех соединений были установлены с использованием 1D и 2D ЯМР (^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P , ^{11}B) спектроскопии. Спектры 1D и 2D ЯМР регистрировали на приборах Bruker AV-500 (^1H : 500 МГц, ^{13}C : 125 МГц, ^{19}F : 470 МГц, ^{11}B : 160 МГц), Bruker AV-300 (^1H : 300 МГц, ^{13}C : 75 МГц, ^{19}F : 282 МГц, ^{31}P : 32 МГц, ^{11}B : 96 МГц), для растворов в CDCl_3 , $\text{DMCO-}d_6$, $\text{MeOH-}d_4$. Химические сдвиги приведены в м.д. в шкале δ относительно растворителя (^1H : CDCl_3 , $\delta = 7.26$ м.д., $\text{DMCO-}d_6$, $\delta = 2.50$ м.д.; $\text{MeOH-}d_4$, $\delta = 3.31$ м.д.; ^{13}C : CDCl_3 , $\delta = 77.16$ м.д., $\text{DMCO-}d_6$, $\delta = 39.50$ м.д.; $\text{MeOH-}d_4$, $\delta = 49.00$ м.д.). Химические сдвиги ^{19}F , ^{31}P , ^{11}B приведены в м.д. в шкале δ относительно внешних стандартов (CFCl_3 для ^{19}F , 85% H_3PO_4 в H_2O для ^{31}P , $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ для ^{11}B). Константы спин-спинового взаимодействия (J) приведены в герцах (Гц). Мультиплетность сигналов обозначена как: с, синглет; д, дублет; т, триплет; кв, квартет; м, мультиплет; дд, дублет дублетов, дт, дублет триплетов; д. кв, дублет квартетов; тт, триплет триплетов; уш. с, уширенный синглет; уш. т, уширенный триплет.

Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) регистрировали на приборе Bruker MicroTOF, с использованием электрораспылительной ионизации (ESI) с Q-TOF детектированием. ИК-спектры регистрировали на приборе Bruker Vector 22 в виде прессовок с бромидом калия или в тонком слое. Температуры плавления (т. пл.) определяли на столике Кофлера и не корректировали.

Метод обращённо-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) с масс-детектированием использовался для анализа реакционных смесей и характеристики чистых продуктов. Анализы осуществлялись на приборе Thermo-Dionex Ultimate 3000, оснащённым УФ-детектором ThermoDionex DAD 3000-RS и одноквадрупольным масс-спектрометром Thermo Scientific MSQ Plus (ESI ионизация).

Анализ методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) проводили на пластинах с силикагелем (силикагель 60 А, пластины из алюминиевого сплава F254) фирмы “Merck”. Хроматограммы проявляли при помощи ультрафиолетовой лампы (365 нм) и/или с использованием химического окрашивания $[\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4]$, [нингидрин/АсОН/ЕтОН]. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле 60 (230-400 меш). Следующие растворители и реагенты были перегнаны над осушающими реагентами: CH_2Cl_2 (P_2O_5), CHCl_3 (CaH_2), ТГФ (Na), диоксан (Na), ДМФА (CaH_2), метанол и этанол (K_2CO_3).

Если не указано иное, все реагенты приобретены у Sigma-Aldrich или ACROS Organics™ и использованы без дополнительной очистки.

Циклен и DO3AtBu (1,4,7-Трис(трет-бутоксикарбонилметил)-1,4,7,10-тетраазаациклододекан) были предоставлены компанией Chematech. 2-Формил-4,4-дифтор-8-фенил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен (2-формил-BODIPY, **1**) и 2,6-бис(формил)-4,4-дифтор-8-фенил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен (2,6-бисформил-BODIPY, **2**) синтезировали по ранее описанной методике [194]. Фосфорилтиоформиогидразиды **10a-d** были синтезированы в соответствии с методикой, описанной в литературном источнике [195]. Исходное соединение BODIPY с бензойнокислым фрагментом в мезо-положении было синтезировано по ранее описанной методике [196]. Вос-защищенные аминокислоты **22a,b** были получены по известному методу [197]. Бром-замещенный аллопреганолон **25** был получен по стандартной литературной методике [198].

V.1 Получение цикленовых производных 1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацена (BODIPY)

V.1.1 Параметры ВЭЖХ-анализа и препаративной очистки

Для аналитических экспериментов и очистки использовали следующие хроматографические системы:

Условия А: ОФ-ВЭЖХ (колонок Silicycle SiliaChrom C18, 20 x 250 мм) с элюентами ацетонитрил (MeCN) и 0.1 % водная трифторуксусная кислота (водн. TFA, 0.1 %, об./об., pH 2.0) в режиме [10 % MeCN (10 мин), линейный градиент от 10 до 25 % (7.5 мин) MeCN, линейный градиент от 25 до 100 % (60 мин) MeCN] при скорости потока 20.0 мл/мин. Детектирование по УФ проводили при 500 нм.

Условия В: ОФ-ВЭЖХ (колонок Silicycle SiliaChrom C18, 20 x 250 мм) с элюентами ацетонитрил (MeCN) и 0.1 % водная трифторуксусная кислота (водн. TFA, 0.1 %, об./об., pH 2.0) в режиме [10 % MeCN (10 мин), линейный градиент от 10 до 25 % (7.5 мин) MeCN, линейный градиент от 25 до 75 % (60 мин) MeCN] при скорости потока 20.0 мл/мин. Детектирование по УФ проводили при 500 нм.

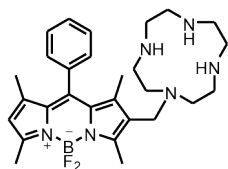
Условия С: ОФ-ВЭЖХ (колонок Silicycle SiliaChrom C18, 20 x 250 мм) с элюентами ацетонитрил (MeCN) и 0.1 % водная трифторуксусная кислота (водн. TFA, 0.1 %, об./об., pH 2.0) в режиме [0 % MeCN (10 мин), линейный градиент от 0 до 75 % (75 мин) MeCN] при скорости потока 20.0 мл/мин. Детектирование по УФ проводили при 500 нм.

Условия D: ОФ-ВЭЖХ (колонок Thermo Hypersil GOLD C18, 5 мкм, 4.6 x 150 мм) с элюентами ацетонитрил (MeCN) и 0.1 % водная трифторуксусная кислота (водн. TFA, 0.1 %, об./об., pH 2.0) в режиме [10 % MeCN (10 мин), линейный градиент от 10 до 25 % (7.5 мин) MeCN, линейный градиент от 25 до 85 % (90 мин) MeCN] при скорости потока 3.5 мл/мин. Детектирование по УФ проводили при 500 нм.

Условия Е: ОФ-ВЭЖХ-МС (колонок Phenomenex Kinetex C18, 2.6 мкм, 2.1 × 50 мм) с элюентами ацетонитрил (MeCN; +0.1 % муравьиная кислота (МК)) и 0.1 % водная муравьиная кислота (водн. МК, pH 2.1) в режиме [5 % MeCN (0.1 мин), затем линейный градиент от 5 % до 100 % (5 мин) MeCN, затем 100% MeCN (3 мин)] при скорости потока 0.5 мл/мин. Детектирование по УФ проводили при 500 нм. ESI-MS низкого разрешения: детектирование в положительном/отрицательном режимах (полное сканирование, 100–1000 а.е.м., тип данных: центроид, напряжение на игле: 3.0 кВ, температура источника ионизации: 350 °С, напряжение на конусе: 75 В и время сканирования: 1 с).

V.1.2 Методики синтеза цикленовых производных BODIPY

2-((1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-ил)метил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен (5a).



К раствору 1,4,7,10-тетраазациклододекана (587 мг, 3.41 ммоль, 4.0 экв.) и AcOH (390 мкл, 6.82 ммоль, 8.0 экв.) в 1,2-дихлорэтано (6 мл) добавили BODIPY **1** (300 мг, 0.85 ммоль, 1.0 экв.). Затем, добавив NaBH(OAc)₃ (1.01 г, 4.77 ммоль, 5.6 экв.) одной порцией, реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в инертной атмосфере в течение 24 ч. Протекание реакции контролировали с помощью ОФ ВЭЖХ (Условия Е). Реакционную смесь промывали насыщенным водным раствором K₂CO₃ (30 мл) и экстрагировали продукт CH₂Cl₂ (3 × 10 мл). Объединенные органические слои сушили над Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали методом препаративной ОФ ВЖЭХ (Условия А, t_R = 23-25 мин). Лиофилизацией фракции, содержащей продукт, была выделена аналитически чистая соль состава **5a·2TFA**. Выход 50% (297 мг), оранжевое твердое вещество.

¹H ЯМР (500 МГц, CD₃OD, в форме соли с TFA): δ 7.60 – 7.54 (м, 3H), 7.35 – 7.31 (м, 2H), 6.15 (с, 1H), 3.64 (с, 2H), 3.25 (уш. т, *J* = 4.8 Гц, 4H), 3.15 (уш. т, *J* = 5.3 Гц, 4H), 2.98 (уш. т, *J* = 5.3 Гц, 4H), 2.85 (уш. т, *J* = 4.8 Гц, 4H), 2.55 (с, 3H), 2.51 (с, 3H), 1.44 (с, 3H), 1.40 (с, 3H) (сигналы NH-групп не наблюдались).

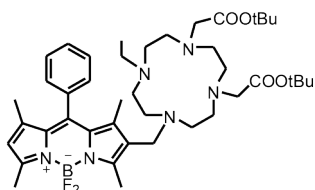
¹³C ЯМР (125 МГц, CD₃OD, в форме соли с TFA, сигнал TFA не учитывался): δ 155.4, 146.6, 144.0, 142.0, 136.1, 133.8, 131.7, 130.7, 130.5, 129.2, 125.0, 123.4, 48.5, 45.5, 43.3, 43.2, 14.7, 13.3, 13.0.

¹⁹F ЯМР (CD₃OD, 470 МГц, в форме соли с TFA): δ -146.5 (кв, ¹*J*_{F-B} = 32.2 Гц, 2F, BF₂), -77.0 (с, 6F, TFA).

¹¹B ЯМР (CD₃OD, 160 МГц, в форме соли с TFA): δ 0.73 (т, ¹*J*_{B-F} = 32.2 Гц).

HRMS: рассчитано для [M+H]⁺ C₂₈H₄₀BF₂N₆ 509.33701; найдено *m/z* 509.33672.

Три-tert-бутил-2,2',2''-(10-((1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-ил)метил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7-триил)триацетат (5b)



К раствору 1,4,7-трис(трет-бутоксикарбонилметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекана (338 мг, 0.57 ммоль, 4.0 экв.) и AcOH (32 мкл, 0.57 ммоль, 4.0 экв.) в 1,2-дихлорэтано (1 мл) добавили BODIPY **1** (50 мг, 0.14 ммоль, 1.0 экв.). Затем, добавив NaBH(OAc)₃ (169 мг, 0.80

ммоль, 5.6 экв.) одной порцией, смесь перемешивали при комнатной температуре в инертной атмосфере в течение 54 ч. Протекание реакции контролировали с помощью ОФ ВЭЖХ (Условия Е). Реакционную смесь промывали насыщенным водным раствором K₂CO₃ (10 мл) и экстрагировали продукт CH₂Cl₂ (3 × 4 мл). Объединенные органические слои сушили над Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали методом препаративной ОФ ВЭЖХ (Условия В, tR = 49 мин). Лиофилизацией фракции, содержащей продукт, была выделена аналитически чистая соль состава **5b·3TFA**. Выход 3% (5 мг), оранжевое твердое вещество.

¹H ЯМР (500 МГц, CD₃OD, в форме соли с TFA): δ 7.64 – 7.56 (м, 3H), 7.42 – 7.36 (м, 2H), 6.27 (с, 1H), 4.48 (уш. с, 2H), 4.17 (уш. с, 2H), 3.62 – 3.35 (м, 10H), 3.22 – 2.92 (м, 8H), 2.62 (с, 3H), 2.55 (с, 3H), 1.59 (с, 9H), 1.49 (с, 3H), 1.44 (с, 9H), 1.45 (с, 18H).

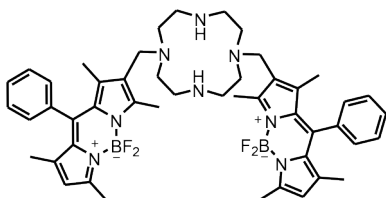
¹³C ЯМР (125 МГц, CDCl₃, в форме соли с TFA, без учета сигнала TFA): δ 169.3, 155.4, 151.7, 147.1, 142.8, 140.6, 134.3, 133.5, 132.3, 130.3, 129.6, 129.5, 127.6, 123.5, 82.7, 54.7, 54.6, 51.2, 49.0, 48.3, 28.1, 28.0, 15.0, 14.7, 13.0, 12.7.

¹⁹F ЯМР (470 МГц, CD₃OD, в форме соли с TFA): δ -146.4 (кв, ¹J_{F-B} = 31.9 Гц, 2F, BF₂), -75.6 (с, 12F, TFA).

¹¹B ЯМР (160 МГц, CD₃OD, в форме соли с TFA): δ 0.68 (т, ¹J_{B-F} = 31.9 Гц).

HRMS: рассчитано для [M+H]⁺ C₄₆H₇₀BF₂N₆O₆ 851.54125; найдено m/z 851.54108.

1,7-бис((1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацен-ил)метил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан (**6**)



К раствору 1,4,7,10-тетраазациклододекана (12 мг, 0.071 ммоль, 1.0 экв.) и AcOH (8 мкл, 0.14 ммоль, 2.0 экв.) в 1,2-дихлорэтано (1 мл) добавили BODIPY **1** (50 мг, 0.14 ммоль, 2.0 экв.). Затем, добавив NaBH(OAc)₃ (83 мг, 0.392 ммоль, 2.8 экв.) одной порцией,

смесь перемешивали при комнатной температуре в инертной атмосфере в течение 24 ч. Протекание реакции контролировали с помощью ОФ ВЭЖХ (Условия Е). Реакционную смесь промывали насыщенным водным раствором K₂CO₃ (10 мл) и экстрагировали продукт CH₂Cl₂ (3

× 4 мл). Объединенные органические слои сушили над Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали методом препаративной ОФ ВЭЖХ (Условия А, t_R = 40-43 мин). Лиофилизацией фракции, содержащей продукт, была выделена аналитически чистая соль состава **6·2TFA**. Выход 14% (11 мг), оранжевое твердое вещество.

¹H ЯМР (500 МГц, CD₃OD, в форме соли с TFA): δ 7.60 – 7.53 (м, 6H), 7.37 – 7.32 (м, 4H), 6.15 (с, 2H), 3.60 (с, 4H), 3.17 (уш. с, 8H), 2.78 (уш. с, 8H), 2.55 (с, 6H), 2.52 (с, 6H), 1.44 (с, 6H), 1.41 (с, 6H) (сигналы NH-групп не наблюдались).

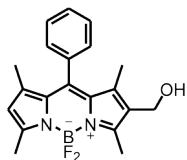
¹³C ЯМР (125 МГц, CD₃OD, в форме соли с TFA, без учета сигнала TFA): δ 159.2, 154.5, 146.5, 144.0, 141.9, 136.2, 133.6, 131.7, 130.7, 130.6, 129.2, 123.4, 44.9, 14.7, 13.7, 13.3.

¹⁹F ЯМР (470 МГц, CD₃OD, в форме соли с TFA): δ -146.6 (кв, ¹J_{F-B} = 32.1 Гц, 4F, BF₂), -77.0 (с, 6F, TFA).

¹¹B ЯМР (160 МГц, CD₃OD, в форме соли с TFA): δ 0.73 (т, ¹J_{B-F} = 32.1 Гц).

HRMS: рассчитано для [M+H]⁺ C₄₈H₅₉B₂F₄N₈ 845.49794; найдено m/z 845.49781.

2-((гидроксил)метил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-с-индацен (7)



Соединение было получено как побочный продукт при синтезе соединения **5b**.

Очистка методом ОФ-ВЭЖХ (система В, t_R = 57 мин) с последующей лиофилизацией дала целевой продукт. Выход 67% (33 мг), оранжевое твердое вещество, Т. пл. 156-160 °С.

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃): δ 7.55 – 7.46 (м, 3H), 7.32 – 7.24 (м, 2H), 6.00 (с, 1H), 4.42 (с, 2H), 2.62 (с, 3H), 2.57 (с, 3H), 1.40 (с, 3H), 1.37 (с, 3H) (сигнал ОН-группы не наблюдался).

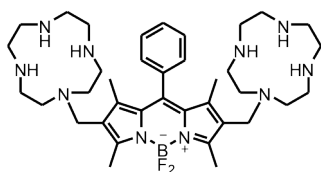
¹³C ЯМР (125 МГц, CDCl₃): δ 156.6, 154.5, 144.0, 142.2, 140.9, 135.2, 132.0, 130.8, 129.6, 129.4, 129.2, 128.1, 121.8, 68.1, 14.8, 14.6, 12.6, 11.8.

¹⁹F ЯМР (470 МГц, CDCl₃): δ -145.9 (кв, ¹J_{F-B} = 33.0 Гц, 2F, BF₂).

¹¹B ЯМР (160 МГц, CDCl₃): δ 0.79 (т, ¹J_{B-F} = 33.0 Гц).

HRMS: рассчитано для [M + Na]⁺ C₂₀H₂₁BF₂N₂ONa 377.16072; найдено m/z 377.16055.

2,6-бис((1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-ил)метил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-с-индацен (8a)



К раствору 1,4,7,10-тетраазациклододекана (181 мг, 1.05 ммоль, 8.0 экв.) и AcOH (120 мкл, 2.11 ммоль, 16.0 экв.) в 1,2-дихлорэтано (1 мл) добавили BODIPY **2** (50 мг, 0.13 ммоль, 1.0 экв.). Затем, добавив NaBH(OAc)₃ (313 мг, 1.48 ммоль, 11.2 экв.) одной порцией, смесь

перемешивали при комнатной температуре в инертной атмосфере в течение 24 ч. Процесс реакции контролировали с помощью ОФ ВЭЖХ (Условия Е). Реакционную смесь промывали насыщенным водным раствором K₂CO₃ (10 мл) и экстрагировали продукт CH₂Cl₂ (3 × 4 мл). Объединенные органические слои сушили над Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали методом препаративной ОФ ВЭЖХ (Условия С, tR = 34-37 мин). Лиофилизацией фракции, содержащей продукт, была выделена аналитически чистая соль состава **8a·5TFA**. Выход 11% (16 мг), оранжевое твердое вещество.

¹H ЯМР (500 МГц, CD₃OD, в форме соли с TFA): δ 7.64 – 7.55 (м, 3H), 7.41 – 7.33 (м, 2H), 3.63 (с, 4H), 3.30 (уш. т, *J* = 5.3 Гц, 8H), 3.15 (уш. т, *J* = 5.3 Гц, 8H), 2.98 (уш. т, *J* = 5.3 Гц, 8H), 2.83 (уш. т, *J* = 5.3 Гц, 8H), 2.60 (с, 6H), 1.46 (с, 6H) (сигналы NH-групп не наблюдались).

¹³C ЯМР (125 МГц, CD₃OD, в форме соли с TFA, без учета сигнала TFA): δ 157.0, 144.8, 144.6, 144.0, 143.6, 136.3, 136.1, 133.5, 132.6, 130.8, 130.7, 129.2, 126.2, 47.4, 45.6, 43.3, 43.2, 13.6, 13.3.

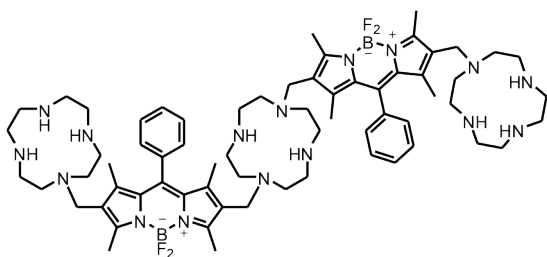
¹⁹F ЯМР (470 МГц, CD₃OD, в форме соли с TFA): δ -146.0 (кв, ¹*J*_{F-B} = 39.1 Гц, 2F, BF₂), -77.1 (с, 15F, TFA).

¹¹B ЯМР (160 МГц, CD₃OD, в форме соли с TFA): δ 0.74 (т, ¹*J*_{B-F} = 31.9 Гц).

HRMS: рассчитано для [M+TFA+H]⁺ C₃₉H₆₁BF₅N₁₀O₂ 807.49867; найдено *m/z* 807.49740.

Элементный анализ: рассчитано для C₄₇H₇₆BF₁₇N₁₀O₁₁ [**8a**+5TFA+6H₂O] %: C, 43.73; H, 5.93; N, 10.83. Найдено %: C, 43.42; H, 5.43; N, 10.52.

1,7-бис((2-((1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-ил)метил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-с-индацен-ил)метил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан (**8b**)



К раствору 1,4,7,10-тетраазациклододекана (181 мг, 1.05 ммоль, 8.0 экв.) и AcOH (120 мкл, 2.11 ммоль, 16.0 экв.) в 1,2-дихлорэтано (1 мл) добавили BODIPY **2** (50 мг, 0.13 ммоль, 1.0 экв.). Затем, добавив NaBH(OAc)₃ (313 мг, 1.48 ммоль, 11.2 экв.) одной порцией, смесь

перемешивали при комнатной температуре в инертной атмосфере в течение 24 ч. Протекание реакции контролировали с помощью ОФ ВЭЖХ (Условия Е). Реакционную смесь промывали

насыщенным водным раствором K_2CO_3 (10 мл) и экстрагировали продукт CH_2Cl_2 (3×4 мл). Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали методом препаративной ОФ ВЭЖХ (Условия С, $t_R = 41$ мин). Лиофилизацией фракции, содержащей продукт, была выделена аналитически чистая соль состава **8b**·**9TFA**. Выход 5% (7 мг), оранжевое твердое вещество.

1H ЯМР (500 МГц, CD_3OD , в форме соли с TFA): δ 7.62 – 7.57 (м, 6H), 7.39 – 7.35 (м, 4H), 3.65 – 3.57 (м, 8H), 3.28 – 2.67 (м, 48H), 2.61 (с, 6H), 2.59 (с, 6H), 1.46 (с, 6H), 1.45 (с, 6H) (сигналы NH-групп не наблюдались).

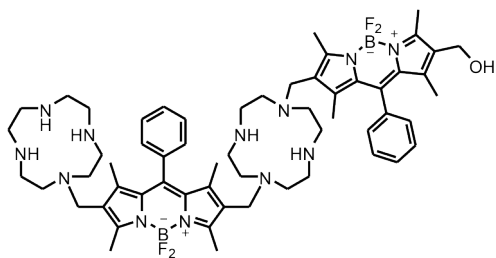
^{13}C ЯМР (125 МГц, CD_3OD , в форме соли с TFA, без учета сигнала TFA): δ 157.9, 144.4, 144.1, 136.2, 132.8, 130.8, 130.7, 129.2, 47.5, 45.6, 43.3, 43.2, 13.8, 13.5, 13.4, 13.2.

^{19}F ЯМР (470 МГц, CD_3OD , в форме соли с TFA): δ -146.2 (кв, $^1J_{F-B} = 29.9$ Гц, 4F, BF_2), -77.0 (с, 27F, TFA)

^{11}B ЯМР (160 МГц, CD_3OD , в форме соли с TFA): δ 0.75 (т, $^1J_{B-F} = 29.9$ Гц)

HRMS: рассчитано для $[M+3H]^{3+}$ $C_{66}H_{101}B_2F_4N_{16}$ 405.28336; найдено m/z 405.28384.

(2-((1-((2-((1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-ил)метил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-с-индацен-6-ил)метил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-7-ил)метил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-с-индацен-6-ил)метанол (8с)



К раствору 1,4,7,10-тетраазациклододекана (181 мг, 1.05 ммоль, 8.0 экв.) и $AcOH$ (120 мкл, 2.11 ммоль, 16.0 экв.) в 1,2-дихлорэтане (1 мл) добавили BODIPY **2** (50 мг, 0.13 ммоль, 1.0 экв.). Затем, добавив $NaBH(OAc)_3$ (313 мг, 1.48 ммоль, 11.2 экв.) одной порцией, смесь перемешивали при комнатной температуре в инертной атмосфере в течение

24 ч. Протекание реакции контролировали с помощью ОФ ВЭЖХ (система Е). Реакционную смесь промывали насыщенным водным раствором K_2CO_3 (10 мл) и экстрагировали продукт CH_2Cl_2 (3×4 мл). Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток был очищен методом препаративной ОФ ВЭЖХ (Условия С, $t_R = 46$ мин). Лиофилизацией фракции, содержащей продукт, была выделена аналитически чистая соль состава **8с**·**5TFA**. Выход 7% (7 мг), оранжевое твердое вещество.

^1H ЯМР (500 МГц, CD_3OD , в форме соли с TFA): δ 7.64 – 7.54 (м, 6H), 7.43 – 7.29 (м, 4H), 4.38 (с, 2H), 3.64 – 3.58 (м, 6H), 3.28 – 3.22 (уш.с, 4H), 3.21 – 3.02 (м, 12H), 3.01 – 2.94 (уш.с, 4H), 2.88 – 2.80 (уш.с, 4H), 2.79 – 2.69 (уш.с, 8H), 2.63 – 2.54 (м, 12H), 1.44 – 1.40 (м, 12H) (сигналы NH- и OH-групп не наблюдались).

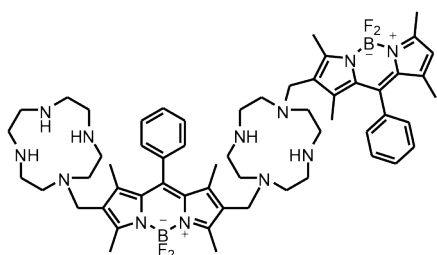
^{13}C ЯМР (125 МГц, CD_3OD , в форме соли с TFA, без учета сигнала TFA): δ 144.6, 144.4, 144.2, 144.0, 143.4, 142.3, 136.3, 136.2, 132.6, 132.4, 132.1, 131.0, 130.8, 130.6, 129.3, 129.2, 125.9, 125.0, 64.5, 57.5, 54.0, 47.5, 45.6, 43.3, 43.2, 13.8, 13.7, 13.5, 13.4, 13.2, 12.2.

^{19}F ЯМР (470 МГц, CD_3OD , в форме соли с TFA): δ (-)145.9 – (-)146.4 (м, 4F, BF_2), -76.9 (с, 15F, TFA).

^{11}B ЯМР (160 МГц, CD_3OD , в форме соли с TFA): δ 0.76 (т, $^1J_{\text{B-F}} = 32.0$ Гц).

HRMS: рассчитано для $[M+2H]^{2+}$ $\text{C}_{58}\text{H}_{82}\text{B}_2\text{F}_4\text{N}_{12}\text{O}_2$ 530.34229; найдено m/z 530.34204.

2-((1-((2-((1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-ил)метил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-с-индацен-6-ил)метил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-7-ил)метил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-с-индацен (8d)



К раствору 1,4,7,10-тетраазациклододекана (91 мг, 0.53 ммоль, 4.0 экв.) и AcOH (60 мкл, 1.06 ммоль, 8.0 экв.) в 1,2-дихлорэтано (1 мл) добавили BODIPY **2** (50 мг, 0.13 ммоль, 1.0 экв.). Затем, добавив $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (157 мг, 0.76 ммоль, 5.6 экв.) тремя порциями в течение 6 ч, смесь перемешивали при комнатной температуре в инертной атмосфере еще 24 ч. Протекание реакции контролировали с помощью ОФ ВЭЖХ (Условия Е). Реакционную смесь гасили добавлением насыщенного раствора K_2CO_3 и экстрагировали продукт метиленхлоридом. Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток был очищен методом препаративной ОФ ВЭЖХ (Условия С, $t_R = 56$ мин). Лиофилизацией фракции, содержащей продукт, была выделена аналитически чистая соль состава **8d**·4TFA. Выход 2% (1 мг), оранжевое твердое вещество.

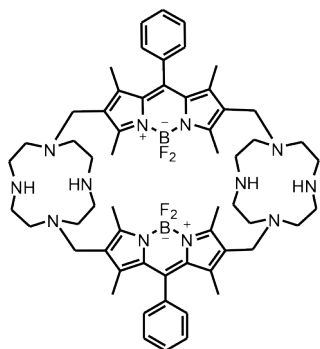
^1H ЯМР (500 МГц, CD_3OD , в форме соли с TFA): δ 7.62 – 7.55 (м, 6H), 7.39 – 7.32 (м, 4H), 6.13 (с, 1H), 3.60 – 3.50 (м, 6H), 3.28 – 3.23 (уш.с, 4H), 3.18 – 3.13 (уш.с, 4H), 3.01 – 2.96 (уш.с, 4H), 2.88 – 2.82 (уш.с, 4H), 2.74 – 2.63 (уш.с, 12H), 2.63 – 2.50 (м, 16H), 1.49 – 1.40 (м, 12H) (сигналы NH-групп не наблюдались).

^{19}F ЯМР (470 МГц, CD_3OD , в форме соли с TFA): δ (-)145.8 – (-)146.1 (м, 2F, BF_2), (-)146.4 – (-)146.7 (м, 2F, BF_2), -77.0 (с, 12F, TFA).

^{11}B ЯМР (160 МГц, CD_3OD , в форме соли с TFA): δ 0.76 (т, $^1J_{\text{B-F}} = 32.3 \text{ Гц}$).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{57}\text{H}_{79}\text{B}_2\text{F}_4\text{N}_{12}$ 1029.6685; найдено m/z 1029.6706.

Макроцикл **9**



К раствору 1,4,7,10-тетраазациклододекана (91 мг, 0.58 ммоль, 4.0 экв.) и AcOH (60 мкл, 1.06 ммоль, 8.0 экв.) в 1,2-дихлорэтане (1 мл) добавили BODIPY **2** (50 мг, 0.13 ммоль, 1.0 экв.). Затем, добавив $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (160 мг, 0.74 ммоль, 5.6 экв.) тремя порциями в течение 6 ч, смесь перемешивали при комнатной температуре в инертной атмосфере в течение 24 ч. Протекание реакции контролировали с помощью ОФ ВЭЖХ (Условия Е). Реакционную смесь промывали насыщенным водным раствором K_2CO_3 (10 мл) и экстрагировали продукт CH_2Cl_2 (3×4 мл). Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток был очищен методом препаративной ОФ ВЭЖХ (Условия D, $t_R = 47\text{--}48$ мин). Лиофилизацией фракции, содержащей продукт, была выделена аналитически чистая соль состава **9**·7TFA. Выход 10% (10 мг), оранжевое твердое вещество.

^1H ЯМР (500 МГц, CD_3OD , в форме соли с TFA): δ 7.70 – 7.50 (м, 8H), 7.41 – 7.24 (м, 2H), 3.66 – 3.50 (м, 8H), 3.20 – 2.95 (уш. с, 16H), 2.94 – 2.73 (уш. с, 16H), 2.5 (с, 12H), 1.43 (с, 12H) (сигналы NH-групп не наблюдались).

^{13}C ЯМР (125 МГц, CD_3OD , в форме соли с TFA, без учета сигнала TFA): δ 145.1, 142.9, 139.9, 136.1, 132.8, 130.7, 129.3, 128.0, 51.8, 45.7, 14.1, 12.8.

^{19}F ЯМР (470 МГц, CD_3OD , в форме соли с TFA): δ (-)143.2 – (-)147.2 (м, 4F, BF_2), -77.0 (с, 21F, TFA).

^{11}B ЯМР (160 МГц, CD_3OD , в форме соли с TFA): δ 0.69 (т, $^1J_{\text{B-F}} = 31.9 \text{ Гц}$).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{58}\text{H}_{79}\text{B}_2\text{F}_4\text{N}_{12}$ 1041.66674; найдено m/z 1041.66546.

V.2 Получение 2,6-тиадиазол производных BODIPY

V.2.1 Получение серии 2,6-тиадиазол производных

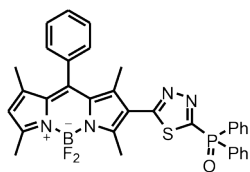
Методика А:

Гидразид **10** (0.156 ммоль, 1.1 экв.) и TsOH (3 мг, 0.014 ммоль, 0.1 экв.) добавили к суспензии альдегида (0.142 ммоль, 1.0 экв.) в этаноле (5 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 30 минут при температуре 50 °С. Затем к смеси добавили раствор DDQ (35 мг, 0.156 ммоль) в этаноле (1 мл) и перемешивали ещё 30 минут при комнатной температуре. Реакционную смесь упарили при пониженном давлении, растворили в CH₂Cl₂ (20 мл) и промыли водой (7 мл × 3). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очистили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле.

Методика Б:

Гидразид **10** и TsOH добавили к раствору альдегида в DMF (5 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 1 часа при температуре 80 °С. Затем к смеси добавили раствор DDQ в DMF (1 мл) и перемешивали ещё 30 минут при 80 °С. Реакционную смесь вылили в воду (20 мл) и экстрагировали CH₂Cl₂ (7 мл × 3). Объединённые органические слои промыли водой (7 мл × 8), сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очистили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле.

(5-(1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-2-ил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)дифенилфосфиноксид (**11a**).



Продукт **11a** синтезировали в соответствии с общей методикой Б, используя гидразид **10a** (43 мг, 0.156 ммоль, 1.1 экв.), TsOH (3 мг, 0.014 ммоль, 0.1 экв.), альдегид **1** (50 мг, 0.142 ммоль, 1.0 экв.), DDQ (35 мг, 0.156 ммоль, 1.1 экв.) и DMF (5 + 1 мл). Очистку проводили методом колоночной хроматографии (CH₂Cl₂ / MeOH, 100 : 1), в результате чего получили продукт в виде красно-оранжевого твёрдого вещества. Выход 83% (72 мг), Т. пл. > 246-248 °С.

¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃): δ 8.02 – 7.93 (м, 4H), 7.59 – 7.48 (м, 9H), 7.33 – 7.28 (м, 2H), 6.13 (с, 1H), 2.86 (с, 3H), 2.62 (с, 3H), 1.60 (с, 3H), 1.42 (с, 3H).

¹³C ЯМР (75 МГц, CDCl₃): δ 165.8, 165.2, 164.2, 160.6, 153.0, 146.8, 143.1, 139.6, 134.5, 133.6, 132.9 (д, *J* = 2.8 Гц, ×2), 131.8 (д, *J* = 10.5 Гц, ×4), 130.79 (д, *J* = 110.9 Гц, ×2), 130.4, 129.6, 129.5 (×2), 128.9 (д, *J* = 13.1 Гц, ×4), 127.9 (×2), 123.6, 15.1, 14.9, 14.5, 13.2.

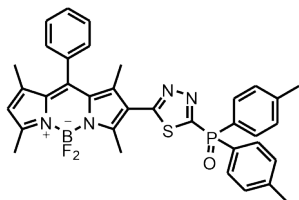
¹⁹F ЯМР (282 МГц, CDCl₃): δ -145.7 (кв, ¹*J*_{F-B} = 32.4 Гц).

³¹P ЯМР (121 МГц, CDCl₃): δ 19.62 (с).

^{11}B ЯМР (96 МГц, CDCl_3): δ 0.78 (т, $^1J_{\text{B-F}} = 32.4$ Гц).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{33}\text{H}_{29}\text{BF}_2\text{N}_4\text{OPS}$ 609.1861; найдено m/z 609.1846.

(5-(1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-2-ил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)ди(*n*-толил)фосфиноксид (11b).



Продукт **11b** синтезировали в соответствии с общей методикой Б, используя гидразид **10b** (47 мг, 0.156 ммоль, 1.1 экв.), TsOH (3 мг, 0.014 ммоль, 0.1 экв.), альдегид **1** (50 мг, 0.142 ммоль, 1.0 экв.), DDQ (35 мг, 0.156 ммоль, 1.1 экв.) и DMF (5 + 1 мл). Очистку проводили методом колоночной хроматографии (CH_2Cl_2 / MeOH, 100 : 1), в результате чего получили продукт в виде красно-оранжевого твёрдого вещества. Выход 64% (58 мг), Т. пл. > 235-237 °С.

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ 7.88 – 7.77 (м, 4H), 7.56 – 7.49 (м, 3H), 7.34 – 7.27 (м, 6H), 6.11 (с, 1H), 2.83 (с, 3H), 2.61 (с, 3H), 2.39 (с, 6H), 1.57 (с, 3H), 1.40 (с, 3H).

^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3): δ 166.4, 165.0, 164.9, 160.5, 153.1, 146.7, 143.6 (д, $J = 2.9$ Гц, $\times 2$), 143.1, 139.7, 134.5, 133.5, 131.9 (д, $J = 10.9$ Гц, $\times 4$), 130.4, 129.6, 129.6 (д, $J = 13.5$ Гц, $\times 4$), 129.5 ($\times 2$), 127.9 ($\times 2$), 127.7 (д, $J = 113.5$ Гц, $\times 2$), 123.6, 21.8 ($\times 2$), 15.1, 14.9, 14.5, 13.3.

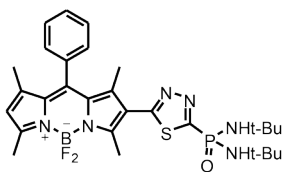
^{19}F ЯМР (282 МГц, CDCl_3): δ -145.7 (кв, $^1J_{\text{F-B}} = 32.2$ Гц).

^{31}P ЯМР (121 МГц, CDCl_3): δ 20.40 (с).

^{11}B ЯМР (96 МГц, CDCl_3): δ 0.77 (т, $^1J_{\text{B-F}} = 32.2$ Гц).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{35}\text{H}_{33}\text{BF}_2\text{N}_4\text{OPS}$ 637.2174; найдено m/z 637.2152.

2-(5-(бис(трет-бутиламино)фосфорил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен (11c).



Продукт **11c** синтезировали в соответствии с общей методикой Б, используя гидразид **10c** (42 мг, 0.156 ммоль, 1.1 экв.), TsOH (3 мг, 0.014 ммоль, 0.1 экв.), альдегид **1** (50 мг, 0.142 ммоль, 1.0 экв.), DDQ (35 мг, 0.156 ммоль, 1.1 экв.) и DMF (5 + 1 мл). Очистку проводили методом колоночной хроматографии (CH_2Cl_2 / MeOH, 100 : 1), в результате чего получили продукт в виде красно-оранжевого твёрдого вещества. Выход 70% (59 мг), Т. пл. > 236-240 °С.

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ 7.55 – 7.49 (м, 3H), 7.33 – 7.28 (м, 2H), 6.10 (с, 1H), 3.11 (уш. с, 2H), 2.80 (с, 3H), 2.60 (с, 3H), 1.56 (с, 3H), 1.40 (с, 3H), 1.33 (с, 18H).

^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3): δ 169.7, 167.5, 164.7, 160.3, 153.0, 146.6, 143.1, 139.7, 134.6, 133.4, 130.4, 129.6 ($\times 2$), 128.0 ($\times 2$), 123.5, 120.0, 52.7 ($\times 2$), 32.0 (д, $J = 4.4$ Гц, $\times 6$), 15.1, 14.9, 14.3, 13.2.

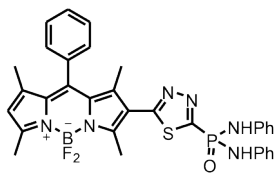
^{19}F ЯМР (282 МГц, CDCl_3): δ -145.9 (кв, $^1J_{\text{F-B}} = 32.3 \text{ Гц}$).

^{31}P ЯМР (121 МГц, CDCl_3): δ 2.17 (с).

^{11}B ЯМР (96 МГц, CDCl_3): δ 0.78 (т, $^1J_{\text{B-F}} = 32.3 \text{ Гц}$).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{BF}_2\text{N}_6\text{OPS}$ 599.2705; найдено m/z 599.2697.

2-(5-(бис(фениламино)фосфорил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацен (11d).



Продукт **11d** синтезировали в соответствии с общей методикой Б, используя гидразид **10d** (49 мг, 0.156 ммоль, 1.1 экв.), TsOH (3 мг, 0.014 ммоль, 0.1 экв.), альдегид **1** (50 мг, 0.142 ммоль, 1.0 экв.), DDQ (35 мг, 0.156 ммоль, 1.1 экв.) и DMF (5 + 1 мл). Очистку проводили методом колоночной хроматографии (CH_2Cl_2 / MeOH, 100 : 1), в результате чего получили продукт в виде красно-оранжевого твёрдого вещества. Выход 16% (15 мг), Т. пл. = 141-144 °С.

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ 7.56 – 7.51 (м, 3H), 7.34 – 7.27 (м, 2H), 7.20 – 7.15 (м, 8H), 7.01 – 6.94 (м, 2H), 6.36 (д, $J = 10.5 \text{ Гц}$, 2H), 6.13 (с, 1H), 2.79 (с, 3H), 2.62 (с, 3H), 1.54 (с, 3H), 1.42 (с, 3H). ^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3): δ 147.0, 143.1, 138.3, 134.5, 129.8, 129.7 ($\times 2$), 129.6, 128.0 ($\times 2$), 123.8, 123.3, 119.3 (д, $J = 6.5 \text{ Гц}$, $\times 4$), 15.2, 15.0, 14.4, 13.3.

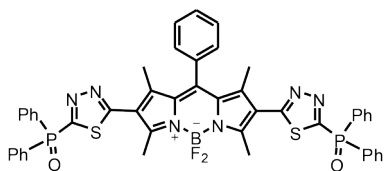
^{19}F ЯМР (282 МГц, CDCl_3): δ -145.7 (кв, $^1J_{\text{F-B}} = 32.0 \text{ Гц}$).

^{31}P ЯМР (121 МГц, CDCl_3): δ 3.76 (с).

^{11}B ЯМР (96 МГц, CDCl_3): δ 0.76 (т, $^1J_{\text{B-F}} = 32.0 \text{ Гц}$).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{33}\text{H}_{31}\text{BF}_2\text{N}_6\text{OPS}$ 639.2079; найдено m/z 639.2069.

((1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацен-2,6-диил)бис(1,3,4-тиадиазол-2,5-диил))бис(дифенилфосфиноксид) (12a).



Продукт **12a** синтезировали в соответствии с общей методикой Б, используя гидразид **10a** (80 мг, 0.290 ммоль, 2.2 экв.), TsOH (5 мг, 0.026 ммоль, 0.2 экв.), альдегид **2** (50 мг, 0.132 ммоль, 1.0 экв.), DDQ (66 мг, 0.290 ммоль, 2.2 экв.) и DMF (5 + 1 мл). Очистку проводили методом колоночной хроматографии (CH_2Cl_2 / MeOH, 100 : 1), в результате чего получили продукт в виде красно-оранжевого твёрдого вещества. Выход 50% (58 мг), Т. пл. > 151-154 °С.

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ 8.01 – 7.91 (м, 8H), 7.61 – 7.47 (м, 15H), 7.37 – 7.29 (м, 2H), 2.88 (с, 6H), 1.61 (с, 6H).

^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3): δ 166.8 ($\times 2$), 165.3 ($\times 2$), 164.3 (д, $J = 2.8 \text{ Гц}$, $\times 2$), 157.4 ($\times 2$), 145.4 ($\times 2$), 143.5 ($\times 2$), 134.0 ($\times 2$), 133.1 (д, $J = 2.7 \text{ Гц}$, $\times 4$), 131.85 (д, $J = 10.5 \text{ Гц}$, $\times 8$), 130.61 (д, $J = 111.0 \text{ Гц}$, $\times 4$), 130.22, 130.0 ($\times 2$), 128.96 (д, $J = 13.1 \text{ Гц}$, $\times 8$), 127.8 ($\times 2$), 121.8, 14.9 ($\times 2$), 13.8 ($\times 2$).

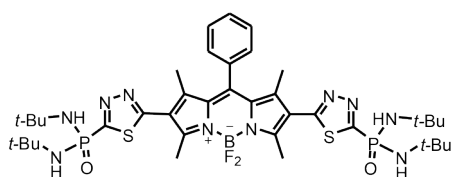
^{19}F ЯМР (282 МГц, CDCl_3): δ -144.8 (кв, $^1J_{\text{F-B}} = 31.8 \text{ Гц}$).

^{31}P ЯМР (121 МГц, CDCl_3): δ 19.70 (с).

^{11}B ЯМР (96 МГц, CDCl_3): δ 0.81 (т, $^1J_{\text{B-F}} = 31.8 \text{ Гц}$).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{47}\text{H}_{38}\text{BF}_2\text{N}_6\text{O}_2\text{P}_2\text{S}_2$ 893.2037; найдено m/z 893.2063.

2,6-бис(5-(бис(третбутиламино)фосфорил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацен (12b).



Продукт **12b** синтезировали в соответствии с общей методикой Б, используя гидразид **10b** (77 мг, 0.290 ммоль, 2.2 экв.), TsOH (5 мг, 0.026 ммоль, 0.2 экв.), альдегид **2** (50 мг, 0.132 ммоль, 1.0 экв.), DDQ (66 мг, 0.290 ммоль, 2.2 экв.) и DMF (5 + 1 мл).

Очистку проводили методом колоночной хроматографии (CH_2Cl_2 / MeOH, 100 : 1), в результате чего получили продукт в виде красно-оранжевого твёрдого вещества. Выход 58% (67 мг), Т. пл. > 179 - 182°C .

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ 7.59 – 7.52 (м, 3H), 7.37 – 7.29 (м, 2H), 3.22 (д, $J = 10.4 \text{ Гц}$, 4H), 2.84 (с, 6H), 1.58 (с, 6H), 1.33 (с, 36H).

^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3): δ 169.7, 168.4, 163.80 (д, $J = 3.3 \text{ Гц}$, $\times 2$), 157.1, 145.2, 143.2, 134.1, 132.0, 130.1, 129.9 ($\times 2$), 127.8 ($\times 2$), 122.1, 52.8 ($\times 4$), 32.0 (д, $J = 4.3 \text{ Гц}$, $\times 12$), 14.7 ($\times 2$), 13.7 ($\times 2$).

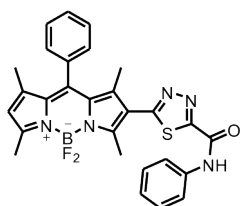
^{19}F ЯМР (282 МГц, CDCl_3): δ -144.8 (кв, $^1J_{\text{F-B}} = 31.8 \text{ Гц}$).

^{31}P ЯМР (121 МГц, CDCl_3): δ 2.00 (с).

^{11}B ЯМР (96 МГц, CDCl_3): δ 0.82 (т, $^1J_{\text{B-F}} = 31.8 \text{ Гц}$).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{39}\text{H}_{58}\text{BF}_2\text{N}_{10}\text{O}_2\text{P}_2\text{S}_2$ 873.3723; найдено m/z 873.3717.

5-(1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацен-2-ил)-N-фенил-1,3,4-тиадиазол-2-карбоксамид (14a).



Продукт **14a** синтезировали в соответствии с общей методикой А, используя гидразид **13a** (33 мг, 0.156 ммоль, 1.1 экв.) и альдегид **1** (50 мг, 0.142 ммоль, 1.0 экв.). Очистку проводили методом колоночной хроматографии (CH_2Cl_2 / MeOH, 100 : 1), в результате чего получили продукт в виде красно-оранжевого

твёрдого вещества. Выход 30% (22 мг), Т. пл. $> 300^\circ\text{C}$.

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ 9.12 (с, 1H), 7.68 (д, $J = 7.9$ Гц, 2H), 7.57 – 7.52 (м, 3H), 7.40 (дд, $J = 7.9$ Гц, 2H), 7.34 – 7.31 (м, 2H), 7.19 (т, $J = 7.9$ Гц, 1H), 6.13 (с, 1H), 2.86 (с, 3H), 2.63 (с, 3H), 1.61 (с, 3H), 1.43 (с, 3H).

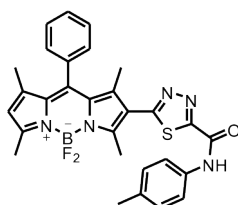
^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3): δ 166.3, 164.2, 161.0, 155.8, 152.8, 147.00, 143.2, 139.4, 136.9, 134.6, 129.7, 129.6 ($\times 2$), 129.4 ($\times 2$), 128.8, 128.0 ($\times 2$), 125.4, 123.8, 120.1 ($\times 2$), 15.2, 15.0, 14.4, 13.2.

^{19}F ЯМР (282 МГц, CDCl_3): δ -144.9 (кв, $^1J_{\text{F-B}} = 32.6$ Гц).

^{11}B ЯМР (96 МГц, CDCl_3): δ 0.79 (т, $^1J_{\text{B-F}} = 32.6$ Гц).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{BF}_2\text{N}_5\text{OS}$ 528.1840; найдено m/z 528.1825.

5-(1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацен-2-ил)-N-(п-толил)-1,3,4-тиадиазол-2-карбоксамид (14b).



Продукт **14b** синтезировали в соответствии с общей методикой А, используя гидразид **13b** (33 мг, 0.156 ммоль, 1.1 экв.) и альдегид **1** (50 мг, 0.142 ммоль, 1.0 экв.). Очистку проводили методом колоночной хроматографии (CH_2Cl_2 / MeOH , 100 : 1), в результате чего получили продукт в виде красно-оранжевого твёрдого вещества. Выход 75% (58 мг), Т. пл. > 300 °С.

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ 9.07 (с, 1H), 7.58 – 7.52 (м, 5H), 7.34 – 7.30 (м, 2H), 7.19 (д, $J = 8.2$ Гц, 3H), 6.13 (с, 1H), 2.84 (с, 3H), 2.62 (с, 3H), 2.34 (с, 3H), 1.60 (с, 3H), 1.42 (с, 3H).

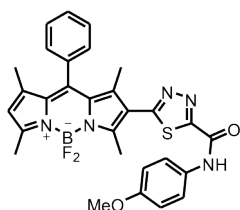
^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3): δ 166.2, 164.4, 160.9, 155.6, 152.8, 147.0, 143.1, 139.4, 135.1, 134.5, 134.3, 129.9 ($\times 2$), 129.7, 129.6 ($\times 2$), 128.0 ($\times 2$), 123.8, 120.0 ($\times 2$), 21.1, 15.2, 15.0, 14.3, 13.2

^{19}F ЯМР (282 МГц, CDCl_3): δ -145.8 (кв, $^1J_{\text{F-B}} = 31.8$ Гц).

^{11}B ЯМР (96 МГц, CDCl_3): δ 0.79 (т, $^1J_{\text{B-F}} = 31.8$ Гц).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{BF}_2\text{N}_5\text{OS}$ 542.1997; найдено m/z 542.1990.

5-(1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацен-2-ил)-N-(п-метоксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-карбоксамид (14c).



Продукт **14c** синтезировали в соответствии с общей методикой А, используя гидразид **13c** (35 мг, 0.156 ммоль, 1.1 экв.) и альдегид **1** (50 мг, 0.142 ммоль, 1.0 экв.). Очистку проводили методом колоночной хроматографии (CH_2Cl_2 / MeOH , 100 : 1), в результате чего получили продукт в виде красно-оранжевого твёрдого вещества. Выход 69% (55 мг), Т. пл. > 300 °С.

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ 9.06 (с, 1H), 7.66 – 7.54 (м, 5H), 7.39 – 7.32 (м, 2H), 6.94 (д, $J = 8.9$ Гц, 2H), 6.13 (с, 1H), 3.84 (с, 3H), 2.87 (с, 3H), 2.65 (с, 3H), 1.63 (с, 3H), 1.44 (с, 3H).

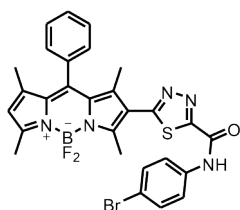
^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3): δ 166.1, 164.4, 160.9, 157.2, 155.6, 152.8, 146.9, 143.2, 139.5, 134.6, 130.1, 129.7, 129.6 ($\times 2$), 128.1 ($\times 2$), 123.8, 121.7 ($\times 2$), 114.6 ($\times 2$), 55.67, 15.16, 14.93, 14.37, 13.25.

^{19}F ЯМР (282 МГц, CDCl_3): δ -145.7 (кв, $^1J_{F-B} = 32.3$ Гц).

^{11}B ЯМР (96 МГц, CDCl_3): δ 0.78 (т, $^1J_{B-F} = 32.3$ Гц).

HRMS: рассчитано $[M+H]^+$ для $\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$ 558.1946; найдено m/z 558.1927

5-(1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацен-2-ил)-N-(п-бромфенил)-1,3,4-тиадиазол-2-карбоксамид (14d).



Продукт **14d** синтезировали в соответствии с общей методикой А, используя гидразид **13d** (43 мг, 0.156 ммоль, 1.1 экв.) и альдегид **1** (50 мг, 0.142 ммоль, 1.0 экв.). Очистку проводили методом колоночной хроматографии (CH_2Cl_2 / MeOH , 100 : 1), в результате чего получили продукт в виде красно-оранжевого твёрдого вещества. Выход 60% (52 мг), Т. пл. > 300 °С.

^1H ЯМР (300 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): δ 11.31 (с, 1H), 7.83 (д, $J = 8.9$ Гц, 2H), 7.64 – 7.56 (м, 5H), 7.50 – 7.44 (м, 2H), 6.43 (с, 1H), 2.74 (с, 3H), 2.57 (с, 3H), 1.58 (с, 3H), 1.41 (с, 3H).

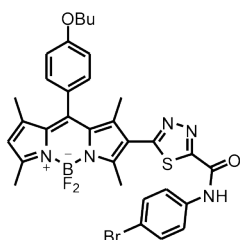
^{13}C ЯМР (75 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): δ 164.5, 164.4, 160.6, 156.3, 151.3, 146.6, 143.2, 138.6, 137.1, 133.5, 132.9, 131.6 ($\times 2$), 129.7, 129.5 ($\times 2$), 127.8 ($\times 2$), 124.0, 122.6 ($\times 2$), 116.5, 14.7, 14.4, 13.7, 12.6.

^{19}F ЯМР (282 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): δ -143.3 (кв, $^1J_{F-B} = 31.9$ Гц).

^{11}B ЯМР (96 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): δ 0.67 (т, $^1J_{B-F} = 31.9$ Гц).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{BBBrF}_2\text{N}_5\text{OS}$ 604.0800; найдено m/z 604.0817.

5-(1,3,5,7-тетраметил-8-(4-бутоксифенил)-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацен-2-ил)-N-(п-бромфенил)-1,3,4-тиадиазол-2-карбоксамид (14e).



Продукт **14e** синтезировали в соответствии с общей методикой А, используя гидразид **13e** (35 мг, 0.156 ммоль, 1.1 экв.) и альдегид **1** (60 мг, 0.142 ммоль, 1.0 экв.). Очистку проводили методом колоночной хроматографии (CH_2Cl_2 / MeOH , 100 : 1), в результате чего получили продукт в виде красно-оранжевого твёрдого вещества. Выход 70% (63 мг), Т. пл. > 300 °С.

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ 9.14 (с, 1H), 7.59 (д, $J = 8.9$ Гц, 2H), 7.50 (д, $J = 8.9$ Гц, 2H), 7.18 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H), 7.04 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H), 6.12 (с, 1H), 4.03 (т, $J = 6.5$ Гц, 2H), 2.84 (с, 3H), 2.61 (с, 3H), 1.86 – 1.79 (м, 2H), 1.67 (с, 3H), 1.58 – 1.50 (м, 2H), 1.48 (с, 3H), 1.01 (т, $J = 7.4$ Гц, 3H).

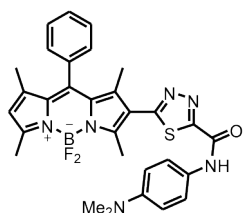
^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3): δ 166.6, 163.7, 160.8, 160.3, 155.9, 152.5, 147.1, 143.5, 139.3, 136.0, 134.2, 132.4 ($\times 2$), 130.8, 129.2 ($\times 2$), 126.2, 123.7, 121.5 ($\times 2$), 118.0, 115.6 ($\times 2$), 68.1, 31.4, 29.8, 19.4, 15.2, 14.4, 14.0, 13.5.

^{19}F ЯМР (282 МГц, CDCl_3): δ (-)145.0 – (-)145.8 (м).

^{11}B ЯМР (96 МГц, CDCl_3): δ 0.78 (т, $^1J_{\text{B-F}} = 32.5$ Гц).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$ 678.1521; найдено m/z 678.1495

5-(1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-2-ил)-N-(*p*-диметиламинофенил)-1,3,4-тиадиазол-2-карбоксамид (14f).



Продукт **14f** синтезировали в соответствии с общей методикой Б, используя гидразид **13f** (36 мг, 0.156 ммоль, 1.1 экв.), TsOH (3 мг, 0.014 ммоль, 0.1 экв.), альдегид **1** (50 мг, 0.142 ммоль, 1.0 экв.), DDQ (35 мг, 0.156 ммоль, 1.1 экв.) и DMF (5 + 1 мл). Очистку проводили методом колоночной хроматографии (CH_2Cl_2 / MeOH, 100 : 1), в результате чего получили продукт в виде красно-оранжевого твёрдого вещества. Выход 64% (52 мг), Т. пл. > 291-293 °С.

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ 8.97 (уш. с, 1H), 7.58 – 7.52 (м, 5H), 7.37 – 7.30 (м, 2H), 6.74 (д, $J = 9.0$ Гц, 2H), 6.12 (с, 1H), 2.96 (с, 6H), 2.85 (с, 3H), 2.63 (с, 3H), 1.60 (с, 3H), 1.42 (с, 3H).

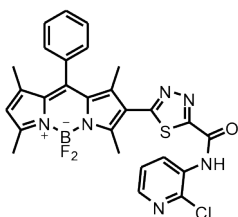
^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3): δ 165.8, 164.9, 160.7, 155.2, 152.9, 148.6, 146.8, 143.1, 139.5, 134.6, 133.6, 130.4, 129.7, 129.6 ($\times 2$), 128.0 ($\times 2$), 126.6, 123.7, 121.6 ($\times 2$), 113.0 ($\times 2$), 40.9 ($\times 2$), 15.2, 14.9, 14.3, 13.2.

^{19}F ЯМР (282 МГц, CDCl_3): δ -145.8 (кв, $^1J_{\text{F-B}} = 32.1$ Гц).

^{11}B ЯМР (96 МГц, CDCl_3): δ 0.80 (т, $^1J_{\text{B-F}} = 32.1$ Гц).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{BF}_2\text{N}_6\text{OS}$ 571.2263; найдено m/z 571.2271

5-(1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-2-ил)-N-(2-хлорпиридин-3-ил)-1,3,4-тиадиазол-2-карбоксамид (14g).



Продукт **14g** синтезировали в соответствии с общей методикой А, используя гидразид **13g** (36 мг, 0.156 ммоль, 1.1 экв.) и альдегид **1** (50 мг, 0.142 ммоль, 1.0 экв.). Очистку проводили методом колоночной хроматографии (CH_2Cl_2 / MeOH, 100 : 1), в результате чего получили продукт в виде красно-оранжевого

твёрдого вещества. Выход 61% (52 мг), Т. пл. > 300 °С.

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ 9.75 (с, 1H), 8.85 – 8.81 (м, 1H), 8.22 – 8.19 (м, 1H), 7.57 – 7.53 (м, 3H), 7.35 – 7.31 (м, 3H), 6.15 (с, 1H), 2.88 (с, 3H), 2.64 (с, 3H), 1.63 (с, 3H), 1.43 (с, 3H).

^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3): δ 166.8, 162.8, 161.3, 156.5, 152.7, 147.2, 144.9, 143.2, 140.8, 139.4, 134.5, 131.3, 129.8, 129.7 ($\times 2$), 128.9, 128.0 ($\times 2$), 124.0, 123.5, 15.2, 15.0, 14.5, 13.3.

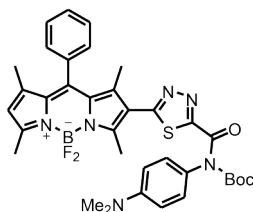
^{19}F ЯМР (282 МГц, CDCl_3): δ -144.8 (кв, $^1J_{\text{F-B}} = 32.2 \text{ Гц}$).

^{11}B ЯМР (96 МГц, CDCl_3): δ 0.78 (т, $^1J_{\text{B-F}} = 32.2 \text{ Гц}$).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{BClF}_2\text{N}_6\text{OS}$ 563.1403; найдено m/z 563.1397.

V.2.2 Получение Вос-защещенного 2,6-тиадиазол производного BODIPY

5-(1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-2-ил)-N-(*p*-диметиламинофенил)-N-(трет-бутилоксикарбонил)-1,3,4-тиадиазол-2-карбоксамид (14h).



К суспензии соединения **14f** (100 мг, 0.175 ммоль, 1.0 экв.) в CH_2Cl_2 (2 мл) добавили DMAP (4 мг, 0.035 ммоль, 0.2 экв.), а также Вос-ангидрид (153 мг, 0.700 ммоль, 4.0 экв.). Полученную смесь перемешивали в течение 22 часов при комнатной температуре. После упаривания растворителя остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (ПЭ / EtOAc, 7:2). Это позволило получить продукт в виде красно-оранжевого твёрдого вещества. Выход 25% (29 мг), Т пл. = 203–206 °С.

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ 7.57 – 7.50 (м, 3H), 7.35 – 7.29 (м, 2H), 7.16 (д, $J = 8.9 \text{ Гц}$, 2H), 6.73 (д, $J = 8.9 \text{ Гц}$, 2H), 6.13 (с, 1H), 2.97 (с, 6H), 2.82 (с, 3H), 2.63 (с, 3H), 1.59 (с, 3H), 1.43 (с, 3H), 1.31 (с, 9H).

^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3): δ 164.0, 163.4, 162.8, 160.6, 152.9, 150.5, 146.8, 143.2, 139.7, 134.6, 129.7, 129.6 ($\times 2$), 128.7 ($\times 2$), 128.0 ($\times 2$), 126.4, 123.6, 112.7 ($\times 2$), 84.4, 40.6 ($\times 2$), 27.7 ($\times 3$), 15.1, 14.9, 14.2, 13.2.

^{19}F ЯМР (282 МГц, CDCl_3): δ -145.9 (кв, $^1J_{\text{F-B}} = 32.3 \text{ Гц}$).

^{11}B ЯМР (96 МГц, CDCl_3): δ 0.79 (т, $^1J_{\text{B-F}} = 32.3 \text{ Гц}$).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{BF}_2\text{N}_6\text{O}_3\text{S}$ 671.2788; найдено m/z 671.2787

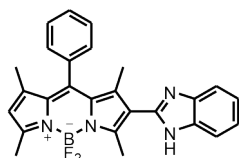
V.3 Получение 1,3-азол производных BODIPY

V.3.1 Получение бензимидазол производных BODIPY

Общая методика получения:

К раствору альдегида **1** (50 мг, 0.14 ммоль, 1.0 экв.) в DMF (2.8 мл) добавили о-фенилендиамины **15a-i** (0.14 ммоль, 1.0 экв.) и TsOH (5 мг, 0.028 ммоль, 20 мол. %) и тщательно перемешивали в течение 20 минут. Затем раствор нагрели и перемешивали при температуре 80°C в течение 4 ч. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь гасили добавлением водного раствора Na₂CO₃ (4 мг, 10 мл), после чего смесь экстрагировали ЭА (3 × 5 мл). Объединенные органические слои промыли водой (3 × 5 мл) и насыщенным раствором NaCl (3 × 5 мл). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле.

2-(бензимидазол-2-ил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацен (16a) [199]



Продукт был получен согласно общей методике с использованием о-фенилендиамина **15a** (15 мг, 0.14 ммоль, 1.0 экв.). Выделен колоночной хроматографией на силикагеле (ПЭ / ЭА, 5 : 1 → 3 : 1 → 2 : 1) в виде красного твердого вещества. Выход 53% (32.5 мг), Т. пл. 299-301 °С (Т. пл. лит 298 °С

[199]), $R_f = 0.50$ (ПЭ/ЭА, 2 : 1).

¹H ЯМР (300 МГц, DMSO-d₆): δ 12.30 (с, 1H), 7.68 – 7.55 (м, 4H), 7.51 – 7.40 (м, 3H), 7.23 – 7.11 (м, 2H), 6.32 (с, 1H), 2.65 (с, 3H), 2.52 (с, 3H), 1.50 (с, 3H), 1.39 (с, 3H).

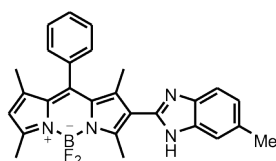
¹³C ЯМР (75 МГц, DMSO-d₆): δ 158.74, 153.20, 146.78, 145.79, 142.94, 140.36, 134.65, 129.43, 129.39, 127.90, 122.84, 15.01, 14.71, 13.79, 13.04.

¹⁹F ЯМР (282 МГц, DMSO-d₆): δ - 145.68 (кв, $J_{F-B} = 32.5$ Гц).

¹¹B ЯМР (96 МГц, DMSO-d₆): δ 0.86 (т, $J_{B-F} = 32.5$ Гц).

МС (ЭУ): рассчитано для $[M]^+$ C₂₆H₂₃BF₂N₄ 440; найдено m/z 440.

2-(6-метилбензимидазол-2-ил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацен (16b)



Продукт был получен согласно общей методике с использованием о-фенилендиамина **15b** (17 мг, 0.14 ммоль, 1.0 экв.). Выделен колоночной хроматографией на силикагеле (ПЭ / ЭА, 5 : 1 → 3 : 1 → 2 : 1) в виде красного твердого вещества. Выход 58% (37 мг), Т. пл. 260-263 °С, $R_f = 0.30$ (ПЭ/ЭА,

5 : 1).

^1H ЯМР (300 МГц, DMSO- d_6): δ 12.18 (с, 1H), 7.70 – 7.54 (м, 3H), 7.52 – 7.40 (м, 3H), 7.39 – 7.30 (м, 1H), 7.01 (д, $J = 8.3$ Гц, 1H), 6.33 (с, 1H), 2.66 (с, 3H), 2.54 (с, 3H), 2.42 (с, 3H), 1.51 (с, 3H), 1.40 (с, 3H).

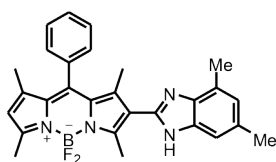
^{13}C ЯМР (75 МГц, DMSO- d_6): δ 158.45, 153.24, 145.62, 142.86, 140.36, 134.59, 129.35, 129.30, 127.83, 124.12, 122.65, 21.68, 14.94, 14.61, 13.75, 13.00.

^{19}F ЯМР (282 МГц, DMSO- d_6): δ - 145.55 (кв, $J_{\text{F-B}} = 32.7$ Гц).

^{11}B ЯМР (96 МГц, DMSO- d_6): δ 0.87 (т, $J_{\text{B-F}} = 32.7$ Гц).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{BF}_2\text{N}_4$ 455.2218; найдено m/z 455.2223.

2-(5,7-диметилбензимидазол-2-ил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацен (16с)



Продукт был получен согласно общей методике с использованием о-фенилендиамина **15с** (23 мг, 0.14 ммоль, 1.0 экв.). Выделен колоночной хроматографией на силикагеле (ПЭ / ЭА, 7 : 1 $\rightarrow$ 5 : 1) в виде красного твердого вещества. Выход 37% (25 мг), Т. пл. 288-290 °С, $R_f = 0.50$ (ПЭ/ЭА,

2 : 1).

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ 7.57 – 7.38 (м, 3H), 7.25 – 6.95 (м, 3H), 6.89 (с, 1H), 6.08 (с, 1H), 2.74 (с, 3H), 2.63 (с, 3H), 2.58 (с, 3H), 2.41 (с, 3H), 1.50 (с, 3H), 1.35 (с, 3H).

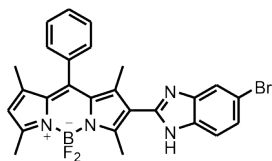
^{13}C ЯМР (75 МГц, DMSO- d_6): δ 157.53, 153.07, 144.60, 142.81, 133.94, 131.81, 129.83, 129.54, 129.47, 127.79, 122.61, 14.46, 14.21, 13.39, 12.54.

^{19}F ЯМР (282 МГц, DMSO- d_6): δ - 144.03 (кв, $J = 32.5$ Гц).

^{11}B ЯМР (96 МГц, DMSO- d_6): δ 0.83 (т, $J = 32.5$ Гц).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{BF}_2\text{N}_4$ 469.2374; найдено m/z 469.2368.

2-(5-бромбензимидазол-2-ил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацен (16d)



Продукт был получен согласно общей методике с использованием о-фенилендиамина **15d** (17 мг, 0.14 ммоль, 1.0 экв.). Выделен колоночной хроматографией на силикагеле (ПЭ / ЭА, 7 : 1 $\rightarrow$ 5 : 1 $\rightarrow$ 3 : 1) в виде красного твердого вещества. Выход 50 % (37 мг), Т. пл. 297-299 °С, $R_f = 0.55$ (ПЭ/ЭА,

2 : 1).

^1H ЯМР (300 МГц, DMSO-d_6): δ 12.52 (с, 1H), 7.85 (с, 1H), 7.71 – 7.57 (м, 4H), 7.45 (с, 2H), 7.33 (с, 1H), 6.35 (с, 1H), 2.67 (с, 3H), 2.55 (с, 3H), 1.51 (с, 3H), 1.40 (с, 3H).

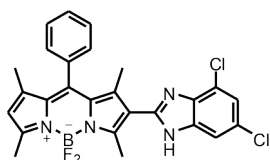
^{13}C ЯМР (75 МГц, DMSO-d_6): δ 158.3, 153, 147.6, 145.1, 142.9, 139.5, 133.9, 132.1, 129.8, 129.6, 129.5, 127.8, 124.8, 123.0, 121.9, 113.9, 80.5, 25.5, 14.5, 14.2, 13.4, 12.5.

^{19}F ЯМР (282 МГц, DMSO-d_6): δ - 145.25 (кв, $J_{\text{F-B}} = 32.3 \text{ Гц}$).

^{11}B ЯМР (96 МГц, DMSO-d_6): δ 0.85 (т, $J_{\text{B-F}} = 32.3 \text{ Гц}$).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{BBrF}_2\text{N}_4$ 519.1166, найдено m/z 519.1170.

2-(5,7-дихлорбензимидазол-2-ил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацен (16e)



Продукт был получен согласно общей методике с использованием о-фенилендиамина **15e** (25 мг, 0.14 ммоль, 1.0 экв.). Выделен колоночной хроматографией на силикагеле (ПЭ/ЭА, 5 : 1 $\rightarrow$ 3 : 1 $\rightarrow$ 2 : 1) в виде красного твердого вещества. Выход 17 % (12 мг), Т. пл. $> 300^\circ\text{C}$, $R_f = 0.35$ (ПЭ/ЭА, 5 : 1).

^1H ЯМР (300 МГц, DMSO-d_6): δ 12.80 (с, 1H), 7.69 – 7.57 (м, 3H), 7.57 – 7.36 (м, 4H), 6.37 (с, 1H), 2.67 (с, 3H), 2.55 (с, 3H), 1.51 (с, 3H), 1.42 (с, 3H).

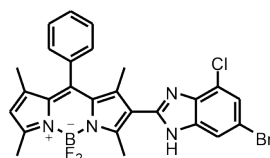
^{13}C ЯМР (75 МГц, DMSO-d_6): δ 158.69, 152.46, 148.29, 145.39, 143.00, 139.69, 135.80, 133.80, 129.61, 129.49, 127.80, 126.50, 123.11, 121.25, 117.38, 110.41, 14.54, 14.29, 13.36, 12.51.

^{19}F ЯМР (282 МГц, DMSO-d_6): δ - 143.87 (кв, $J = 32.2 \text{ Гц}$).

^{11}B ЯМР (96 МГц, DMSO-d_6): δ 0.66 (т, $J = 32.2 \text{ Гц}$).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{BCl}_2\text{F}_2\text{N}_4$ 509.1282; найдено m/z 509.1273.

2-(6-бром-4-хлор-бензимидазол-2-ил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацен (16f)



Продукт был получен согласно общей методике с использованием избытка о-фенилендиамина **15f** (51 мг, 0.28 ммоль, 2.0 экв.). Выделен колоночной хроматографией на силикагеле (ПЭ/ЭА, 5 : 1 $\rightarrow$ 3 : 1 $\rightarrow$ 2 : 1) в виде красного твердого вещества. Выход 35% (27 мг), Т. пл. $> 300^\circ\text{C}$, $R_f = 0.30$ (ПЭ/ЭА, 5 : 1).

^1H ЯМР (300 МГц, DMSO-d_6): δ 12.78 (с, 1H), 7.64 (д, $J = 11.2$ Гц, 4H), 7.47 (с, 3H), 6.36 (с, 1H), 2.67 (с, 3H), 2.55 (с, 3H), 1.51 (с, 3H), 1.41 (с, 3H).

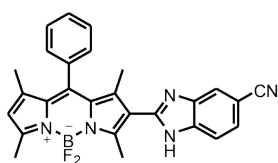
^{13}C ЯМР (75 МГц, DMSO-d_6): δ 158.62, 152.41, 145.32, 142.93, 133.72, 132.14, 129.54, 129.43, 127.71, 123.67, 123.04, 14.47, 14.22, 13.27, 12.44.

^{19}F ЯМР (282 МГц, DMSO-d_6): δ - 145.68 (кв, $J = 31.5$ Гц).

^{11}B ЯМР (96 МГц, DMSO-d_6): δ 0.67 (т, $J = 31.5$ Гц).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{BBrClF}_2\text{N}_4$ 555.0753, найдено m/z 555.0755.

2-(5-цианобензимидазол-2-ил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен (16g)



Продукт был получен согласно общей методике с использованием о-фенилендиаминa **15g** (19 мг, 0.14 ммоль, 1.0 экв.). Выделен колоночной хроматографией на силикагеле (ПЭ / ЭА, 5 : 1 $\rightarrow$ 3 : 1) в виде красного твердого вещества. Выход 11 % (7 мг), Т. пл. 278-280 °С, $R_f = 0.36$ (ПЭ/ЭА, 5 : 1).

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ 8.49 (с, 1H), 7.60 – 7.50 (м, 3H), 7.36 – 7.28 (м, 2H), 7.20 – 7.14 (м, 1H), 6.70 (д, $J = 8.3$ Гц, 1H), 6.12 (с, 1H), 2.91 (с, 3H), 2.63 (с, 3H), 1.66 (с, 3H), 1.42 (с, 3H).

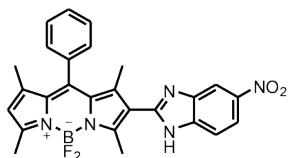
^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3): δ 152.87, 145.49, 142.25, 137.75, 133.97, 130.50, 128.90, 128.89, 127.31, 122.67, 119.73, 113.66, 14.43, 14.22, 13.74, 11.69.

^{11}B ЯМР (96 МГц, CDCl_3): δ 0.79 (т, $J = 32.5$ Гц).

^{19}F ЯМР (282 МГц, CDCl_3): δ - 145.65 (кв, $J = 32.5$ Гц).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{BF}_2\text{N}_5$ 466.2014; найдено m/z 466.2005.

2-(6-нитробензимидазол-2-ил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен (16h)



Продукт был получен согласно общей методике с использованием о-фенилендиаминa **15h** (22 мг, 0.14 ммоль, 1.0 экв.). Выделен колоночной хроматографией на силикагеле (ПЭ / ЭА, 5 : 1 $\rightarrow$ 3 : 1 $\rightarrow$ 2 : 1) в виде красного твердого вещества. Выход 33 % (23 мг), Т. пл. > 300 °С, $R_f = 0.30$ (ПЭ/ЭА, 5 : 1).

^1H ЯМР (300 МГц, DMSO-d_6): δ 13.00 (с, 1H), 8.59 – 8.31 (м, 1H), 8.24 – 8.02 (м, 1H), 7.96 – 7.70 (м, 1H), 7.69 – 7.57 (м, 3H), 7.56 – 7.41 (м, 2H), 6.38 (с, 1H), 2.70 (с, 3H), 2.56 (с, 3H), 1.55 (с, 3H), 1.42 (с, 3H).

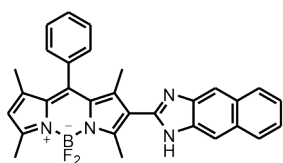
^{13}C ЯМР (75 МГц, DMSO- d_6): δ 162.3, 159.0, 145.6, 143.1, 139.5, 139.2, 133.8, 129.6, 129.5, 127.8, 123.2, 118.7, 118.0, 114.7, 111.7, 107.8, 14.6, 14.3, 13.4, 12.5.

^{19}F ЯМР (282 МГц, DMSO- d_6): δ - 143.79 (кв, $J = 32.7$ Гц).

^{11}B ЯМР (96 МГц, DMSO- d_6): δ 0.69 (т, $J = 32.7$ Гц).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_2$ 488.2068; найдено m/z 488.2058.

2-(нафтоимидазол-2-ил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен (16i)



Продукт был получен согласно общей методике с использованием о-фенилендиаминa **15i** (23 мг, 0.14 ммоль, 1.0 экв.). Выделен колоночной хроматографией на силикагеле (ПЭ / EtOAc, 5 : 1 $\rightarrow$ 3 : 1 $\rightarrow$ 2 : 1) в виде красного твердого вещества. Выход 22% (15 мг), Т. пл. 286-288 °С, R_f =

0.40 (ПЭ/EtOAc, 5 : 1).

^1H ЯМР (300 МГц, DMSO- d_6): δ 12.34 (с, 1H), 8.19 (с, 1H), 8.04 – 7.97 (м, 2H), 7.96 (с, 1H), 7.70 – 7.59 (м, 3H), 7.54 – 7.45 (м, 2H), 7.45 – 7.31 (м, 2H), 6.37 (с, 1H), 2.74 (с, 3H), 2.56 (с, 3H), 1.59 (с, 3H), 1.42 (с, 3H).

^{13}C ЯМР (75 МГц, DMSO- d_6): δ 159.24, 153.11, 150.91, 146.13, 142.90, 140.20, 134.48, 129.37, 128.51, 127.81, 127.33, 124.29, 123.48, 123.04, 116.15, 106.06, 15.03, 14.59, 13.98, 13.07.

^{19}F ЯМР (282 МГц, DMSO- d_6): δ - 145.49 (кв, $J = 32.1$ Гц).

^{11}B ЯМР (96 МГц, DMSO- d_6): δ 0.88 (т, $J = 32.1$ Гц).

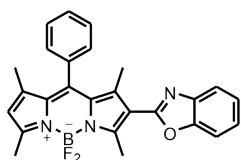
HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{30}\text{H}_{25}\text{BF}_2\text{N}_4$ 491.2218, найдено m/z 491.2207.

V.3.2 Получение бензоксазол производных BODIPY

Общая методика получения:

К раствору альдегида **1** (50 мг, 0.14 ммоль, 1.0 экв.) в 1,2-дихлорэтано (5 мл) добавили 2-аминофенол **17a-c** (0.15 ммоль, 1.1 экв.) и TsOH (3мг, 0.014 ммоль, 10 мол. %) и тщательно перемешивали в течение 20 минут. Затем раствор нагрели и перемешивали при кипячении в течение 3 ч. Далее добавили 2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинон (52 мг, 0.23 ммоль, 1.6 экв.) и перемешивали еще 3 часа. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь промывали водой (20 мл), после чего смесь экстрагировали CH_2Cl_2 (3×7 мл). Объединенные органические слои промыли водой (3×7 мл) и насыщенным раствором NaCl (3×7 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле.

2-(бензоксазол-2-ил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3a,4a-диаза-s-индацен (**18a**)



Продукт был получен согласно общей методике с использованием 2-аминофенола **17a** (17 мг, 0.15 ммоль, 1.1 экв.). Выделен колоночной хроматографией на силикагеле (ПЭ / EtOAc, 15 : 1 $\rightarrow$ 10 : 1) в виде оранжевого твердого вещества. Выход 48 % (30 мг), Т. пл. 265-269 °C, R_f = 0.30 (ПЭ/EtOAc, 10 : 1).

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ 7.79 – 7.69 (м, 1H), 7.62 – 7.48 (м, 4H), 7.41 – 7.30 (м, 4H), 6.13 (с, 1H), 3.03 (с, 3H), 2.65 (с, 3H), 1.82 (с, 3H), 1.45 (с, 3H).

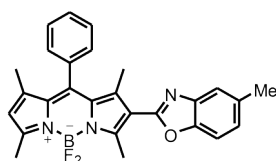
^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3): δ 160.12, 159.51, 154.93, 149.86, 146.09, 143.10, 141.83, 141.58, 134.73, 129.47, 129.44, 124.50, 124.34, 123.16, 119.68, 110.25, 15.01, 14.83, 14.60, 13.38.

^{19}F ЯМР (282 МГц, CDCl_3): δ - 145.68 (кв, $J_{F-B} = 32.5$ Гц).

^{11}B ЯМР (96 МГц, CDCl_3): δ 0.82 (т, $J_{B-F} = 32.5$ Гц).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}$ 442.1901; найдено m/z 442.1897.

2-(5-метилбензоксазол-2-ил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3a,4a-диаза-s-индацен (**18b**)



Продукт был получен согласно общей методике с использованием 2-аминофенола **17b** (19 мг, 0.15 ммоль, 1.1 экв.). Выделен колоночной хроматографией на силикагеле (ПЭ / EtOAc, 15 : 1 $\rightarrow$ 10 : 1) в виде оранжевого твердого вещества. Выход 27 % (27 мг), Т. пл. 275-277 °C, R_f = 0.33 (ПЭ/EtOAc, 10 : 1).

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ 7.53 (с, 4H), 7.34 (с, 3H), 7.11 (д, $J = 8.1$ Гц, 1H), 6.11 (с, 1H), 2.99 (с, 3H), 2.63 (с, 3H), 2.47 (с, 3H), 1.79 (с, 3H), 1.43 (с, 3H).

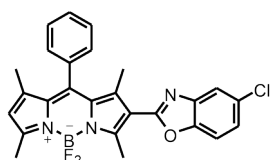
^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3): δ 160.16, 159.30, 154.97, 148.08, 145.94, 143.04, 142.01, 141.56, 134.73, 134.11, 133.15, 130.61, 129.45, 129.41, 127.99, 125.56, 123.08, 119.63, 109.60, 21.56, 14.99, 14.81, 14.58, 13.37.

^{19}F ЯМР (282 МГц, CDCl_3): δ - 145.80 (кв, $J = 32.5$ Гц).

^{11}B ЯМР (96 МГц, CDCl_3): δ 0.82 (т, $J = 32.5$ Гц).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}$ 456.2058; найдено m/z 456.2054.

2-(5-хлорбензоксазол-2-ил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен (18с)



Продукт был получен согласно общей методике с использованием 2-аминофенола **17с** (22 мг, 0.15 ммоль, 1.1 экв.). Выделен колоночной хроматографией на силикагеле (ПЭ / EtOAc, 15 : 1 $\rightarrow$ 10 : 1) в виде оранжевого твердого вещества. Выход 27 % (19 мг), Т. пл. 289-291 °С, $R_f = 0.35$ (ПЭ/EtOAc, 10 : 1).

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ 7.73 – 7.65 (м, 1H), 7.61 – 7.51 (м, 3H), 7.48 – 7.40 (м, 1H), 7.40 – 7.31 (м, 2H), 7.28 – 7.24 (м, 1H), 6.14 (с, 1H), 3.00 (с, 3H), 2.65 (с, 3H), 1.80 (с, 3H), 1.45 (с, 3H).

^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3): δ 161.59, 160.03, 154.80, 148.41, 146.43, 143.14, 143.05, 141.54, 134.65, 129.77, 129.50, 127.98, 124.61, 123.40, 119.58, 110.87, 15.04, 14.86, 14.64, 13.38.

^{19}F ЯМР (282 МГц, CDCl_3): δ - 145.66 (кв, $J_{F-B} = 32.4$ Гц).

^{11}B ЯМР (96 МГц, CDCl_3): δ 0.80 (т, $J_{B-F} = 32.4$ Гц).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{BClF}_2\text{N}_3\text{O}$ 476.1512; найдено m/z 476.1514.

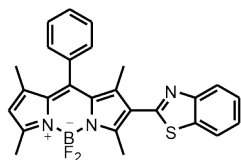
V.3.3 Получение бензотиазол производных BODIPY

Общая методика получения:

К раствору альдегида **1** (50 мг, 0.14 ммоль, 1.0 экв.) в 1,2-дихлорэтано (5 мл) добавили 2-аминотиофенол **19a-d** (0.28 ммоль, 2.0 экв.) и TsOH (3мг, 0.014 ммоль, 10 моль. %) и тщательно перемешивали в течение 20 минут. Затем раствор нагрели и перемешивали при кипячении в течение 3 ч. Далее добавили 2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинон (52 мг, 0.23 ммоль, 1.6 экв.) и перемешивали еще 3 часа. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь промывали водой (20 мл), после чего смесь экстрагировали CH_2Cl_2 (3×7 мл). Объединенные

органические слои промыли водой (3×7 мл) и насыщенным раствором NaCl (3×7 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле.

2-(бензотиазол-2-ил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацен (20a)



Продукт был получен согласно общей методике с использованием 2-аминотиофенола **19a** (36 мг, 0.28 ммоль, 2.0 экв.). Выделен колоночной хроматографией на силикагеле (ПЭ / EtOAc, 25 : 1 $\rightarrow$ 20 : 1 $\rightarrow$ 15 : 1) в виде оранжевого твердого кристаллического вещества. Выход 33 % (21 мг), Т. пл. 239-241 °C, R_f = 0.50 (ПЭ/EtOAc, 10 : 1).

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ 8.05 (д, $J = 8.2$ Гц, 1H), 7.89 (д, $J = 7.8$ Гц, 1H), 7.59 – 7.43 (м, 4H), 7.43 – 7.30 (м, 3H), 6.09 (с, 1H), 2.84 (с, 3H), 2.62 (с, 3H), 1.63 (с, 3H), 1.42 (с, 3H).

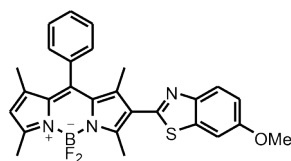
^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3): δ 161.38, 159.12, 153.30, 145.72, 142.83, 139.94, 134.59, 129.35, 129.29, 127.84, 126.23, 125.00, 122.89, 122.81, 121.23, 14.89, 14.68, 13.89, 12.99.

^{19}F ЯМР (282 МГц, CDCl_3): δ -146.12 (кв, $J = 32.6$ Гц).

^{11}B ЯМР (96 МГц, CDCl_3): δ 0.83 (т, $J = 32.6$ Гц).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{BF}_2\text{N}_3\text{S}$ 458.1673; найдено m/z 458.1662.

2-(6-метоксибензотиазол-2-ил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацен (20b)



Продукт был получен согласно общей методике с использованием 2-аминотиофенола **19b** (43 мг, 0.28 ммоль, 2.0 экв.). Выделен колоночной хроматографией на силикагеле (ПЭ / EtOAc, 25 : 1 $\rightarrow$ 20 : 1 $\rightarrow$ 15 : 1) в виде красного твердого кристаллического вещества. Выход 59 % (40 мг), Т. пл.

220-223 °C, R_f = 0.35 (ПЭ/EtOAc, 10 : 1).

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ 7.92 (д, $J = 9.0$ Гц, 1H), 7.57 – 7.47 (м, 3H), 7.37 – 7.29 (м, 3H), 7.13 – 7.03 (м, 1H), 6.08 (с, 1H), 3.88 (с, 3H), 2.82 (с, 3H), 2.62 (с, 3H), 1.60 (с, 3H), 1.42 (с, 3H).

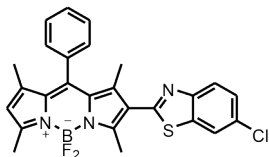
^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3): δ 157.97, 156.96, 153.01, 147.43, 144.78, 142.20, 139.42, 136.23, 134.20, 128.80, 128.72, 127.36, 122.99, 122.09, 114.90, 103.13, 55.30, 14.33, 14.13, 13.36, 12.42.

^{19}F ЯМР (282 МГц, CDCl_3): δ -146.24 (кв, $J = 32.5$ Гц).

^{11}B ЯМР (96 МГц, CDCl_3): δ 0.84 (т, $J = 32.5$ Гц).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $C_{27}H_{25}BF_2N_3OS$ 488.1779; найдено m/z 488.1775.

2-(6-хлорбензотиазол-2-ил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен (20с)



Продукт был получен согласно общей методике с использованием 2-аминотиофенола **19с** (45 мг, 0.28 ммоль, 2.0 экв.). Выделен колоночной хроматографией на силикагеле (ПЭ / EtOAc, 25 : 1 → 20 : 1 → 15 : 1) в виде красного твердого кристаллического вещества. Выход 70 % (48 мг), Т. пл.

234-236 °C, R_f = 0.27 (ПЭ/EtOAc, 10 : 1).

1H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$): δ 7.95 (д, J = 8.7 Гц, 1H), 7.87 (с, 1H), 7.61 – 7.50 (м, 3H), 7.44 (д, J = 8.6 Гц, 1H), 7.40 – 7.30 (м, 2H), 6.12 (с, 1H), 2.86 (с, 3H), 2.64 (с, 3H), 1.64 (с, 3H), 1.44 (с, 3H).

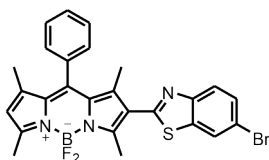
^{13}C ЯМР (75 МГц, $CDCl_3$): δ 161.14, 158.74, 152.71, 151.36, 145.33, 142.32, 139.26, 135.89, 134.09, 130.12, 128.86, 128.81, 127.33, 126.31, 123.14, 122.45, 120.25, 14.39, 14.19, 13.46, 12.47.

^{19}F ЯМР (282 МГц, $CDCl_3$): δ - 146.05 (кв, J = 32.4 Гц).

^{11}B ЯМР (96 МГц, $CDCl_3$): δ 0.82 (т, J = 32.4 Гц).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $C_{26}H_{22}BClF_2N_3S$ 492.1283; найдено m/z 492.1272.

2-(6-бромбензотиазол-2-ил)-1,3,5,7-тетраметил-8-фенил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен (20d)



Продукт был получен согласно общей методике с использованием 2-аминотиофенола **19d** (57 мг, 0.28 ммоль, 2.0 экв.). Выделен колоночной хроматографией на силикагеле (ПЭ / EtOAc, 25 : 1 → 20 : 1 → 15 : 1) в виде

оранжевого твердого кристаллического вещества. Выход 47 % (36 мг), Т. пл. 243-245 °C, R_f = 0.35 (ПЭ/EtOAc, 10 : 1).

1H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$): δ 8.02 (д, J = 1.6 Гц, 1H), 7.88 (д, J = 8.7 Гц, 1H), 7.61 – 7.48 (м, 4H), 7.37 – 7.30 (м, 2H), 6.11 (с, 1H), 2.85 (с, 3H), 2.62 (с, 3H), 1.63 (с, 3H), 1.42 (с, 3H).

^{13}C ЯМР (75 МГц, $CDCl_3$): δ 161.78, 159.38, 153.36, 152.31, 145.94, 142.94, 139.89, 136.99, 134.72, 129.61, 129.42, 127.96, 124.13, 123.79, 123.07, 118.38, 15.00, 14.80, 14.09, 13.10.

^{19}F ЯМР (282 МГц, $CDCl_3$): δ -146.07 (кв, J = 32.6 Гц).

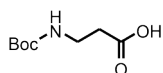
^{11}B ЯМР (96 МГц, $CDCl_3$): δ 0.82 (т, J = 32.6 Гц).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $C_{26}H_{22}BBrF_2N_3S$ 536.0778; найдено m/z 536.0767.

V.4 Получение конъюгатов Аллопрегнанола и 4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацена (BODIPY)

V.4.1 Получение исходных соединений

Вос-производное β-аланина 22a [197]

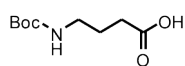


К смеси β-аланина (1.00 г, 0.011 моль, 1.0 экв.) и NaOH (0.45 г, 0.011 моль, 1.0 экв.) в диоксане/воде (30 мл, 2/1, v/v) медленно добавили Boc_2O (2.63 г, 0.012 моль, 1.1 экв.). Реакционную смесь перемешивали 16 часов. Большую часть диоксана выпаривали под пониженным давлением и добавляли 20 мл воды. Значение pH водной смеси было скорректировано до 3 путем добавления муравьиной кислоты. Смесь экстрагировали этилацетатом (10 мл $\times$ 3). Объединенные органические слои промывали водой (30 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении с получением бесцветного масла. Продукт был получен аналитической чистоты и был использован для следующего этапа без дополнительной очистки. Выход 96% (1.99 г), бесцветное масло.

^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3): δ 6.21 (уш. с) и 5.07 (уш. с) (1H), 3.39 (уш. с, 2H), 2.57 (уш. с, 2H), 1.42 (с, 9H).

^{13}C ЯМР (125 МГц, CDCl_3): δ 177.6, 156.1, 79.8, 36.1, 34.6, 28.5 ($\times 3$).

Вос-производное γ-аминомасляной кислоты 22b [197]

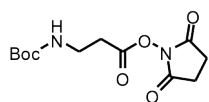


К смеси γ-аминомасляной кислоты (1.00 г, 0.010 моль, 1.0 экв.) и NaOH (0.39 г, 0.010 моль, 1.0 экв.) в диоксане/воде (30 мл, 2/1, v/v) медленно добавили Boc_2O (2.32 г, 0.011 моль, 1.1 экв.). Реакционную смесь перемешивали 16 часов. Большую часть диоксана выпаривали при пониженном давлении и добавляли 20 мл воды. Значение pH водной смеси было скорректировано до 3 путем добавления муравьиной кислоты. Смесь экстрагировали EtOAc (10 мл $\times$ 3). Объединенные органические слои промывали водой (30 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении с получением бесцветного масла. Продукт был получен аналитической чистоты и был использован для следующего этапа без дополнительной очистки. Выход 95% (1.87 г), бесцветное масло.

^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3): δ 5.87 (уш. с) и 4.70 (уш. с) (1H), 3.18 (уш. с, 2H), 2.39 (уш. с, 2H), 1.43 (с, 9H).

^{13}C ЯМР (125 МГц, CDCl_3): δ 178.4, 156.4, 79.7, 39.9, 31.4, 28.5, 25.3 ($\times 3$).

Активированный эфир Вос-производного β -аланина 23a [186]

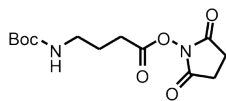


К раствору Вос-производного β -аланина (0.60 г, 3.17 ммоль, 1.0 экв.) и N-гидроксисукцинимид (0.55 г, 4.76 ммоль, 1.5 экв.) в CH_2Cl_2 (30 мл) при 0 °С добавили раствор DIC (0.60 г, 4.76 ммоль, 1.5 экв.) и DMAP (0.04 г, 0.32 ммоль, 10 моль%) в CH_2Cl_2 (30 мл). Смесь перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре. По окончании реакции, смесь промывали водным раствором 0.05 М HCl (20 мл $\times$ 2) и насыщенным раствором NaCl (20 мл). Объединенные органические слои сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении. Остаток повторно растворили в этилацетате (25 мл), образовавшийся осадок был отфильтрован. Концентрированием органического слоя был получен аналитически чистый продукт. Выход 97% (0.88 г), бесцветное твердое вещество.

^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3): δ 5.14 (уш. с, 1H), 3.48 (уш. с, 2H), 2.81 (уш. с, 6H), 1.40 (с, 9H).

^{13}C ЯМР (125 МГц, CDCl_3): δ 168.2 ($\times 2$), 166.6, 154.8, 78.8, 35.2, 31.2, 27.4 ($\times 3$), 24.7 ($\times 2$).

Активированный эфир Вос-производного γ -аминомасляной кислоты 23b [186]

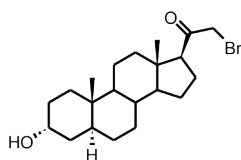


К раствору Вос-производного γ -аминомасляной кислоты (0.60 г, 3.14 ммоль, 1.0 экв.) и N-гидроксисукцинимид (0.54 г, 4.71 ммоль, 1.5 экв.) в CH_2Cl_2 (30 мл) при 0 °С добавили раствор DIC (0.59 г, 4.71 ммоль, 1.5 экв.) и DMAP (0.04 г, 0.31 ммоль, 10 моль%) в CH_2Cl_2 (30 мл). Смесь перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре. По окончании реакции, смесь промывали водным раствором 0.05 М HCl (20 мл $\times$ 2) и насыщенным раствором NaCl (20 мл). Объединенные органические слои сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении. Остаток повторно растворили в этилацетате (25 мл), образовавшийся осадок был отфильтрован. При концентрировании органического слоя был получен аналитически чистый продукт. Выход 99% (0.93 г), бесцветное твердое вещество.

^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3): δ 4.77 (уш. с, 1H), 3.21 – 3.19 (м, 2H), 2.83-2.79 (м, 4H), 2.64 (т, $J = 7.2$ Гц, 2H), 1.92 (п, $J = 7.2$ Гц, 2H), 1.42 (с, 9H).

^{13}C ЯМР (125 МГц, CDCl_3): δ 169.2 ($\times 2$), 168.4, 156.1, 79.5, 39.5, 28.5 ($\times 3$), 25.7, 25.2, 24.7 ($\times 2$).

21-бромид-3 α -гидрокси-5 α -прегнан-20-он (25) [198]



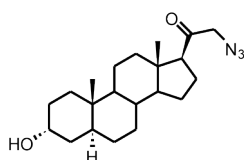
К раствору аллопрегнанолонa (0.23 г, 0.720 ммоль, 1.0 экв.) и НВг (две капли) в метаноле (4.1 мл) по каплям добавляли бром, растворенный в МеОН (3.2 мл). Добавление проводилось в течение 30 мин и контролировалось по обесцвечиванию реакционной смеси. После перемешивания в течение 1 ч смесь разбавили водой (80 мл). Водную фазу экстрагировали EtOAc (30 мл × 3). Объединенные органические слои сушили над Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении с получением бесцветного порошка. Продукт был получен в виде аналитически чистого образца и был использован далее без дополнительной очистки. Выход 95% (271 мг), бесцветный порошок, Т.пл. 137-140 °С; R_f = 0.56 (ПЭ/EtOAc, 1 : 1).

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃): δ 4.11 – 4.01 (м, 1H), 3.92 (AB-система, *J* = 13.0 Гц, 1H), 3.88 (AB-система, *J* = 13.0 Гц, 1H) 2.82 (т, *J* = 9.0 Гц, 1H), 2.21 – 2.12 (м, 1H), 1.92 – 1.89 (м, 1H), 1.74 – 1.16 (м, 19H), 1.01 – 0.92 (м, 1H), 0.84 – 0.79 (м, 1H), 0.78 (с, 3H), 0.63 (с, 3H).

¹³C ЯМР (125 МГц, CDCl₃): δ 202.2, 66.5, 63.9, 60.6, 56.8, 54.2, 45.2, 39.1, 39.0, 36.2, 35.9, 35.6, 32.3, 32.0, 29.0, 28.5, 24.6, 23.8, 20.9, 13.8, 11.3.

HRMS: рассчитано для [M+Na]⁺ C₂₁H₃₃BrO₂Na 419.1556; найдено *m/z* 419.1541

21-азид-3α-гидрокси-5α-прегнан-20-она (26)



К раствору 21-бромаллопрегнанолонa **25** (0.2 г, 0.50 ммоль, 1.0 экв.) в сухом ацетоне (10 мл) добавили NaN₃ (0.08 г, 1.25 ммоль, 2.5 экв.) и смесь кипятили в течение 3 ч. Контроль за ходом реакции осуществлялся методом ТСХ в системе ПЭ - EtOAc, 1:1. Реакционную смесь охладили до комнатной

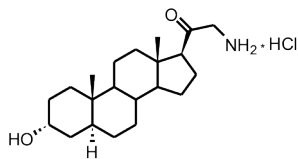
температуры, разбавили водой (30 мл) и экстрагировали CH₂Cl₂ (10 мл × 3). Объединенные органические слои промыли водой, насыщенным раствором NaCl (30 мл), сушили над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Продукт был получен в виде аналитически чистого образца и далее использовался без дополнительной очистки. Выход 99 % (0.18 г), белое твердое вещество, Т.пл. 149-150 °С; R_f = 0.20 (ПЭ/EtOAc, 1 : 1).

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃): δ 4.03 – 4.01 (м, 1H), 3.86 (с, 2H), 2.56 – 2.46 (м, 1H), 2.22 – 2.13 (м, 1H), 1.87 (дт, *J* = 11.4 Гц, 3.0 Гц, 1H), 1.73 – 1.13 (м, 19H), 1.00 – 0.90 (м, 1H), 0.83 – 0.78 (м, 1H), 0.77 (с, 3H), 0.63 (с, 3H).

¹³C ЯМР (125 МГц, CDCl₃): δ 204.1, 65.6, 63.0, 59.8, 56.0, 53.2, 44.1, 38.2, 38.1, 35.2, 35.0, 34.6, 31.3, 31.1, 28.1, 27.5, 23.6, 22.2, 19.9, 12.8, 10.2.

HRMS: рассчитано для [M+Na]⁺ C₂₁H₃₃N₃O₂Na 382.2465; найдено *m/z* 382.2455.

Гидрохлорид 21-амино-3 α -гидрокси-5 α -прегнан-20-она (27)



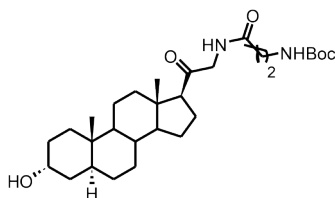
К раствору 21-азидаллопрегнанолона **26** (50 мг, 0.14 ммоль, 1.0 экв.) в метаноле (3.1 мл) добавили водный раствор HCl (0.24 мл, 0.28 ммоль, 2.0 экв.) и 10% палладий на угле (10 мг). Полученную смесь дегазировали при пониженном давлении и заполняли водородом (повторили три раза). Далее смесь интенсивно перемешивали в атмосфере водорода в течение 2 часов при комнатной температуре. Контроль за ходом реакции осуществляли методом ТСХ в системе ПЭ – EtOAc, 1 : 1. Реакционную смесь отфильтровывали от катализатора, растворитель выпаривали при пониженном давлении, тем самым получая бесцветное твердое вещество. Продукт был получен в виде аналитически чистого образца и далее использовался без дополнительной очистки. Выход 95 % (44 мг), белое твердое вещество, Т.пл. 250-251 °С.

¹H ЯМР (500 МГц, CD₃OD): δ 3.89 – 3.70 (м, 3H), 2.62 – 2.54 (м, 1H), 2.13–2.03 (м, 1H), 2.00 – 1.95 (м, 1H), 1.82–1.57 (м, 9H), 1.54–1.20 (м, 10H), 1.06–0.97 (м, 1H), 0.87 – 0.82 (м, 1H), 0.77 (с, 3H), 0.63 (с, 3H) (сигнал NH₂-группы не наблюдался).

¹³C ЯМР (125 МГц, CD₃OD): δ 204.7, 67.1, 61.6, 58.0, 55.6, 46.0, 40.2, 39.7, 37.2, 36.9, 36.7, 33.5, 33.2, 29.7, 29.6, 25.4, 23.8, 21.9, 13.9, 11.7.

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ C₂₁H₃₆NO₂ 334.2741; найдено m/z 334.2733.

Предшественник соединения **29a** (**28a**)



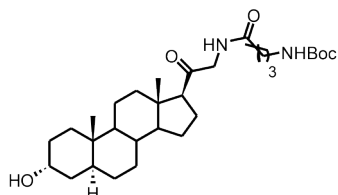
Суспензию активированной аминокислоты **23a** (40 мг, 0.14 ммоль, 1.0 экв.) и гидрохлорида 21-аминоаллопрегнанолона **27** (50 мг, 0.14 ммоль, 1.0 экв.) в сухом THF (2 мл) охлаждали до -5 °С в атмосфере аргона. Раствор DIPEA (0.026 мл, 0.15 ммоль, 1.1 экв.) в сухом THF (1 мл) медленно добавляли в течение 20 минут, затем реакционную смесь перемешивали в течение ночи при охлаждении. Растворитель упаривали при пониженном давлении с получением сухого остатка, который очищали колоночной хроматографией (ПЭ/EtOAc, 1 : 3). Продукт был получен в виде аналитически чистого образца и далее использовался без дополнительной очистки. Выход 67 % (47 мг), бесцветное твердое вещество, Т.пл. 130-131 °С, R_f = 0.20 (ПЭ/EtOAc, 1 : 3).

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃): δ 6.38 (уш. с, 1H), 5.18 (уш.с, 1H), 4.18 – 3.96 (м, 3H), 3.42 – 3.38 (м, 2H), 2.55 – 2.40 (м, 3H), 2.22 – 2.09 (м, 1H), 2.00 – 1.92 (м, 1H), 1.76 – 1.46 (м, 10H), 1.42 (с, 9H), 1.40 – 1.15 (м, 9H), 0.86 – 0.78 (м, 1H), 1.03 – 0.91 (м, 1H), 0.77 (с, 3H), 0.60 (с, 3H).

^{13}C ЯМР (125 МГц, CDCl_3): 206.0, 171.6, 156.1, 66.6, 61.1 57.0, 54.3, 50.7, 45.2, 39.2, 39.1, 36.3, 36.1, 35.9, 35.6, 32.3, 32.1, 29.1, 28.5 ($\times 3$), 24.6, 23.2, 20.9, 13.7, 11.3.

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_5$ 505.7042; найдено m/z 505.7064.

Предшественник соединения **29b** (**28b**)



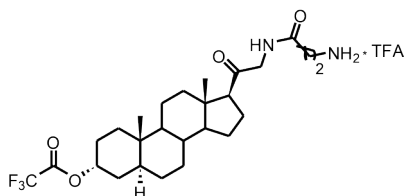
Суспензию активированной аминокислоты **23b** (42 мг, 0.14 ммоль, 1.0 экв.) и гидрохлорида 21-аминоаллопрегнанолонa **27** (50 мг, 0.14 ммоль, 1.0 экв.) в сухом THF (2 мл) охлаждали до $-5\text{ }^\circ\text{C}$ в атмосфере аргона. Раствор DIPEA (0.026 мл, 0.15 ммоль, 1.1 экв.) в сухом THF (1 мл) медленно добавляли в течение 20 минут, затем реакционную смесь перемешивали в течение ночи при охлаждении. Растворитель упаривали при пониженном давлении с получением сухого остатка, который очищали колоночной хроматографией (ПЭ/EtOAc, 1 : 3). Продукт был получен в виде аналитически чистого образца и далее использовался без дополнительной очистки. Выход 38 % (28 мг), бесцветное твердое вещество, Т.пл. $110\text{--}112\text{ }^\circ\text{C}$; $R_f = 0.21$ (ПЭ/EtOAc, 1 : 3).

^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3): δ 6.59 (уш. с, 1H), 4.81 (уш.с, 1H), 4.20 – 3.96 (м, 3H), 3.17 (т, $J = 7.00\text{ Гц}$, 2H), 2.55 – 2.47 (м, 1H), 2.30 (т, $J = 7.00\text{ Гц}$, 2H) 2.22 – 2.09 (м, 1H), 2.01-1.94 (м, 1H), 1.82 (п, $J = 7.00\text{ Гц}$, 2H), 1.75 – 1.47 (м, 10H), 1.44 (с, 9H), 1.41 – 1.18 (м, 9H), 1.03 – 0.92 (м, 1H), 0.86 – 0.79 (м, 1H), 0.77 (с, 3H), 0.61 (с, 3H).

^{13}C ЯМР (125 МГц, CDCl_3): δ 205.8, 172.2, 128.8, 127.9, 75.7, 61.0, 56.8, 53.8, 50.7, 45.1, 39.9, 38.9, 36.1, 35.8, 35.5, 35.2, 32.6, 32.4, 31.7, 29.8, 28.1, 25.8, 24.5, 23.2, 20.8, 17.2, 14.7, 13.7, 12.6, 12.0, 11.4.

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{N}_2\text{O}_5$ 519.7213; найдено m/z 519.7245.

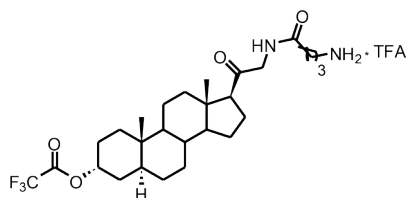
Соединение **29a**



N-Вос-защищенный предшественник соединения **28a** (47 мг, 0.095 ммоль) растворяли в смеси TFA и CH_2Cl_2 (1:1, 2.0 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, затем упаривали под вакуумом. Маслянистый остаток перетирали с диэтиловым эфиром, после чего растворитель декантировали, получая 57 мг продукта в виде нестабильного бесцветного твердого вещества, которое сразу использовали на следующей стадии.

^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3): δ 8.10 (уш.с, 2H), 7.56 (с, 1H), 4.60 (с, 1H), 4.19 – 3.92 (м, 3H), 3.39 – 3.23 (м, 2H), 2.81 – 2.69 (м, 2H), 2.69 (с, 2H), 2.55 – 2.45 (м, 1H), 2.18 – 1.90 (м, 2H), 1.78 – 1.27 (м, 16H), 1.06 – 0.90 (м, 1H), 0.83 – 0.75 (м, 3H), 0.62 – 0.56 (м, 3H).

Соединение **29b**



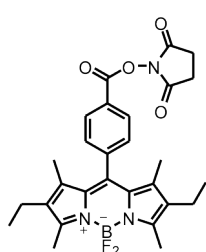
N-Вос-защищенный предшественник соединения **28b** (42 мг, 0.068 ммоль) растворяли в смеси TFA и CH_2Cl_2 (1:1, 2.0 мл).

Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего упаривали под вакуумом.

Маслянистый остаток перетирали с диэтиловым эфиром, и растворитель удаляли декантированием, получая 38 мг продукта в виде нестабильного бесцветного твердого вещества, которое сразу использовали на следующей стадии.

^1H -ЯМР (500 МГц, CDCl_3): δ 7.49 – 7.30 (м, 1H), 4.01 – 3.88 (м, 3H), 3.33 (уш.с, 2H), 3.04–2.91 (м, 2H), 2.69 (уш.с, 1H), 2.58 – 2.46 (м, 1H), 2.46 – 2.34 (м, 2H), 2.22 – 1.86 (м, 4H), 1.84 – 1.23 (м, 14H), 1.06 – 0.87 (м, 1H), 0.86 – 0.74 (м, 4H), 0.60 (с, 3H).

N-сукцинимидный эфир BODIPY-карбоновой кислоты **31**



К раствору BODIPY-COOH (100 мг, 0.24 ммоль) в MeCN (10 мл) при комнатной температуре добавили N-гидроксисукцинимид (41 мг, 0.36 ммоль).

Реакционную смесь охладил до 0 °С, затем по каплям добавили диизопропилкарбодиимид (0.093 мл, 0.60 ммоль) в 1 мл MeCN. Реакционную смесь перемешивали в течение 45 мин при 0 °С и в течение 24 ч при комнатной

температуре и затем концентрировали под пониженным давлением (температура не превышала 20 °С). Остаток растворили в CH_2Cl_2 (150 мл), промыли водой (15 мл $\times$ 2) и сушили над безводным Na_2SO_4 . Смесь концентрировали в вакууме и очищали колоночной хроматографией (CH_2Cl_2). Полученный продукт был выделен в виде аналитически чистого образца. Выход 80% (100 мг), оранжево-красное твердое вещество.

^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3): δ 8.26 (д, $J = 8.2$ Гц, 2H), 7.50 (д, $J = 8.2$ Гц, 2H), 2.94 (уш. с, 4H), 2.53 (с, 6H), 2.30 (кв, $J = 7.5$ Гц, 4H), 1.27 (с, 6H), 0.98 (т, $J = 7.5$ Гц, 6H).

^{13}C ЯМР (125 МГц, CDCl_3): δ 169.3, 161.5 ($\times 2$), 154.8, 143.1 ($\times 2$), 138.1 ($\times 2$), 137.9, 133.4 ($\times 2$), 131.3 ($\times 2$), 130.2, 129.5 ($\times 2$), 125.7 ($\times 2$), 25.8 ($\times 2$), 17.2 ($\times 2$), 14.7 ($\times 2$), 12.7 ($\times 2$), 12.2 ($\times 2$).

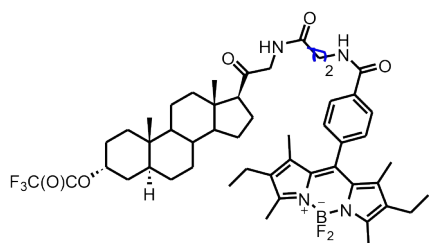
^{19}F ЯМР (470 МГц, CDCl_3): δ -145.73 (кв, $J_{\text{F-B}} = 33.0$ Гц).

^{11}B ЯМР (160 МГц, CDCl_3): δ 0.76 (т, $J_{\text{B-F}} = 33.0$ Гц).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $C_{28}H_{31}BF_2N_3O_4$ 522.2375; найдено m/z 522.2363.

V.4.2 Получение целевых соединений

Соединение BODIPY-3 α 5 α THP I



Соединение **28a** (32 мг, 0.054 ммоль, 1.0 экв.), BODIPY **29** (28 мг, 0.054 ммоль, 1.0 экв.) и DIPEA (15 мкл, 0.081 ммоль, 1.5 экв.) замешали в DMF (4 мл) при -5 °С. Гомогенный раствор выдерживали при -5 °С в течение 24 ч. После чего реакционную смесь разбавили водой (20 мл). Водную фазу экстрагировали

CH_2Cl_2 (10 мл $\times$ 3). Объединенные органические слои промывали водой (10 мл $\times$ 8), сушили над Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией (ПЭ/EtOAc, 1 : 3), выделив аналитически чистый продукт. Выход 29 % (14 мг), оранжево-красное твердое вещество.

1H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$): δ 7.95 (д, $J = 8.4$ Гц, 2H), 7.45 (т, $J = 5.7$ Гц, 1H), 7.37 (д, $J = 8.4$ Гц, 2H), 6.36 (т, $J = 4.5$ Гц, 1H), 5.26 – 5.22 (м, 1H), 4.16 (дд, $J = 19.6$ Гц, 4.6 Гц, 1H), 4.05 (дд, $J = 19.6$ Гц, 4.5 Гц, 1H), 3.81 (кв, $J = 5.6$ Гц, 2H), 2.65 – 2.58 (м, 2H), 2.53 (с, 4H), 2.52 – 2.48 (м, 1H), 2.29 (кв, $J = 7.6$ Гц, 4H), 2.23 – 2.12 (м, 1H), 2.02 – 1.94 (м, 1H), 1.86 – 1.50 (м, 10H), 1.48 – 1.18 (м, 8H), 1.25 (с, 6H), 0.98 (т, $J = 7.6$ Гц, 6H), 0.91 – 0.87 (м, 1H), 0.87 – 0.82 (м, 1H), 0.80 (с, 3H), 0.62 (с, 3H).

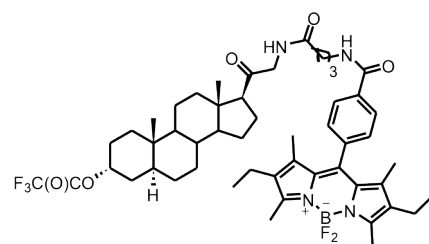
^{13}C NMR (125 МГц, $CDCl_3$): δ 205.9, 172.3, 128.9, 128.0, 75.8, 61.1, 56.8, 53.9, 50.8, 45.2, 39.9, 39.0, 36.2, 35.9, 35.5, 35.2, 32.6, 32.5, 31.8, 29.9, 28.1, 25.9, 24.6, 23.2, 20.9, 17.2, 14.7, 13.7, 12.7, 12.0, 11.5.

^{19}F ЯМР (470 МГц, $CDCl_3$): δ -75.26 (с, 3F), -145.80 (кв, $J = 33.1$ Гц, 2F).

^{11}B ЯМР (160 МГц, $CDCl_3$): δ 0.79 (т, $J = 33.1$ Гц).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $C_{50}H_{65}BF_5N_4O_5$ 907.4971; найдено m/z 907.4955.

Соединение BODIPY-3 α 5 α THP II



Соединение **28b** (38 мг, 0.062 ммоль, 1.0 экв.), BODIPY **29** (35 мг, 0.062 ммоль, 1.0 экв.) и DIPEA (16 мкл, 0.081 ммоль, 1.5 экв.) замешали в DMF (4 мл) при -5 °С. Гомогенный раствор выдерживали при -5 °С в течение 24 ч. После чего реакционную смесь разбавили водой (20 мл). Водную фазу экстрагировали

CH_2Cl_2 (10 мл $\times$ 3). Объединенные органические слои промыли водой (10 мл $\times$ 8), сушили над Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Остаток очистили колоночной хроматографией

(ПЭ/EtOAc, 1 : 3), выделив аналитически чистый продукт. Выход 47% (27 мг), оранжево-красное твердое вещество.

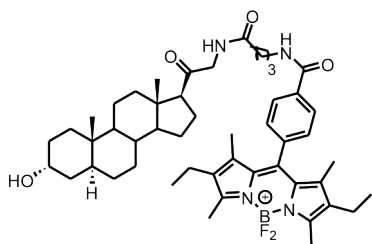
^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3): δ 7.98 (д, $J = 8.1$ Гц, 2H), 7.49 (уш. с, 1H), 7.37 (д, $J = 8.1$ Гц, 2H), 6.56 (уш. с, 1H), 5.27 – 5.21 (м, 1H), 4.18 (дд, $J = 19.8, 4.8$ Гц, 1H), 4.01 (дд, $J = 19.8, 4.2$ Гц, 1H), 3.58 (кв, $J = 5.6$ Гц, 2H), 2.53 (с, 6H), 2.51 – 2.43 (м, 3H), 2.30 (кв, $J = 7.6$ Гц, 4H), 2.24 – 2.11 (м, 1H), 2.07 – 1.95 (м, 3H), 1.90 – 1.51 (м, 10H), 1.51 – 1.16 (м, 8H), 1.26 (с, 6H), 0.98 (т, $J = 7.6$ Гц, 6H), 0.88 – 0.80 (м, 2H), 0.77 (с, 3H), 0.62 (с, 3H).

^{13}C ЯМР (125 МГц, CDCl_3): δ 205.9, 173.5, 166.8, 165.3, 154.3, 139.2, 138.3, 134.9, 133.1, 130.6, 128.8, 127.9, 75.8, 61.1, 56.8, 53.9, 50.9, 45.1, 40.4, 39.9, 39.0, 35.9, 35.5, 34.3, 32.6, 32.5, 32.0, 31.8, 29.2, 28.1, 25.9, 24.5, 24.5, 23.2, 22.8, 20.9, 17.2, 14.7, 14.2, 13.7, 12.7, 12.0, 11.4.

^{19}F ЯМР (470 МГц, CDCl_3): δ -75.26 (с, 3F), -145.74 (кв, $J = 33.2$ Гц, 2F). ^{11}B ЯМР (160 МГц, CDCl_3): δ 0.78 (т, $J = 33.2$ Гц).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{51}\text{H}_{66}\text{BF}_5\text{N}_4\text{O}_5$ 921.5128; найдено m/z 921.5105

Соединение BODIPY-3 α 5 α ТНР III



К раствору соединения BODIPY-3 α 5 α ТНР II (20 мг, 0.022 ммоль) в THF/MeOH (1.8 мл, 1 : 1) добавили LiOH (0.5 мл, 1.2М в H_2O). После перемешивания в течение 5 ч реакционную смесь разбавили водой, экстрагировали CH_2Cl_2 ($\times 3$), сушили Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Полученный остаток очищали колоночной

хроматографией (ПЭ/EtOAc, 1 : 3). Продукт выделен в качестве аналитически чистого образца. Выход 57% (10 мг), оранжево-красное твердое вещество.

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ 7.98 (д, $J = 8.0$ Гц, 2H), 7.55 (с, 1H), 7.37 (д, $J = 8.0$ Гц, 2H), 6.61 (с, 1H), 4.22 – 3.95 (м, 3H), 3.62 – 3.51 (м, 2H), 2.72 (уш. с, 1H), 2.53 (с, 6H), 2.50 – 2.43 (м, 2H), 2.29 (кв, $J = 7.3$ Гц, 4H), 2.21 – 2.09 (м, 1H), 2.08 – 1.91 (м, 3H), 1.77 – 1.15 (м, 19H), 1.25 (с, 6H), 0.97 (т, $J = 7.3$ Гц, 6H), 0.90 – 0.77 (м, 2H), 0.73 (с, 3H), 0.61 (с, 3H).).

^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3): δ 206.1, 173.6, 171.6, 166.9, 154.3, 139.2, 138.3, 134.8, 133.1, 130.6, 128.8, 128.0, 66.7, 61.1, 57.0, 54.3, 50.9, 45.2, 40.4, 39.2, 39.1, 36.2, 35.9, 35.6, 34.2, 32.3, 32.1, 29.8, 29.1, 28.5, 24.6, 24.5, 23.2, 20.9, 17.2, 14.7, 13.7, 12.7, 12.0, 11.3.

^{19}F ЯМР (282 МГц, CDCl_3): δ -146.48 (кв, $J = 32.4$ Гц).

^{11}B ЯМР (96 МГц, CDCl_3): δ 0.79 (т, $J = 32.4$ Гц).

HRMS: рассчитано для $[M+H]^+$ $\text{C}_{49}\text{H}_{68}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_4$ 825.5304; найдено m/z 825.5314.

V.5 Изучение фотофизических свойств.

V.5.1 Регистрация спектров поглощения и флуоресценции с растворов.

Регистрация проводилась в кварцевых кюветах ($l = 10$ мм, $V = 3$ мл). Спектры УФ и видимой области регистрировались на приборе Agilent Cary 60 UV–Vis в различных растворителях (ацетонитрил, метанол, дистиллированная вода, глицерин, анизол, 1,2-дихлорбензол, DMF, DMSO, тетрагидрофуран), которые имели спектроскопическую чистоту. Спектры флуоресценции регистрировали с помощью спектрофлуориметра Agilent Cary Eclipse в разных растворителях при комнатной температуре (25 °C). Измерение флуоресценции проводилось с использованием щелей возбуждения и испускания: 2.5 — 2.5 соответственно для концентрации 10^{-5} и 5 — 2.5 для 10^{-6} . Длина волны возбуждения, используемая для записи спектров флуоресценции, была на 5 нм меньше относительно полосы поглощения в случае каждого соединения. Для квантовых измерений флуоресценции поглощение растворов на длине волны возбуждения было <0.1 . Квантовые выходы флуоресценции определяли с использованием флуоресцеина в 0.1 М этаноле КОН ($\Phi_f = 0.95$) в качестве эталона [200]. Относительные квантовые выходы флуоресценции Φ_f , были рассчитаны при различных концентрациях по формуле [201]:

$$\Phi_S = \Phi_R \frac{Grad_S}{Grad_R} \left(\frac{n_S}{n_R} \right)^2$$

V.5.2 Изучение плёнок методами УФ и флуоресценции спектроскопии.

Спектры поглощения плёнок соединений циклен производных BODIPY, нанесённых на кварцевые подложки, были записаны в УФ и видимом диапазоне (300–800 нм) с помощью спектрофотометра Shimadzu 2450 PC (Япония).

Аналогично для данных плёнок были записаны спектры флуоресценции в диапазоне от 480 до 800 нм на спектрофлуориметре RF-5301 Shimadzu (Япония). Для того чтобы отражённый возбуждающий свет не попадал напрямую на детектор флуориметра, кварцевые подложки с нанесёнными плёнками были закреплены вертикально под углом в 45° относительно падающего излучения. В таком положении возбуждающий свет отражался в направлении, противоположном от детектора. Съёмка спектров флуоресценции осуществлялась с щелями 5 – 10 для возбуждающего и эмиссионного излучения соответственно.

V.5.3. Эксперимент по изучению температурной зависимости.

Растворы исследуемых соединений **5a** или **5b** (10 мкл, фосфатно-солевой буферный раствор) постепенно нагревали до 50 °C в кювете, погружённой в водяную баню. Кювету с

неглубоко погружённой термопарой охлаждали на воздухе при комнатной температуре до 25 °С. Спектры флуоресценции раствора записывали с интервалом в пять градусов.

V.5.4. Флуоресцентное pH-титрование.

Базовые растворы с различными значениями pH (от 1 до 13) были приготовлены путём разбавления 0.1 М растворов HCl и KOH дистиллированной водой. Значение pH раствора измеряли с помощью pH-метра HANNA HI 98103 Checker. После измерения pH часть раствора переносили в кварцевую ячейку объёмом 3 мл. Затем в кювету добавляли 10 мкл раствора соединений **5a** или **8a** (MeCN, 3×10^{-3} М), так что итоговая концентрация красителя составляла 10^{-5} М. Регистрировали спектры флуоресценции полученного раствора.

V.5.5. Флуоресцентное pH-титрование для измерения pKa.

Был использован литературный протокол [202]. Измерения pH проводили с помощью прибора «Mettler Toledo» (Грайфензе, Швейцария) с комбинированным электродом LE438 в стеклянной ячейке. Электрод калибровали с использованием коммерческих буферных растворов (pH = 4,01 и 7,00). УФ-видимые спектры регистрировали на спектрофотометре Hitachi U-2900 (Токио, Япония) в кварцевой кювете (Hellma, $l = 1$ см). Флуоресцентные спектры записывали на спектрофлуориметре Horiba Jobin Yvon Fluoromax-2 (Эдисон, Нью-Джерси, США) в кварцевой кювете (Hellma, $l = 1$ см).

Исследования протонирования соединений **5a** проводили при комнатной температуре. Растворы готовили с использованием деионизированной воды высокой чистоты (18,2 МОм·см), полученной на установке «Millipore Simplicity» (Merck Co., Рахвей, Нью-Джерси, США). Концентрации растворов и условия экспериментов указаны в подписях к соответствующим рисункам и таблицам.

Исследования протонирования проводили в стеклянной ячейке с магнитной мешалкой и pH-электродом, добавляя к растворам лигандов ($I = 0,1$ М, NaClO₄) HClO₄ (5 М или 0,01 М) или NaOH (10 М или 0,01 М). Значения pKa, спектры частиц и диаграммы распределения форм рассчитаны методом нелинейного метода наименьших квадратов с использованием программы НурСрес[50] после факторного анализа объединённых наборов данных. Качество аппроксимации оценивали по нормированному стандартному отклонению остатков (s), которое в отсутствие систематических ошибок и при правильном выборе весовых коэффициентов должно быть близко к единице. УФ- и флуоресцентные спектры, рассчитанные спектры частиц, диаграммы распределения форм и кривые титрования приведены в дополнительных материалах.

V.5.6. УФ/видимое и флуориметрическое спектроскопическое детектирование ионов металлов.

Подготовлены растворы в сухом MeCN для флуориметрического и УФ/видимого обнаружения: Базовые растворы (7.70 мМ) различных перхлоратных солей, включая соли Li⁺, K⁺, Na⁺, Mg²⁺, Ba²⁺, Al³⁺, Cr³⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺, Pb²⁺, Hg²⁺, Co²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺; также растворы красителей **5a**, **8a** (3 мМ). Для оценки комплексообразования соединений к их растворам (3 мл H₂O/PBS, 10 мкМ) добавляли аликвоты (4 мкл) ионов металлов. Затем регистрировали спектры поглощения и флуоресценции полученных растворов.

V.5.7. Динамическое рассеяние света (ДРС) и сканирующая электронная микроскопия (СЭМ).

Результаты динамического рассеяния света (ДРС) были получены на приборе Malvern Zetasizer Nano ZS. Концентрация соединения **5a** в буферных растворах составляла 10⁻⁵ М.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) была выполнена с использованием прибора Leo Supra 50VP. Образец **5a**, полученный медленным упариванием на воздухе на кремниевой пластине капли водного раствора (10⁻⁵ М), был исследован с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Изображения СЭМ были статистически проанализированы с помощью программного обеспечения ImageJ.

V.6 Исследования *in vitro*

V.6.1 Оценка антипролиферативной активности.

Антипролиферативную активность оценивали с помощью анализа с использованием метилтиазолилтетразолия (МТТ) на клеточной линии рака молочной железы MCF7, приобретённой у компании ATCC. Клетки MCF7 выращивали в среде DMEM, дополненной 10 % FBS (фетальной бычьей сывороткой, HyClone), при температуре 37 °С в присутствии 5 % CO₂.

Обработка клеток MCF7 проводилась растворами красителей AM-BODIPY **5a** и **8a** с концентрацией 3.1, 6.2, 12.5, 25 и 50 мкМ. После инкубирования (72 часа при 37 °С и 5% CO₂) в лунки был добавлен раствор МТТ для проведения анализа.

V.6.2 Флуоресцентная визуализация живых клеток.

Клетки MCF7 были помещены в шестилуночные планшеты и оставлены для прикрепления на 24 часа. Затем клетки последовательно промывали средой DMEM и инкубировали с раствором

AM-BODIPY **5a** и **8a** (7.5, 15 и 30 мкМ) при температуре 37 °C и 5% содержании CO₂ в течение 4 часов. Инкубированные красителем клетки MCF7 еще раз промывали средой DMEM и оценивали возможность визуализации клеток. Для визуализации красителей AM-BODIPY **5a** и **8a** использовался микроскоп Carl Zeiss Axiovert 200 с объективом Plan-Neofluar 40x и набором фильтров 09 (EX BP 450–490, BS FT 510, EM LP 515). Изображения были получены с помощью камеры Carl Zeiss AxioCam MRc с использованием программного обеспечения AxioVision версии 4.6.

Протокол окрашивания представлял собой модификацию методик, используемых для окрашивания кальциевых индикаторов: срезы инкубировали с BODIPY-3α5αTHP **III** в течение 25 минут. Конечная концентрация BODIPY-3α5αTHP **III** в инкубационном растворе составляла 15 мкМ. После инкубации избыток красителя удаляли путем 3-5-кратного промывания срезов искусственной цереброспинальной жидкостью (ACSF).

В экспериментах с двойным окрашиванием сначала проводили окрашивание сульфородаминоом 101. Красный флуоресцентный краситель сульфородамин 101 (SR101, S7635, Sigma) в ACSF (10 мкмоль) наносили локально на 25 минут для мечения астроцитов.

После процедуры окрашивания срезы анализировали на конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 (Leica, Германия), оснащенном набором лазеров. Наблюдения проводили с использованием водно-иммерсионного объектива HC X APO L 20×/1.0 W (апертура 1.00). BODIPY-3α5αTHP **III** возбуждали при длине волны 514 нм, а флуоресцентное излучение регистрировали в диапазоне 525–560 нм. SR101 возбуждали при 561 нм с регистрацией эмиссии в диапазоне 575–620 нм.

Эпифлуоресцентные изображения получали с использованием объектива 40× (40xW, N.A. 0.8, Olympus) на прямом микроскопе (BX51WI, Olympus), оснащенном цифровой камерой (CCD, Rolera XR, Q-Imaging, Канада), подключенной к компьютеру через интерфейс с использованием программного обеспечения Image Pro Plus v7.01 (Media Cybernetics Inc.). Возбуждающий свет генерировали при 470 нм (система возбуждения pE-2, ColLED Ltd., Великобритания). Для визуализации BODIPY-3α5αTHP **III** использовали возбуждающий фильтр ET470/40, дихроичное зеркало T495 long pass и эмиссионный фильтр ET525/50.

Тест на фотостабильность проводили с использованием относительного значения интенсивности: $Y(t) = (F(t)/F_0) \times 100\%$, где F_0 и $F(t)$ представляют средние значения флуоресцентной интенсивности в области интереса (ROI), зарегистрированные в начале эксперимента (F_0) и в момент времени t ($F(t)$). Временную зависимость аппроксимировали моноэкспоненциальной функцией: $Y(t) = (100\% - A) \times \exp(-t/\tau_{1/2}) + A$, где A - асимптотическое значение $Y(t)$ при $t \rightarrow \infty$ ("плато"), $\tau_{1/2}$ - период полураспада. Обработку изображений проводили оффлайн с использованием ImageJ вер. 1.54p (NIH, США).

V.6.3 Электрофизиологические исследования.

Все эксперименты на крысах проводились в соответствии с требованиями Министерства здравоохранения Российской Федерации и соответствовали Директиве ЕС по использованию экспериментальных животных Европейского сообщества. Исследование было одобрено этическим комитетом Научного центра неврологии, протокол №10-8/21 от 17.11.2021. Были приложены максимальные усилия для минимизации как количества используемых животных, так и их страданий.

Парасагиттальные срезы мозжечка готовили из молодых крыс линии Вистар (возраст 12-18 дней после рождения), как было описано ранее [46]. Вкратце, животных быстро декапитировали, весь мозг извлекали и переносили в охлажденный (+4°C) инкубационный раствор. Мозжечок выделяли и разрезали по сагиттальной линии, после чего фиксировали на платформе микротом. Платформу с мозжечком помещали в ванну, заполненную инкубационным раствором, и устанавливали на вибротом (Campden 7000smz-2, Campden Instruments Limited, Великобритания). Срезы мозжечка (толщиной 300-400 мкм) инкубировали при комнатной температуре в течение 1-6 часов перед использованием. Инкубационный раствор (ACSF) имел следующий состав (в mM): NaCl 125, KCl 5, CaCl₂ 1.5, MgCl₂ 1.5, NaH₂PO₄ 1.28, NaHCO₃ 25, глюкоза 10; раствор постоянно насыщали карбогеном (5% CO₂ + 95% O₂).

Затем каждый срез по отдельности помещали в регистрационную камеру, где нейроны изолировали с помощью вертикальной вибрации стеклянной сферы диаметром 0.7 мм, помещенной близко к поверхности среза [50]. Манипуляции и идентификацию клеток проводили с помощью инвертированного микроскопа. Изолированные клетки Пуркиньи отличали от других клеток мозжечка по их крупным телам (около 20 мкм) и характерной грушевидной форме, обусловленной остатком апикального дендрита. Процедуры диссоциации и регистрации проводили в растворе следующего состава (в mM): 150 NaCl, 5 KCl, 2.7 CaCl₂, 2.0 MgCl₂, 10 HEPES; pH доводили до 7.4 с помощью NaOH.

Все эксперименты проводили в режиме voltage clamp с использованием стандартного метода whole-cell patch clamp при температуре 22-24°C. После установления whole-cell конфигурации нейроны удерживали при потенциале -70 мВ с помощью усилителя EPC-7 (НЕКА Elektronik, Германия). Внутриклеточные пипетки (2-5 МОм) заполняли внутриклеточным раствором (в mM: 140 CsCl, 1 CaCl₂, 2 MgCl₂, 2 MgATP, 10 HEPES/CsOH и 5 EGTA/CsOH, pH 7.25). В большинстве экспериментов ГАМК применяли в течение 2-15 секунд для активации ГАМК_A-рецепторов с интервалами в одну минуту.

Применение растворов, содержащих агонист, осуществляли с использованием техники концентрационного скачка и системы быстрого приложения, управляемой шаговым двигателем, как было описано ранее [51]. После установки пипетки клетку поднимали в систему приложения, где ее постоянно перфузировали контрольным раствором. Для воздействия ГАМК/ГАМК + тестируемое соединение систему приложения перемещали, чтобы поместить клетку в поток раствора, выходящего из капилляра приложения.

Регистрировали ответы на воздействие различных концентраций тестируемых соединений (равноудаленные значения в логарифмической шкале) и фиксированной концентрации ГАМК (0.3 мкМ), измеряя пиковые амплитуды: $I_{\text{peak}}(A) = I([0.3 \text{ мкМ ГАМК}] + [A])$. Затем амплитуды токов нормировали на амплитуду контрольного ответа на ГАМК без добавления соединения: $I_{\text{rel}}(A) = I_{\text{peak}}(A)/I_{\text{peak}}([0])$. Для каждого соединения строили концентрационно-эффективную зависимость, отображая усредненные нормированные ответы в зависимости от концентрации соединения. Максимальный потенцирующий эффект вычисляли при концентрации соединения 10 мкМ и выражали как $I_{\text{rel}}([10 \text{ мкМ}]) \times 100\%$.

В соответствующих случаях концентрационно-эффективные зависимости аппроксимировали с использованием трехпараметрического аналога уравнения Хилла:

$$I_{\text{rel}}(A) = 1 + \frac{M}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{[A]}\right)^h}$$

где: $[A]$ — концентрация соединения; M — максимальный предсказанный потенцирующий эффект соединения; EC_{50} — концентрация соединения, вызывающая потенцирование, равное 50% от максимального предсказанного эффекта; h — коэффициент Хилла. Анализ проводили с использованием программы Prism v5.0 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

V.7 Квантово-химические расчеты

Оптимизация геометрии и анализ частот колебаний выполняли с использованием программы Gaussian 16 Rev.A03. Оптимизацию геометрии и анализ частот колебаний осуществляли с применением функционала ω B97XD DFT и базисного набора def2-SVP. Декартовы координаты приведены в ангстремах; абсолютные энергии — в хартри. Все соединения характеризовались только реальными частотами колебаний. Также осуществляли проверку стабильности волновой DFT функции основного состояния структур используя ключевое слово «stable».

Для расчётов оптимизированной геометрии основного состояния, частот и термодинамики использовались следующие ключевые слова:

Первое синглетное возбуждённое состояние молекул рассчитывали с помощью TD-DFT (time-dependent density functional theory — метод функционала плотности, зависящий от времени). А именно, оптимизировали геометрию первого возбуждённого синглетного состояния двух различных димеров 5a с использованием программы Gaussian 16 Rev.A03.. Для этого применялся метод TD-DFT с функционалом ω B97XD и базисным набором def2-SVP для всех атомов. Первые возбуждённые синглетные состояния обоих соединений характеризовались только реальными частотами колебаний.

Оптимизация геометрии и анализ частот колебаний комплекса 5a с Cu (II) были выполнены с использованием программы ORCA версии 4.2.1. Оптимизация геометрии и анализ частот колебаний были проведены в программе ORCA с применением функционала TPSSh DFT с эмпирической дисперсионной коррекцией D3BJ. Использовался базисный набор ZORA-def2-TZVPP, SARC/J для атома Cu и ZORA-def2-SVP, SARC/J — для остальных атомов.

Релятивистские эффекты были учтены путём запроса релятивистского расчёта ZORA с одноцентровым приближением и с включением picture change эффекта. Декартовы координаты приведены в ангстремах; абсолютные энергии для всех веществ приведены в хартри. Комплекс характеризовался только реальными частотами колебаний. Также для проверки стабильности волновой функции DFT использовалось ключевое слово «%scf Stabperform true end».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Resch-Genger U., Grabolle M., Cavaliere-Jaricot S., Nitschke R., Nann T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels // *Nature methods*. – 2008. – Т. 5, № 9. – С. 763-775.
2. Ulrich G., Ziessel R., Harriman A. The chemistry of fluorescent bodipy dyes: versatility unsurpassed // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2008. – Т. 47, № 7. – С. 1184-1201.
3. Mula S., Ray A. K., Banerjee M., Chaudhuri T., Dasgupta K., Chattopadhyay S. Design and development of a new pyrromethene dye with improved photostability and lasing efficiency: theoretical rationalization of photophysical and photochemical properties // *The Journal of organic chemistry*. – 2008. – Т. 73, № 6. – С. 2146-2154.
4. Mula S., Frein S., Russo V., Ulrich G., Ziessel R., Barbera J., Deschenaux R. Red and blue liquid-crystalline borondipyrromethene dendrimers // *Chemistry of Materials*. – 2015. – Т. 27, № 7. – С. 2332-2342.
5. Wood T. E., Thompson A. Advances in the chemistry of dipyrins and their complexes // *Chemical reviews*. – 2007. – Т. 107, № 5. – С. 1831-1861.
6. Shah M., Thangaraj K., Soong M. L., Wolford L. T., Boyer J. H., Politzer I. R., Pavlopoulos T. G. Pyrromethene–BF₂ complexes as laser dyes: 1 // *Heteroatom Chemistry*. – 1990. – Т. 1, № 5. – С. 389-399.
7. Boyer J. H., Haag A. M., Sathyamoorthi G., Soong M. L., Thangaraj K., Pavlopoulos T. G. Pyrromethene–BF₂ complexes as laser dyes: 2 // *Heteroatom Chemistry*. – 1993. – Т. 4, № 1. – С. 39-49.
8. Li Z., Mintzer E., Bittman R. First synthesis of free cholesterol–BODIPY conjugates // *The Journal of organic chemistry*. – 2006. – Т. 71, № 4. – С. 1718-1721.
9. Yakubovskiy V. P., Shandura M. P., Kovtun Y. P. Boradipyrromethenecyanines // *Book Boradipyrromethenecyanines / Editor Wiley Online Library*, 2009.
10. Boens N., Verbelen B., Dehaen W. Postfunctionalization of the BODIPY core: synthesis and spectroscopy // *European Journal of Organic Chemistry*. – 2015. – Т. 2015, № 30. – С. 6577-6595.
11. Rurack K., Kollmannsberger M., Daub J. A highly efficient sensor molecule emitting in the near infrared (NIR): 3, 5-distyryl-8-(p-dimethylaminophenyl) difluoroboradiaza-s-indacene // *New Journal of Chemistry*. – 2001. – Т. 25, № 2. – С. 289-292.
12. Deniz E., Isbasar G. C., Bozdemir O. A., Yildirim L. T., Siemiarczuk A., Akkaya E. U. Bidirectional switching of near IR emitting boradiazaindacene fluorophores // *Organic letters*. – 2008. – Т. 10, № 16. – С. 3401-3403.
13. Loudet A., Burgess K. BODIPY dyes and their derivatives: syntheses and spectroscopic properties // *Chemical reviews*. – 2007. – Т. 107, № 11. – С. 4891-4932.
14. Boens N., Leen V., Dehaen W. Fluorescent indicators based on BODIPY // *Chemical Society Reviews*. – 2012. – Т. 41, № 3. – С. 1130-1172.
15. Kowada T., Maeda H., Kikuchi K. BODIPY-based probes for the fluorescence imaging of biomolecules in living cells // *Chemical Society Reviews*. – 2015. – Т. 44, № 14. – С. 4953-4972.
16. Kolemen S., Akkaya E. U. Reaction-based BODIPY probes for selective bio-imaging // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2018. – Т. 354. – С. 121-134.

17. Shi Z., Han X., Hu W., Bai H., Peng B., Ji L., Fan Q., Li L., Huang W. Bioapplications of small molecule Aza-BODIPY: from rational structural design to in vivo investigations // *Chemical Society Reviews*. – 2020. – T. 49, № 21. – C. 7533-7567.
18. Qin Y., Liu X., Jia P.-P., Xu L., Yang H.-B. BODIPY-based macrocycles // *Chemical Society Reviews*. – 2020. – T. 49, № 16. – C. 5678-5703.
19. Wang L., Ding H., Ran X., Tang H., Cao D. Recent progress on reaction-based BODIPY probes for anion detection // *Dyes and Pigments*. – 2020. – T. 172. – C. 107857.
20. Barattucci A., Campagna S., Papalia T., Galletta M., Santoro A., Puntoriero F., Bonaccorsi P. BODIPY on board of sugars: a short enlightened journey up to the cells // *ChemPhotoChem*. – 2020. – T. 4, № 9. – C. 647-658.
21. Solomonov A. V., Marfin Y. S., Rumyantsev E. V. Design and applications of dipyrroin-based fluorescent dyes and related organic luminophores: From individual compounds to supramolecular self-assembled systems // *Dyes and Pigments*. – 2019. – T. 162. – C. 517-542.
22. Yang C., Wang X. Lysosome biogenesis: Regulation and functions // *Journal of Cell Biology*. – 2021. – T. 220, № 6. – C. e202102001.
23. Saftig P., Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2009. – T. 10, № 9. – C. 623-635.
24. Mukherjee N., Gaur R., Shahabuddin S., Chandra P. Recent progress in lysosome-targetable fluorescent BODIPY probes for bioimaging applications // *Materials Today: Proceedings*. – 2022. – T. 62. – C. 7082-7087.
25. Duan X., Tong Q., Fu C., Chen L. Lysosome-targeted fluorescent probes: design mechanism and biological applications // *Bioorganic Chemistry*. – 2023. – T. 140. – C. 106832.
26. Yadav A., Rao C., Nandi C. K. Fluorescent probes for super-resolution microscopy of lysosomes // *ACS omega*. – 2020. – T. 5, № 42. – C. 26967-26977.
27. Sniderman A., Cianflone K., Arner P., Summers L., Frayn K. The adipocyte, fatty acid trapping, and atherogenesis // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 1998. – T. 18, № 2. – C. 147-151.
28. Eissenberg L. G., Goldman W. E. Fusion of lysosomes with phagosomes containing *Histoplasma capsulatum*: use of fluoresceinated dextran // *Host Defenses and Immunomodulation to Intracellular Pathogens*. – 1988. – C. 53-61.
29. Wang Y., Huo F., Yin C. Development of human serum albumin fluorescent probes in detection, imaging, and disease therapy // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2024. – T. 128, № 5. – C. 1121-1138.
30. Wang X.-Y., Lin Y.-M., Sun X.-Y., Wu Y.-Q., Miao H., Chu J., Bai T.-W., Fu Y.-L. A lysosomal targeted fluorescent probe based on BODIPY for monitoring NO in living cells and zebrafish imaging // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2023. – T. 383. – C. 133592.
31. Wang X., Sun Q., Song X., Wang Y., Hu W. Development of a ratiometric nitric oxide probe with baseline resolved emissions by an ESIPT and rhodol ring opened-closed integrated two-photon platform // *RSC advances*. – 2022. – T. 12, № 5. – C. 2721-2728.

32. Antosova M., Plevkova J., Strapkova A., Buday T. Nitric oxide—Important messenger in human body // *Open journal of molecular and integrative physiology*. – 2012. – T. 2, № 3. – C. 98-106.
33. Chan C., Gao H., Wu J., Li J., Tian J., Xue Z. AIE-active large Stokes-shift BODIPY Functionalized with Carbazolyl for Lysosome-Targeted Imaging in Living Cells // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2024. – T. 323. – C. 124933.
34. Guo X., Tang B., Wu Q., Zhong W., Gong Q., Ling S., Jiao L., Jiang X., Hao E. NIR-Absorbing Tetraphenylethene-Containing bisBODIPY Nanoplatfoms Demonstrate Effective Lysosome-Targeting and Combinational Phototherapy // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2024. – T. 16, № 32. – C. 41916-41926.
35. Bu Y., Zhu X., Wang H., Zhang J., Wang L., Yu Z., Tian Y., Zhou H., Xie Y. Self-monitoring the endo-lysosomal escape and near-infrared-activated mitophagy to guide synergistic type-I photodynamic and photothermal therapy // *Analytical Chemistry*. – 2021. – T. 93, № 35. – C. 12059-12066.
36. Wang S., Liao Y., Wu Z., Peng Y., Liu Y., Chen Y., Shao L., Zeng Z., Liu Y. A lysosomes and mitochondria dual-targeting AIE-active NIR photosensitizer: Constructing amphiphilic structure for enhanced antitumor activity and two-photon imaging // *Materials Today Bio*. – 2023. – T. 21. – C. 100721.
37. Sun Q., Yang J., Wu Q., Shen W., Yang Y., Yin D. Targeting lysosome for enhanced cancer photodynamic/photothermal therapy in a “one stone two birds” pattern // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2023. – T. 16, № 1. – C. 127-141.
38. Figliola C., Anton H., Sutter C., Chériaux C., Sutter A., Mazan V., Elhabiri M., Didier P., Jacquemin D., Ulrich G. Lysosomes Targeting pH Activable Imaging-Guided Photodynamic Agents // *ChemBioChem*. – 2023. – T. 24, № 12. – C. e202300139.
39. Zheng N., Wang Q., Zhang S., Mao C., He L., Liu S. Recent advances in nanotechnology mediated mitochondria-targeted imaging // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2022. – T. 10, № 37. – C. 7450-7459.
40. Wang S., Gai L., Chen Y., Ji X., Lu H., Guo Z. Mitochondria-targeted BODIPY dyes for small molecule recognition, bio-imaging and photodynamic therapy // *Chemical Society Reviews*. – 2024. – T. 53, № 8. – C. 3976-4019.
41. Chen H., Yu Z., Ren S., Qiu Y. Fluorescent probes design strategies for imaging mitochondria and lysosomes // *Frontiers in Pharmacology*. – 2022. – T. 13. – C. 915609.
42. Zielonka J., Joseph J., Sikora A., Hardy M., Ouari O., Vasquez-Vivar J., Cheng G., Lopez M., Kalyanaraman B. Mitochondria-targeted triphenylphosphonium-based compounds: syntheses, mechanisms of action, and therapeutic and diagnostic applications // *Chemical reviews*. – 2017. – T. 117, № 15. – C. 10043-10120.
43. Miao W., Guo X., Yan X., Shang Y., Yu C., Dai E., Jiang T., Hao E., Jiao L. Red-to-Near-Infrared Emitting PyrrolylBODIPY Dyes: Synthesis, Photophysical Properties and Bioimaging Application // *Chemistry—A European Journal*. – 2023. – T. 29, № 14. – C. e202203832.
44. Walter E. R., Lee L. C.-C., Leung P. K.-K., Lo K. K.-W., Long N. J. Mitochondria-targeting biocompatible fluorescent BODIPY probes // *Chemical Science*. – 2024. – T. 15, № 13. – C. 4846-4852.

45. Jana A., Sahoo S., Paul S., Sahoo S., Jayabaskaran C., Chakravarty A. R. Cobalt (III) dibromo-BODIPY-8-hydroxyquinolate for mitochondria-targeted red light photodynamic therapy // *Polyhedron*. – 2023. – T. 245. – C. 116656.
46. Pham T. C., Cho M., Nguyen V.-N., Nguyen V. K. T., Kim G., Lee S., Dehaen W., Yoon J., Lee S. Charge Transfer-Promoted Excited State of a Heavy-Atom-Free Photosensitizer for Efficient Application of Mitochondria-Targeted Fluorescence Imaging and Hypoxia Photodynamic Therapy // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2024. – T. 16, № 17. – C. 21699-21708.
47. Upadhyay A., Nepalia A., Bera A., Saini D. K., Chakravarty A. R. A Platinum (II) Boron-dipyrrromethene Complex for Cellular Imaging and Mitochondria-targeted Photodynamic Therapy in Red Light // *Chemistry–An Asian Journal*. – 2023. – T. 18, № 21. – C. e202300667.
48. Loehrer P. J., EINHORN L. H. Cisplatin // *Annals of internal medicine*. – 1984. – T. 100, № 5. – C. 704-713.
49. Walther T. C., Farese Jr R. V. Lipid droplets and cellular lipid metabolism // *Annual review of biochemistry*. – 2012. – T. 81, № 1. – C. 687-714.
50. Celik C., Lee S. Y. T., Yap W. S., Thibault G. Endoplasmic reticulum stress and lipids in health and diseases // *Progress in Lipid Research*. – 2023. – T. 89. – C. 101198.
51. Hugenholtz M., Bohnert M. Come a little bit closer! Lipid droplet-ER contact sites are getting crowded // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. – 2020. – T. 1867, № 2. – C. 118603.
52. Dalhaimer P. Lipid droplets in disease // *Book Lipid droplets in disease / EditorMDPI*, 2019. – C. 974.
53. Lee D. J., Kim E. S., Lee H. W., Kim H. M. Advances in small molecule two-photon fluorescent trackers for lipid droplets in live sample imaging // *Frontiers in Chemistry*. – 2022. – T. 10. – C. 1072143.
54. Zhao Y., Shi W., Li X., Ma H. Recent advances in fluorescent probes for lipid droplets // *Chemical Communications*. – 2022. – T. 58, № 10. – C. 1495-1509.
55. Zhu J., Tan N. K., Kikuchi K., Kaur A., New E. J. BODIPY-based fluorescent indicators for lipid droplets // *Analysis & Sensing*. – 2024. – T. 4, № 1. – C. e202300049.
56. Wang Z., Guo X., Kang Z., Wu Q., Li H., Cheng C., Yu C., Jiao L., Hao E. Aryl-boron-substituted BODIPYs: direct access via aluminum-chloride-mediated arylation from arylstannanes and tuning the optoelectronic properties // *Organic Letters*. – 2023. – T. 25, № 5. – C. 744-749.
57. Engelhardt P. M., Veronese M., Eryiğit A. A., Das A., Kaczmarek A. T., Rugarli E. I., Schmalz H. G. A pH-Sensitive Double Chromophore Fluorescent Dye for Live-Tracking of Lipophagy // *Chemistry–A European Journal*. – 2024. – T. 30, № 30. – C. e202400808.
58. Schwarz D. S., Blower M. D. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling // *Cellular and molecular life sciences*. – 2016. – T. 73, № 1. – C. 79-94.
59. Terasaki M. Fluorescent labeling of endoplasmic reticulum // *Methods in cell biology*. – 1988. – T. 29. – C. 125-135.

60. Choi P. J., Tatenaka Y., Noguchi K., Ishiyama M., Denny W., Jose J. Bora-Diaza-Indacene Based Fluorescent Probes for Simultaneous Visualisation of Lipid Droplets and Endoplasmic Reticulum // *ChemBioChem.* – 2024. – T. 25, № 13. – C. e202400415.
61. Chauhan N., Koli M., Ghosh R., Majumdar A. G., Ghosh A., Ghanty T. K., Mula S., Patro B. S. A BODIPY-naphtholimine-BF₂ dyad for precision photodynamic therapy, targeting, and dual imaging of endoplasmic reticulum and lipid droplets in cancer // *JACS Au.* – 2024. – T. 4, № 8. – C. 2838-2852.
62. Colombo M., Raposo G., Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles // *Annual review of cell and developmental biology.* – 2014. – T. 30, № 1. – C. 255-289.
63. Frallicciardi J., Gabba M., Poolman B. Determining small-molecule permeation through lipid membranes // *Nature protocols.* – 2022. – T. 17, № 11. – C. 2620-2646.
64. Cheng K. T., Wang P. C., Shan L. Alexa Fluor 680-labeled transferrin-cationic (NBD-labeled DOPE-DOTAP) liposome-encapsulated gadopentetate dimeglumine complex // *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*[Internet]. – 2007.
65. Barrow R., Joffre C., Ménard L., Kermorgant S. Measuring the role for Met endosomal signaling in tumorigenesis // *Methods in enzymology.* – 2014. – T. 535. – C. 121-140.
66. Wang S., Wan C., Squiers G. T., Shen J. Endocytosis assays using cleavable fluorescent dyes // *Membrane Trafficking: Methods and Protocols* Springer, 2022. – C. 181-194.
67. Zhou X., Zhang J., Song Z., Lu S., Yu Y., Tian J., Li X., Guan F. ExoTracker: a low-pH-activatable fluorescent probe for labeling exosomes and monitoring endocytosis and trafficking // *Chemical communications.* – 2020. – T. 56, № 94. – C. 14869-14872.
68. Kirkilessi O., Arapatzi C., Reis H., Kostourou V., Prousis K. C., Calogeropoulou T. A Study on the Structure, Optical Properties and Cellular Localization of Novel 1, 3-Benzothiazole-Substituted BODIPYs // *Colorants.* – 2023. – T. 3, № 1. – C. 17-38.
69. Xu S., Yan K.-C., Xu Z.-H., Wang Y., James T. D. Fluorescent probes for targeting the Golgi apparatus: design strategies and applications // *Chemical Society Reviews.* – 2024. – T. 53, № 14. – C. 7590-7631.
70. Liu J., Huang Y., Li T., Jiang Z., Zeng L., Hu Z. The role of the Golgi apparatus in disease // *International journal of molecular medicine.* – 2021. – T. 47, № 4. – C. 38.
71. Wang X., Li X., Liu Z., Meng Y., Fan X., Wang H., Nie J., Xue B. A golgi targeting viscosity rotor for cancer diagnosis in living cells and tissues // *Talanta.* – 2024. – T. 278. – C. 126497.
72. Peřina M., Börzsei R., Ágoston H., Hlogyik T., Poór M., Rigó R., Özvegy-Laczka C., Batta G., Hetényi C., Vojáćková V. Synthesis and estrogenic activity of BODIPY-labeled estradiol conjugates // *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* – 2024. – T. 199. – C. 106813.
73. Mao W.-J., Wang T.-T., Chen L., Zhang L., Li S. Synthesis and optical properties of tyramine-functionalized boron dipyrromethene dyes for cell bioimaging // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* – 2025. – T. 324. – C. 124980.

74. Mendive-Tapia L., Miret-Casals L., Barth N. D., Wang J., de Bray A., Beltramo M., Robert V., Ampe C., Hodson D. J., Madder A. Acid-Resistant BODIPY Amino Acids for Peptide-Based Fluorescence Imaging of GPR54 Receptors in Pancreatic Islets // *Angewandte Chemie*. – 2023. – T. 135, № 20. – C. e202302688.
75. Bunton-Stasyshyn R. K., Saccon R. A., Fratta P., Fisher E. M. SOD1 function and its implications for amyotrophic lateral sclerosis pathology: new and renascent themes // *The Neuroscientist*. – 2015. – T. 21, № 5. – C. 519-529.
76. Dangoumau A., Verschueren A., Hammouche E., Papon M.-A., Blasco H., Cherpi-Antar C., Pouget J., Corcia P., Andres C. R., Vourc'h P. A novel SOD1 mutation p. V31A identified with a slowly progressive form of amyotrophic lateral sclerosis // *Neurobiology of Aging*. – 2014. – T. 35, № 1. – C. 266. e1-266. e4.
77. Shen B., Jung K. H., Ye S., Hoelzel C. A., Wolstenholme C. H., Huang H., Liu Y., Zhang X. A dual-functional BODIPY-based molecular rotor probe reveals different viscosity of protein aggregates in live cells // *Aggregate*. – 2023. – T. 4, № 3. – C. e301.
78. Zhou Y., Xu Z., Liu Z. Role of IL-33-ST2 pathway in regulating inflammation: current evidence and future perspectives // *Journal of Translational Medicine*. – 2023. – T. 21, № 1. – C. 902.
79. Akimoto M., Takenaga K. Role of the IL-33/ST2L axis in colorectal cancer progression // *Cellular immunology*. – 2019. – T. 343. – C. 103740.
80. Arora H., Javed B., Kutikuppala L. S., Chaurasia M., Khullar K., Kannan S., Golla V. ST2 levels and neurodegenerative diseases: is this a significant relation? // *Annals of Medicine and Surgery*. – 2024. – T. 86, № 5. – C. 2812-2817.
81. Reese A. E., de Moliner F., Mendive-Tapia L., Benson S., Kuru E., Bridge T., Richards J., Rittichier J., Kitamura T., Sachdeva A. Inserting “OFF-to-ON” BODIPY tags into cytokines: a fluorogenic interleukin IL-33 for real-time imaging of immune cells // *ACS central science*. – 2023. – T. 10, № 1. – C. 143-154.
82. Deze O., Laffleur B., Cogné M. Roles of G4-DNA and G4-RNA in class switch recombination and additional regulations in B-lymphocytes // *Molecules*. – 2023. – T. 28, № 3. – C. 1159.
83. Estep K. N., Butler T. J., Ding J., Brosh R. M. G4-interacting DNA helicases and polymerases: potential therapeutic targets // *Current medicinal chemistry*. – 2019. – T. 26, № 16. – C. 2881-2897.
84. Liu G.-F., Chen Y.-S., Wang Z.-L., Gu D., Wang M.-Q. A disaggregation-driven BODIPY-based probe for ratiometric detection of G4 DNA // *Dyes and Pigments*. – 2024. – T. 225. – C. 112107.
85. Lee S. J. C., Nam E., Lee H. J., Savelieff M. G., Lim M. H. Towards an understanding of amyloid- β oligomers: characterization, toxicity mechanisms, and inhibitors // *Chemical Society Reviews*. – 2017. – T. 46, № 2. – C. 310-323.
86. Fu H., Cui M. Fluorescent imaging of Amyloid- β deposits in brain: an overview of probe development and a highlight of the applications for in vivo imaging // *Current Medicinal Chemistry*. – 2018. – T. 25, № 23. – C. 2736-2759.
87. Ma L., Geng Y., Zhang G., Hu Z., James T. D., Wang X., Wang Z. Near-infrared bodipy-based molecular rotors for β -amyloid imaging in vivo // *Advanced Healthcare Materials*. – 2023. – T. 12, № 25. – C. 2300733.

88. Tae Hong K., Bin Park S., Murale D. P., Hoon Lee J., Hwang J., Young Jang W., Lee J. S. Disaggregation-Activated pan-COX Imaging Agents for Human Soft tissue Sarcoma // *Angewandte Chemie*. – 2024. – T. 136, № 24. – C. e202405525.
89. Forman H. J., Zhang H., Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis // *Molecular aspects of medicine*. – 2009. – T. 30, № 1-2. – C. 1-12.
90. Jakubowski H. Homocysteine modification in protein structure/function and human disease // *Physiological reviews*. – 2019. – T. 99, № 1. – C. 555-604.
91. Niu L.-Y., Chen Y.-Z., Zheng H.-R., Wu L.-Z., Tung C.-H., Yang Q.-Z. Design strategies of fluorescent probes for selective detection among biothiols // *Chemical Society Reviews*. – 2015. – T. 44, № 17. – C. 6143-6160.
92. Tang F. K., Chen Y., Nnaemaka Tritton D., Cai Z., Cham-Fai Leung K. A Piperazine Linked Rhodamine-BODIPY FRET-based Fluorescent Sensor for Highly Selective Pd²⁺ and Biothiol Detection // *Chemistry–An Asian Journal*. – 2023. – T. 18, № 16. – C. e202300477.
93. Yang X., Wang J., Zhang Z., Zhang B., Du X., Zhang J., Wang J. BODIPY-based fluorescent probe for cysteine detection and its applications in food analysis, test strips and biological imaging // *Food Chemistry*. – 2023. – T. 416. – C. 135730.
94. Wang M., Li S., Shi J., Liu Y., Cao D., Zhao L. A simple BODIPY-based fluorescent probe for sequential recognition of Cu²⁺ and GSH and its application on test strips and bioimaging in living cells // *Journal of Molecular Structure*. – 2023. – T. 1294. – C. 136393.
95. Tong L., Wang X., Sun C., Lu R., Chen T., Wang J., Chen Z., Tang B. Biocompatibility FeOOH QD@ ATP-BODIPY nanocomposite for glutathione detection and intracellular imaging // *Talanta*. – 2024. – T. 276. – C. 126251.
96. Wan Q.-H., Gu M., Shi W.-J., Tang Y.-X., Lu Y., Xu C., Chen X.-S., Wu X.-T., Gao L., Han D.-X. Meso-aryltellurium-BODIPY-based fluorescence turn-on probe for selective, sensitive and fast glutathione sensing in HepG2 cells // *Talanta*. – 2024. – T. 267. – C. 125251.
97. Zeng Q., Yuwen Z., Zhang L., Li Y., Liu H., Zhang K. Molecular engineering of a doubly quenched fluorescent probe enables ultrasensitive detection of biothiols in highly diluted plasma and high-fidelity imaging of dihydroartemisinin-induced ferroptosis // *Analytical Chemistry*. – 2024. – T. 96, № 32. – C. 13260-13269.
98. Kao H. P., Abney J. R., Verkman A. Determinants of the translational mobility of a small solute in cell cytoplasm // *The Journal of cell biology*. – 1993. – T. 120, № 1. – C. 175-184.
99. Ma C., Sun W., Xu L., Qian Y., Dai J., Zhong G., Hou Y., Liu J., Shen B. A minireview of viscosity-sensitive fluorescent probes: design and biological applications // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2020. – T. 8, № 42. – C. 9642-9651.
100. Miao W., Yu C., Hao E., Jiao L. Functionalized BODIPYs as fluorescent molecular rotors for viscosity detection // *Frontiers in chemistry*. – 2019. – T. 7. – C. 825.
101. Xiao H., Li P., Tang B. Small molecular fluorescent probes for imaging of viscosity in living biosystems // *Chemistry–A European Journal*. – 2021. – T. 27, № 23. – C. 6880-6898.

102. Li K., Wang Y., Li Y., Shi W., Yan J. Development of BODIPY-based fluorescent probes for imaging A β aggregates and lipid droplet viscosity // *Talanta*. – 2024. – T. 277. – C. 126362.
103. Li Y., Wang Y., Li Y., Shi W., Yan J. Construction and evaluation of near-infrared fluorescent probes for imaging lipid droplet and lysosomal viscosity // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2024. – T. 316. – C. 124356.
104. Wan Q.-H., Anwar G., Tang Y.-X., Shi W.-J., Chen X.-S., Xu C., He Z.-Z., Wang Q., Yan J.-w., Han D. Exploration of novel meso-C $\equiv$ N-BODIPY-based AIE fluorescent rotors with large Stokes shifts for organelle-viscosity imaging // *Analytical Chemistry*. – 2024. – T. 96, № 14. – C. 5437-5445.
105. Shi W.-J., Yan X.-H., Yang J., Wei Y.-F., Huo Y.-T., Su C.-L., Yan J.-w., Han D., Niu L. Development of meso-five-membered heterocycle BODIPY-based AIE fluorescent probes for dual-organelle viscosity imaging // *Analytical Chemistry*. – 2023. – T. 95, № 25. – C. 9646-9653.
106. Carter K. P., Young A. M., Palmer A. E. Fluorescent sensors for measuring metal ions in living systems // *Chemical reviews*. – 2014. – T. 114, № 8. – C. 4564-4601.
107. Yang Z., Cao J., He Y., Yang J. H., Kim T., Peng X., Kim J. S. Macro-/micro-environment-sensitive chemosensing and biological imaging // *Chemical Society Reviews*. – 2014. – T. 43, № 13. – C. 4563-4601.
108. Zhang J., Campbell R. E., Ting A. Y., Tsien R. Y. Creating new fluorescent probes for cell biology // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2002. – T. 3, № 12. – C. 906-918.
109. Giepmans B. N., Adams S. R., Ellisman M. H., Tsien R. Y. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function // *science*. – 2006. – T. 312, № 5771. – C. 217-224.
110. Kobayashi H., Ogawa M., Alford R., Choyke P. L., Urano Y. New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging // *Chemical reviews*. – 2010. – T. 110, № 5. – C. 2620-2640.
111. Xi W., Xiao P., Huang H., Hu Y., Huang X. A minireview of fluorescent probes for the dual detection of viscosity and pH: Design and biological applications // *Dyes and Pigments*. – 2024. – T. 231. – C. 112412.
112. Lü R. Reaction-based small-molecule fluorescent probes for dynamic detection of ROS and transient redox changes in living cells and small animals // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2017. – T. 110. – C. 96-108.
113. Nagano T. Development of fluorescent probes for bioimaging applications // *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. – 2010. – T. 86, № 8. – C. 837-847.
114. Grimm J. B., English B. P., Chen J., Slaughter J. P., Zhang Z., Revyakin A., Patel R., Macklin J. J., Normanno D., Singer R. H. A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy // *Nature methods*. – 2015. – T. 12, № 3. – C. 244-250.
115. Sinkeldam R. W., Greco N. J., Tor Y. Fluorescent analogs of biomolecular building blocks: design, properties, and applications // *Chemical reviews*. – 2010. – T. 110, № 5. – C. 2579-2619.

116. Liu Y., Huang Y., Hu R., Tang B. Z. AIE-active BODIPY Derivatives // Handbook of Aggregation-Induced Emission. – 2022. – C. 493-535.
117. Liu Z., Jiang Z., Yan M., Wang X. Recent progress of BODIPY dyes with aggregation-induced emission // Frontiers in Chemistry. – 2019. – T. 7. – C. 712.
118. Chen Y., Lam J. W., Kwok R. T., Liu B., Tang B. Z. Aggregation-induced emission: fundamental understanding and future developments // Materials Horizons. – 2019. – T. 6, № 3. – C. 428-433.
119. Li H., Kim H., Han J., Nguyen V. N., Peng X., Yoon J. Activity-based smart AIEgens for detection, bioimaging, and therapeutics: recent progress and outlook // Aggregate. – 2021. – T. 2, № 4. – C. e51.
120. Yu C., Huang Z., Gu W., Wu Q., Hao E., Xiao Y., Jiao L., Wong W.-Y. A novel family of AIE-active meso-2-ketopyrrolyl BODIPYs: bright solid-state red fluorescence, morphological properties and application as viscosimeters in live cells // Materials Chemistry Frontiers. – 2019. – T. 3, № 9. – C. 1823-1832.
121. Das S., Dey S., Patra S., Bera A., Ghosh T., Prasad B., Sayala K. D., Maji K., Bedi A., Debnath S. BODIPY-based molecules for biomedical applications // Biomolecules. – 2023. – T. 13, № 12. – C. 1723.
122. Che W., Zhang L., Li Y., Zhu D., Xie Z., Li G., Zhang P., Su Z., Dou C., Tang B. Z. Ultrafast and noninvasive long-term bioimaging with highly stable red aggregation-induced emission nanoparticles // Analytical chemistry. – 2019. – T. 91, № 5. – C. 3467-3474.
123. Niu Z.-X., Wang Y.-T., Zhang S.-N., Li Y., Chen X.-B., Wang S.-Q., Liu H.-M. Application and synthesis of thiazole ring in clinically approved drugs // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2023. – T. 250. – C. 115172.
124. Wang L., Qian Y. Modification of a SOCT-ISC type triphenylamine-BODIPY photosensitizer by a multipolar dendrimer design for photodynamic therapy and two-photon fluorescence imaging // Biomaterials Science. – 2023. – T. 11, № 4. – C. 1459-1469.
125. Platt F. M., d'Azzo A., Davidson B. L., Neufeld E. F., Tiffet C. J. Lysosomal storage diseases // Nature reviews Disease primers. – 2018. – T. 4, № 1. – C. 27.
126. Dwivedi B. K., Singh R. S., Ali A., Sharma V., Mobin S. M., Pandey D. S. AIE active piperazine appended naphthalimide-BODIPYs: photophysical properties and applications in live cell lysosomal tracking // Analyst. – 2019. – T. 144, № 1. – C. 331-341.
127. Wang L., Xiao Y., Tian W., Deng L. Activatable rotor for quantifying lysosomal viscosity in living cells // Journal of the American Chemical Society. – 2013. – T. 135, № 8. – C. 2903-2906.
128. Wang H., Wu Y., Shi Y., Tao P., Fan X., Su X., Kuang G. C. BODIPY-Based Fluorescent Thermometer as a Lysosome-Targetable Probe: How the Oligo (ethylene glycols) Compete Photoinduced Electron Transfer // Chemistry–A European Journal. – 2015. – T. 21, № 8. – C. 3219-3223.
129. Zhang J., Yang M., Mazi W., Adhikari K., Fang M., Xie F., Valenzano L., Tiwari A., Luo F.-T., Liu H. Unusual fluorescent responses of morpholine-functionalized

- fluorescent probes to pH via manipulation of BODIPY's HOMO and LUMO energy orbitals for intracellular pH detection // ACS sensors. – 2016. – T. 1, № 2. – C. 158-165.
130. Volkova Y., Brizet B., Harvey P. D., Denat F., Goze C. High Yield SNAr on 8-Halogenophenyl-BODIPY with Cyclic and Acyclic Polyamines // European Journal of Organic Chemistry. – 2014. – T. 2014, № 11. – C. 2268-2274.
131. Volkova Y. A., Brizet B., Harvey P. D., Averin A. D., Goze C., Denat F. BODIPY dyes functionalized with pendant cyclic and acyclic polyamines // European Journal of Organic Chemistry. – 2013. – T. 2013, № 20. – C. 4270-4279.
132. Wu H., Krishnakumar S., Yu J., Liang D., Qi H., Lee Z. W., Deng L. W., Huang D. Highly Selective and Sensitive Near-Infrared-Fluorescent Probes for the Detection of Cellular Hydrogen Sulfide and the Imaging of H₂S in Mice // Chemistry–An Asian Journal. – 2014. – T. 9, № 12. – C. 3604-3611.
133. Lhenry D., Larrouy M., Bernhard C., Goncalves V., Raguin O., Provent P., Moreau M., Collin B., Oudot A., Vrigneaud J. M. BODIPY: A highly versatile platform for the design of bimodal imaging probes // Chemistry–A European Journal. – 2015. – T. 21, № 37. – C. 13091-13099.
134. Bernhard C., Goze C., Rousselin Y., Denat F. First bodipy–DOTA derivatives as probes for bimodal imaging // Chemical communications. – 2010. – T. 46, № 43. – C. 8267-8269.
135. Maindron N., Ipuay M., Bernhard C., Lhenry D., Moreau M., Carme S., Oudot A., Collin B., Vrigneaud J. M., Provent P. Near-Infrared-Emitting BODIPY-trisDOTA111In as a Monomolecular Multifunctional Imaging Probe: From Synthesis to In Vivo Investigations // Chemistry–A European Journal. – 2016. – T. 22, № 36. – C. 12670-12674.
136. Guzow K., Kornowska K., Wiczek W. Synthesis and photophysical properties of a new amino acid possessing a BODIPY moiety // Tetrahedron Letters. – 2009. – T. 50, № 24. – C. 2908-2910.
137. Telfer S. G., McLean T. M., Waterland M. R. Exciton coupling in coordination compounds // Dalton Transactions. – 2011. – T. 40, № 13. – C. 3097-3108.
138. De Silva A. P., Gunaratne H. N., Gunnlaugsson T., Huxley A. J., McCoy C. P., Rademacher J. T., Rice T. E. Signaling recognition events with fluorescent sensors and switches // Chemical reviews. – 1997. – T. 97, № 5. – C. 1515-1566.
139. Würthner F. Aggregation-induced emission (AIE): a historical perspective // Angewandte Chemie International Edition. – 2020. – T. 59, № 34. – C. 14192-14196.
140. Ciampolini M., Micheloni M., Nardi N., Paoletti P., Dapporto P., Zanolini F. Synthesis and characterisation of 1, 7-dimethyl-1, 4, 7, 10-tetra-azacyclododecane: crystal structure of the nickel (II) bromide monohydrate complex of this macrocycle; thermodynamic studies of protonation and metal complex formation // Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions. – 1984. № 7. – C. 1357-1362.
141. Bencini A., Bianchi A., Garcia-Espana E., Micheloni M., Ramirez J. A. Proton coordination by polyamine compounds in aqueous solution // Coordination chemistry reviews. – 1999. – T. 188, № 1. – C. 97-156.
142. Bartoli F., Conti L., Romano G. M., Massai L., Paoli P., Rossi P., Pietraperzia G., Gellini C., Bencini A. Protonation of cyclen-based chelating agents containing

- fluorescent moieties // *New Journal of Chemistry*. – 2021. – T. 45, № 36. – C. 16926-16938.
143. Shiraishi Y., Kohno Y., Hirai T. Bis-azamacrocyclic anthracene as a fluorescent chemosensor for cations in aqueous solution // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2005. – T. 109, № 41. – C. 19139-19147.
 144. Lima L. M., Esteban-Gomez D., Delgado R., Platas-Iglesias C., Tripier R. Monopicolinate cyclen and cyclam derivatives for stable copper (II) complexation // *Inorganic chemistry*. – 2012. – T. 51, № 12. – C. 6916-6927.
 145. Uvarov D. Y., Gorbатов S. A., Kolokolova M. K., Kozlov M. A., Kolotirkina 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. – T. 7, № 6. – C. e202104210.
 146. Cotruvo Jr J. A., Aron A. T., Ramos-Torres K. M., Chang C. J. Synthetic fluorescent probes for studying copper in biological systems // *Chemical Society Reviews*. – 2015. – T. 44, № 13. – C. 4400-4414.
 147. Barral D. C., Staiano L., Guimas Almeida C., Cutler D. F., Eden E. R., Futter C. E., Galione A., Marques A. R., Medina D. L., Napolitano G. Current methods to analyze lysosome morphology, positioning, motility and function // *Traffic*. – 2022. – T. 23, № 5. – C. 238-269.
 148. Pierzyńska-Mach A., Janowski P. A., Dobrucki J. W. Evaluation of acridine orange, LysoTracker Red, and quinacrine as fluorescent probes for long-term tracking of acidic vesicles // *Cytometry Part A*. – 2014. – T. 85, № 8. – C. 729-737.
 149. Xue S.-S., Li Y., Pan W., Li N., Tang B. Multi-stimuli-responsive molecular fluorescent probes for bioapplications // *Chemical Communications*. – 2023. – T. 59, № 21. – C. 3040-3049.
 150. Yang R., Zhu T., Xu J., Zhao Y., Kuang Y., Sun M., Chen Y., He W., Wang Z., Jiang T. Organic fluorescent probes for monitoring micro-environments in living cells and tissues // *Molecules*. – 2023. – T. 28, № 8. – C. 3455.
 151. Giuffrida M. L., Trusso Sfrassetto G., Satriano C., Zimbone S., Tomaselli G. A., Copani A., Rizzarelli E. A new ratiometric lysosomal copper (II) fluorescent probe to map a dynamic metallome in live cells // *Inorganic Chemistry*. – 2018. – T. 57, № 5. – C. 2365-2368.
 152. Kruglov A. G., Romshin A. M., Nikiforova A. B., Plotnikova A., Vlasov I. I. Warm cells, hot mitochondria: achievements and problems of ultralocal thermometry // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – T. 24, № 23. – C. 16955.
 153. Olesiejuk M., Kudelko A., Świątkowski M. Alternative and one-pot synthesis of new conjugated 5-aryl-1, 3, 4-thiadiazole azo dyes // *Dyes and Pigments*. – 2023. – T. 220. – C. 111721.
 154. Tao Y., Xu Q., Lu J., Yang X. The synthesis, electrochemical and fluorescent properties of monomers and polymers containing 2, 5-diphenyl-1, 3, 4-thiadiazole // *Dyes and Pigments*. – 2010. – T. 84, № 2. – C. 153-158.
 155. Kudelko A., Olesiejuk M., Luczynski M., Swiatkowski M., Sieranski T., Kruszynski R. 1, 3, 4-Thiadiazole-Containing azo dyes: synthesis, spectroscopic properties and molecular structure // *Molecules*. – 2020. – T. 25, № 12. – C. 2822.

156. Ceugniet F., Hualmé Q., Sutter A., Jacquemin D., Leclerc N., Ulrich G. Hetero-Substituted $\alpha\beta$ -Fused BODIPY // *Chemistry–A European Journal*. – 2022. – T. 28, № 25. – C. e202200130.
157. Jean-Gérard L., Vasseur W., Scherninski F., Andrioletti B. Recent advances in the synthesis of [a]-benzo-fused BODIPY fluorophores // *Chemical Communications*. – 2018. – T. 54, № 92. – C. 12914-12929.
158. Khan T. K., Bröring M., Mathur S., Ravikanth M. Boron dipyrroin-porphyrin conjugates // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2013. – T. 257, № 15-16. – C. 2348-2387.
159. Li Y., Jiang M., Yan M., Ye J., Li Y., Dehaen W., Yin S. Near-infrared boron–dipyrroin (BODIPY) nanomaterials: Molecular design and anti-tumor therapeutics // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2024. – T. 506. – C. 215718.
160. Grover V., Ravikanth M. Synthesis of Novel Fluorescent 3-Pyrrolyl BODIPYs and Their Derivatives // *Tetrahedron Chem*. – 2025. – C. 100121.
161. Cao N., Jiang Y., Song Z.-B., Chen D., Wu D., Chen Z.-L., Yan Y.-J. Synthesis and evaluation of novel meso-substituted phenyl dithieno [3, 2-b] thiophene-fused BODIPY derivatives as efficient photosensitizers for photodynamic therapy // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2024. – T. 264. – C. 116012.
162. Leite A., Queirós C., Silva A. M. Advances in Pyridyl-Based Fluorophores for Sensing Applications // *Exploring Chemistry with Pyridine Derivatives* IntechOpen, 2022.
163. Gonçalves R. C., Pina J., Costa S. P., Raposo M. M. M. Synthesis and characterization of aryl-substituted BODIPY dyes displaying distinct solvatochromic singlet oxygen photosensitization efficiencies // *Dyes and Pigments*. – 2021. – T. 196. – C. 109784.
164. Komkov A., Kozlov M., Zavarzin I., Volkova Y. Flexible synthesis of phosphorus (V)-substituted 1, 3, 4-thiadiazoles and pyridazines // *Tetrahedron*. – 2024. – T. 154. – C. 133877.
165. Kozlov M., Tyurin A., Dmitrenok A., Rusak V., Fedorov A., Zavarzin I., Volkova Y. Simple approach towards phosphorus-substituted spiro 1, 3, 4-thiadiazolines // *Tetrahedron*. – 2024. – T. 150. – C. 133746.
166. Kozlov M., Komkov A., Losev T., Tyurin A., Dmitrenok A., Zavarzin I., Volkova Y. Flexible synthesis of phosphoryl-substituted imidazolines, tetrahydropyrimidines, and thioamides by sulfur-mediated processes // *The Journal of Organic Chemistry*. – 2019. – T. 84, № 18. – C. 11533-11541.
167. Kozlov M., Kozlov A., Komkov A., Lyssenko K., Zavarzin I., Volkova Y. Synthesis of Phosphoryl Thioamides via Three-Component Reaction of Phosphinic Chlorides with Amines and Sulfur // *Advanced Synthesis & Catalysis*. – 2019. – T. 361, № 12. – C. 2904-2915.
168. Ömeroğlu İ., Köksoy B., Öztürk D., Salah L., Maksheed S., Durmuş M. Photophysicochemical and electrochemical properties of pyrene–BODIPY platforms // *New Journal of Chemistry*. – 2024. – T. 48, № 26. – C. 11638-11646.

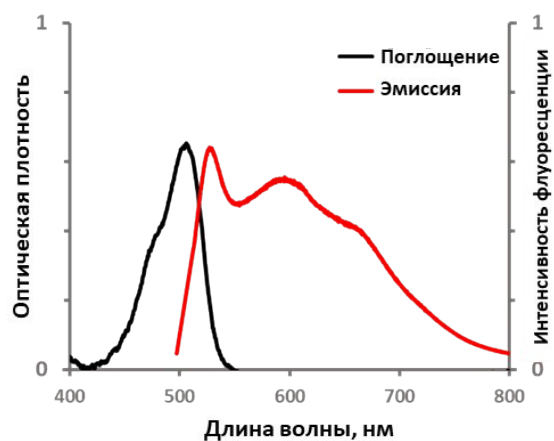
169. Mataga N., Kaifu Y., Koizumi M. Solvent effects upon fluorescence spectra and the dipolemoments of excited molecules // *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. – 1956. – T. 29, № 4. – C. 465-470.
170. Kamlet M. J., Abboud J. L. M., Abraham M. H., Taft R. Linear solvation energy relationships. 23. A comprehensive collection of the solvatochromic parameters, π^* , α , and β , and some methods for simplifying the generalized solvatochromic equation // *The Journal of Organic Chemistry*. – 1983. – T. 48, № 17. – C. 2877-2887.
171. Catalán J. Toward a generalized treatment of the solvent effect based on four empirical scales: dipolarity (SdP, a new scale), polarizability (SP), acidity (SA), and basicity (SB) of the medium // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2009. – T. 113, № 17. – C. 5951-5960.
172. Cieřlik-Boczula K., Burgess K., Li L., Nguyen B., Pandey L., De Borggraeve W. M., Van der Auweraer M., Boens N. Photophysics and stability of cyano-substituted boradiazaindacene dyes // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2009. – T. 8, № 7. – C. 1006-1015.
173. Principles of fluorescence spectroscopy. / Lakowicz J. R.: Springer, 2006.
174. Elias J. S., Costentin C., Nocera D. G. Direct electrochemical P (V) to P (III) reduction of phosphine oxide facilitated by triaryl borates // *Journal of the American Chemical Society*. – 2018. – T. 140, № 42. – C. 13711-13718.
175. Ksenofontov A. A., Antina E. V. One-Click solvatochromism Analysis: The SolvatoChrom web tool // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2025. – C. 126455.
176. Doose S., Neuweiler H., Sauer M. Fluorescence quenching by photoinduced electron transfer: a reporter for conformational dynamics of macromolecules // *ChemPhysChem*. – 2009. – T. 10, № 9-10. – C. 1389-1398.
177. Maguire J. L., Mennerick S. Neurosteroids: mechanistic considerations and clinical prospects // *Neuropsychopharmacology*. – 2024. – T. 49, № 1. – C. 73-82.
178. Akk G., Covey D. F., Evers A. S., Steinbach J. H., Zorumski C. F., Mennerick S. Mechanisms of neurosteroid interactions with GABAA receptors // *Pharmacology & therapeutics*. – 2007. – T. 116, № 1. – C. 35-57.
179. Zorumski C. F., Paul S. M., Covey D. F., Mennerick S. Neurosteroids as novel antidepressants and anxiolytics: GABA-A receptors and beyond // *Neurobiology of stress*. – 2019. – T. 11. – C. 100196.
180. Akk G., Covey D. F., Evers A. S., Steinbach J. H., Zorumski C. F., Mennerick S. The influence of the membrane on neurosteroid actions at GABAA receptors // *Psychoneuroendocrinology*. – 2009. – T. 34. – C. S59-S66.
181. Shu H.-J., Eisenman L. N., Wang C., Bandyopadhyaya A. K., Krishnan K., Taylor A., Benz A. M., Manion B., Evers A. S., Covey D. F. Photodynamic effects of steroid-conjugated fluorophores on GABAA receptors // *Molecular pharmacology*. – 2009. – T. 76, № 4. – C. 754-765.
182. Akk G., Shu H.-J., Wang C., Steinbach J. H., Zorumski C. F., Covey D. F., Mennerick S. Neurosteroid access to the GABAA receptor // *Journal of Neuroscience*. – 2005. – T. 25, № 50. – C. 11605-11613.

183. Shu H. J., Zeng C. M., Wang C., Covey D., Zorumski C., Mennerick S. Cyclodextrins sequester neuroactive steroids and differentiate mechanisms that rate limit steroid actions // *British journal of pharmacology*. – 2007. – T. 150, № 2. – C. 164-175.
184. Chisari M., Eisenman L. N., Krishnan K., Bandyopadhyaya A. K., Wang C., Taylor A., Benz A., Covey D. F., Zorumski C. F., Mennerick S. The influence of neuroactive steroid lipophilicity on GABAA receptor modulation: evidence for a low-affinity interaction // *Journal of neurophysiology*. – 2009. – T. 102, № 2. – C. 1254-1264.
185. Mennerick S., Lamberta M., Shu H.-J., Hogins J., Wang C., Covey D. F., Eisenman L. N., Zorumski C. F. Effects on membrane capacitance of steroids with antagonist properties at GABAA receptors // *Biophysical journal*. – 2008. – T. 95, № 1. – C. 176-185.
186. Dussart-Gautheret J., Deschamp J., Monteil M., Gager O., Legigan T., Migianu-Griffoni E., Lecouvey M. Formation of 1-hydroxymethylene-1, 1-bisphosphinates through the addition of a silylated phosphonite on various trivalent derivatives // *The Journal of Organic Chemistry*. – 2020. – T. 85, № 22. – C. 14559-14569.
187. Terai T., Nagano T. Fluorescent probes for bioimaging applications // *Current opinion in chemical biology*. – 2008. – T. 12, № 5. – C. 515-521.
188. Mortensen M., Bright D. P., Fagotti J., Dorovych V., Cerna B., Smart T. G. Forty years searching for neurosteroid binding sites on GABAA receptors // *Neuroscience*. – 2025. – T. 578. – C. 6-24.
189. Hosie A. M., Wilkins M. E., Smart T. G. Neurosteroid binding sites on GABAA receptors // *Pharmacology & therapeutics*. – 2007. – T. 116, № 1. – C. 7-19.
190. Gunn B., Baram T. Stress and seizures: space, time and hippocampal circuits // *Trends in neurosciences*. – 2017. – T. 40, № 11. – C. 667-679.
191. Hojo Y., Kawato S. Neurosteroids in adult hippocampus of male and female rodents: biosynthesis and actions of sex steroids. *Front Endocrinol* 9: 183 // *Book Neurosteroids in adult hippocampus of male and female rodents: biosynthesis and actions of sex steroids. Front Endocrinol* 9: 183 / Editor, 2018.
192. Haraguchi S., Tsutsui K. Pineal neurosteroids: biosynthesis and physiological functions // *Frontiers in Endocrinology*. – 2020. – T. 11. – C. 549.
193. Nimmerjahn A., Kirchhoff F., Kerr J. N., Helmchen F. Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo // *Nature methods*. – 2004. – T. 1, № 1. – C. 31-37.
194. Ozdemir T., Bila J. L., Sozmen F., Yildirim L. T., Akkaya E. U. Orthogonal bodipy trimers as photosensitizers for photodynamic action // *Organic letters*. – 2016. – T. 18, № 19. – C. 4821-4823.
195. Komendantova A. S., Scherbakov A. M., Komkov A. V., Chertkova V. V., Gudovanniy A. O., Chernoburova E. I., Sorokin D. V., Dzichenka Y. U., Shirinian V. Z., Volkova Y. A. Novel steroidal 1, 3, 4-thiadiazines: Synthesis and biological evaluation in androgen receptor-positive prostate cancer 22Rv1 cells // *Bioorganic Chemistry*. – 2019. – T. 91. – C. 103142.
196. Kondo M., Furukawa S., Hirai K., Kitagawa S. Coordinatively immobilized monolayers on porous coordination polymer crystals // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2010. – T. 49, № 31. – C. 5327-5330.

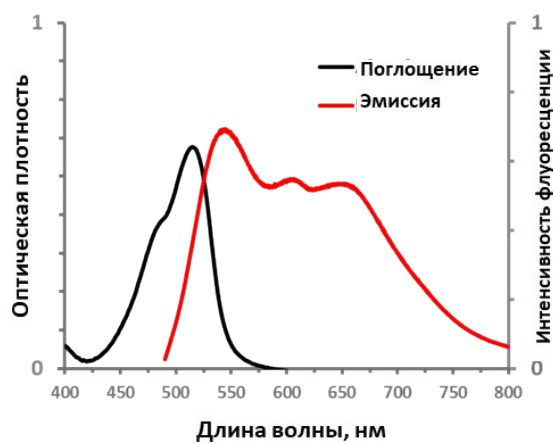
197. Zou L., Braegelman A. S., Webber M. J. Spatially defined drug targeting by in situ host–guest chemistry in a living animal // *ACS Central Science*. – 2019. – T. 5, № 6. – C. 1035-1043.
198. Hamilton N. M., Dawson M., Fairweather E. E., Hamilton N. S., Hitchin J. R., James D. I., Jones S. D., Jordan A. M., Lyons A. J., Small H. F. Novel steroid inhibitors of glucose 6-phosphate dehydrogenase // *Journal of medicinal chemistry*. – 2012. – T. 55, № 9. – C. 4431-4445.
199. Li Z., Li L.-J., Sun T., Liu L., Xie Z. Benzimidazole-BODIPY as optical and fluorometric pH sensor // *Dyes and Pigments*. – 2016. – T. 128. – C. 165-169.
200. Magde D., Wong R., Seybold P. G. Fluorescence quantum yields and their relation to lifetimes of rhodamine 6G and fluorescein in nine solvents: Improved absolute standards for quantum yields¶ // *Photochemistry and photobiology*. – 2002. – T. 75, № 4. – C. 327-334.
201. Wong K.-L., Bünzli J.-C. G., Tanner P. A. Quantum yield and brightness // *Journal of Luminescence*. – 2020. – T. 224. – C. 117256.
202. Kharlamova A. D., Ermakova E. V., Abel A. S., Gontcharenko V. E., Cheprakov A. V., Averin A. D., Beletskaya I. P., Andraud C., Bretonnière Y., Bessmertnykh-Lemeune A. Quinoxaline-based azamacrocycles: synthesis, AIE behavior and acidochromism // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2024. – T. 22, № 25. – C. 5181-5192.

ПРИЛОЖЕНИЕ

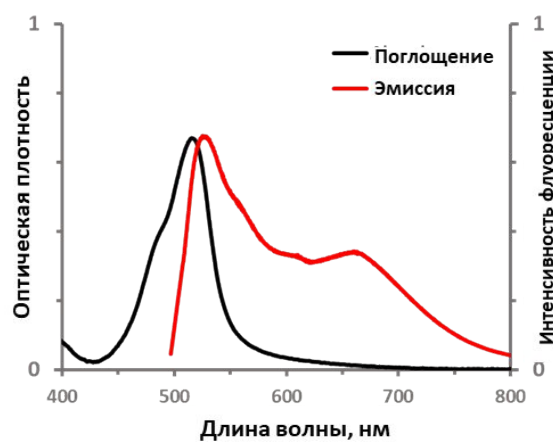
Приложение 1



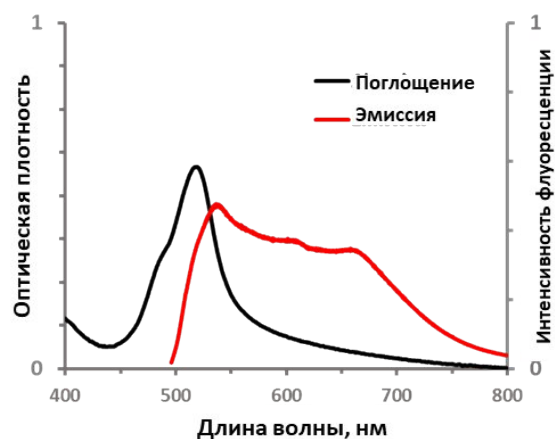
(A) УФ-видимые спектры поглощения и флуоресценции соединения **5b** в тонких пленках.



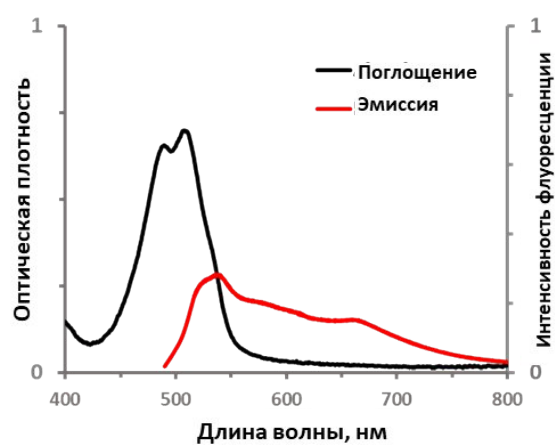
(B) УФ-видимые спектры поглощения и флуоресценции соединения **6** в тонких пленках.



(C) УФ-видимые спектры поглощения и флуоресценции соединения **8b** в тонких пленках.

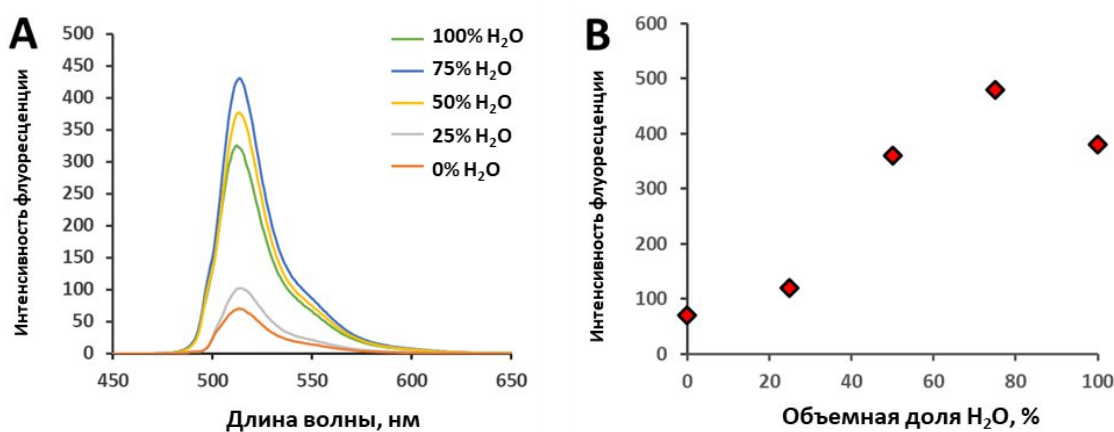


(D) УФ-видимые спектры поглощения и флуоресценции соединения **8с** в тонких пленках.



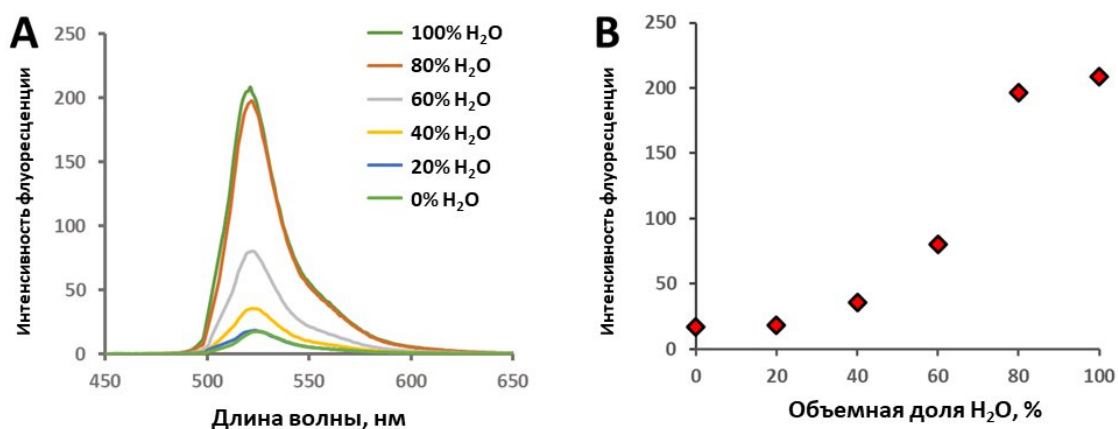
(E) УФ-видимые спектры поглощения и флуоресценции соединения **9** в тонких пленках.

Приложение 2.



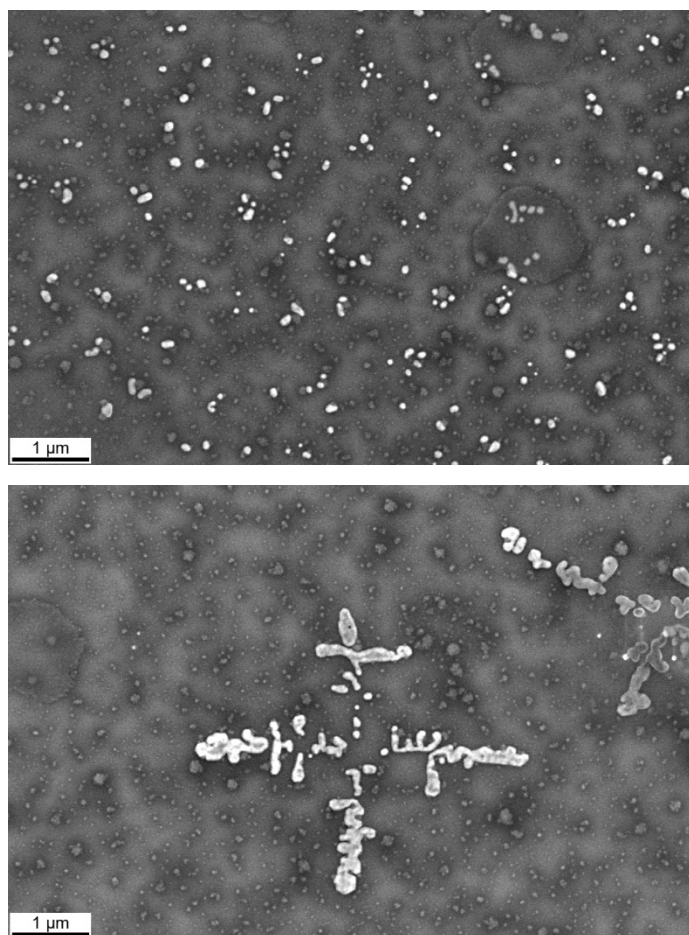
(A) Флуоресцентный профиль соединения **5a** (0.7 мкМ, MeCN) при различном содержании воды. (B) Интенсивность флуоресценции соединения **5a** (0.7 мкМ) при длине волны 516 нм в зависимости от объемной доли воды (%) в MeCN.

Приложение 3.



(А) Флуоресцентный профиль соединения **8a** (0.55 μM , MeCN) при различном содержании воды. (В) Интенсивность флуоресценции соединения **8a** (0.55 μM) при длине волны 520 нм в зависимости от объемной доли воды (%) в MeCN.

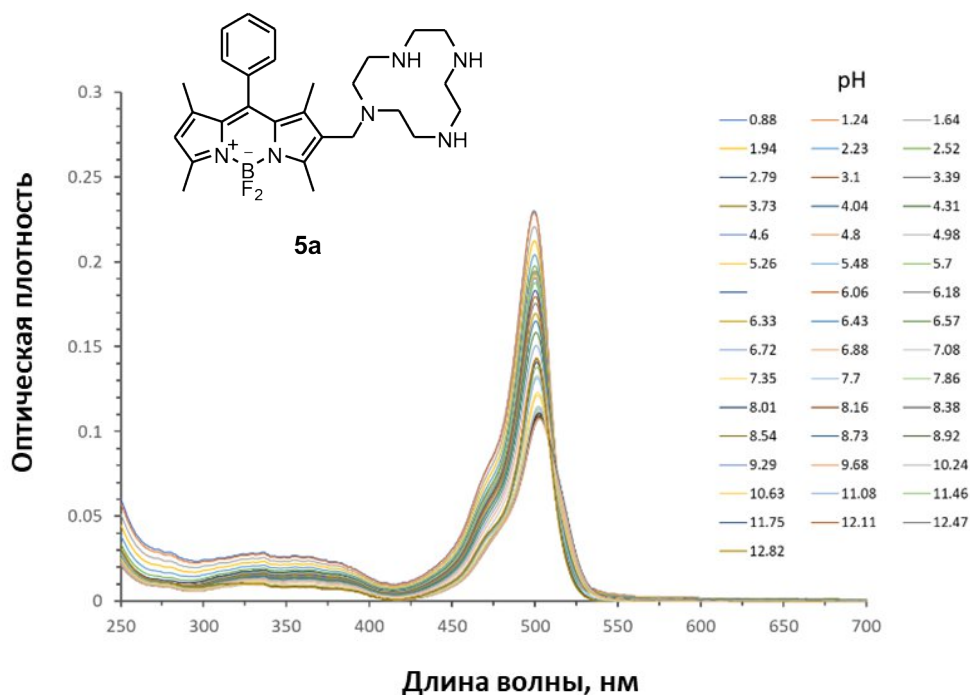
Приложение 4.



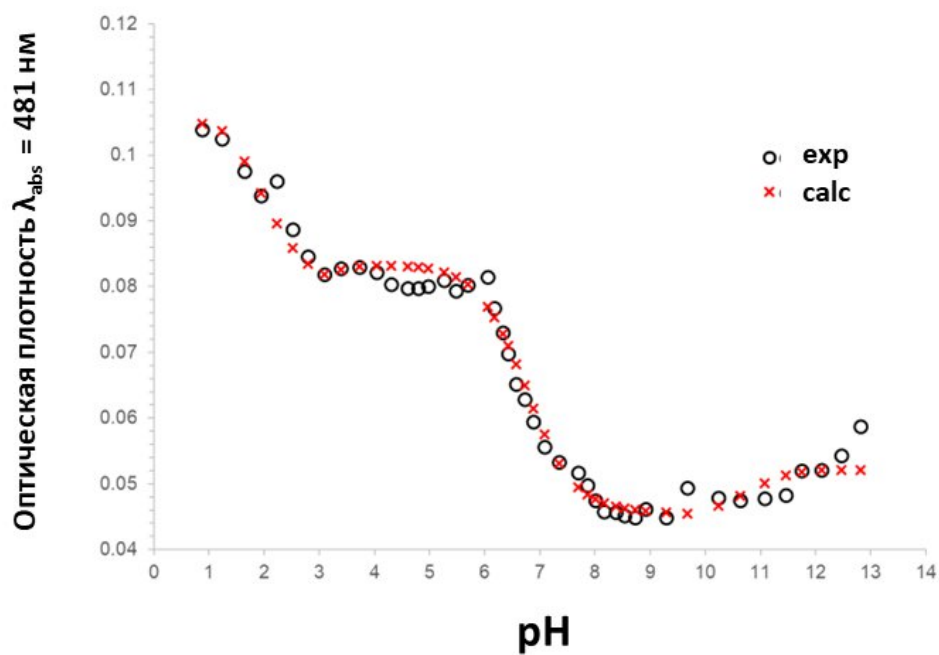
СЭМ-изображения красителя **8a** на поверхности кремния (Si).

Приложение 5.

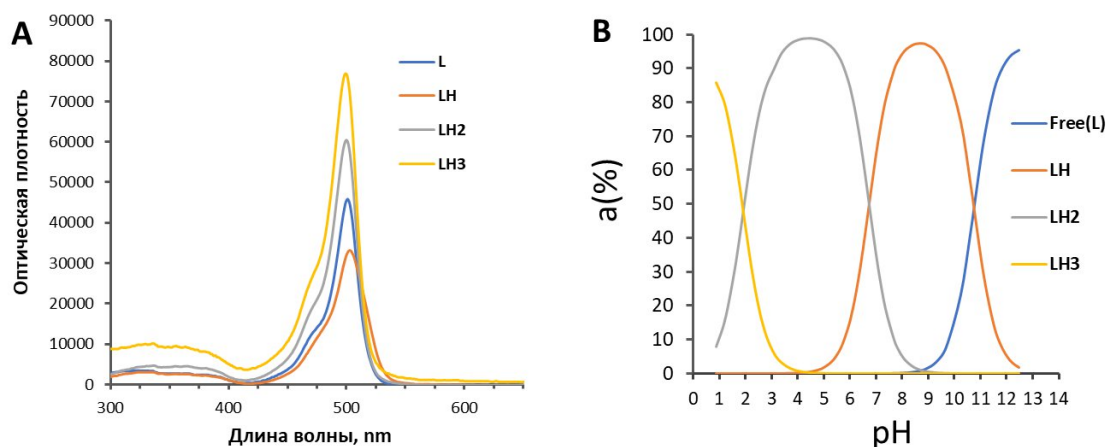
Титрование	$pK_{a1} (\sigma)$	$pK_{a2} (\sigma)$	$pK_{a3} (\sigma)$
УФ	10.7447 (0.0252)	6.7337 (0.0250)	1.9157 (0.0301)
Флуоресцентное	10.5687 (0.0058)	6.8103 (0.0058)	3.1895 (0.0106)-



Спектрофотометрическое титрование соединения **5a** ($[5a] = 3.45 \text{ мкМ}$, $I = 0.1 \text{ М NaClO}_4$, $pH = 0.88\text{--}12.82$).

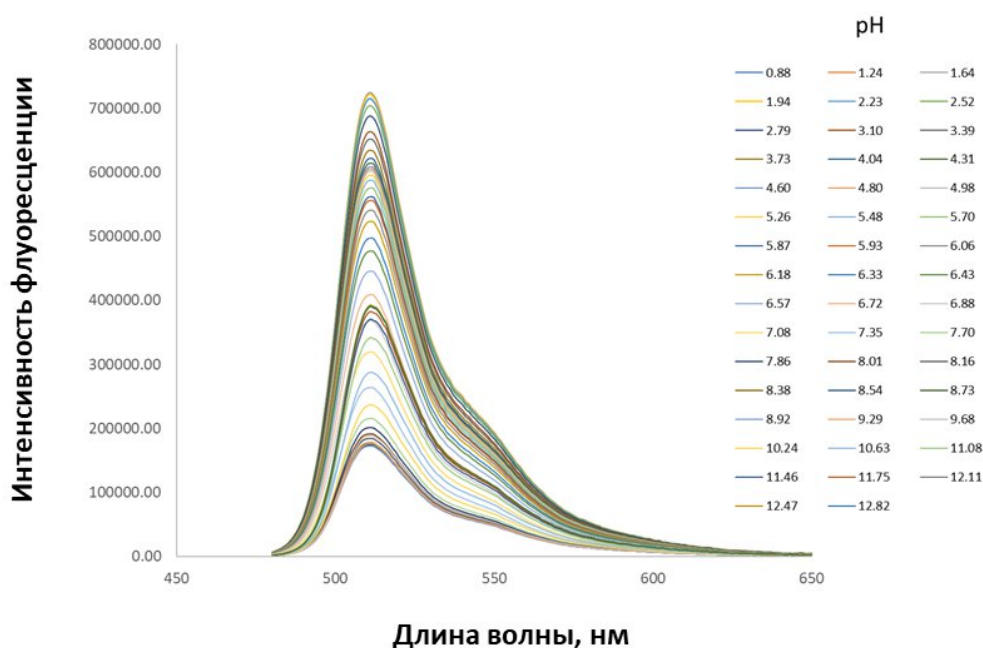


Изменение оптической плотности в зависимости от pH при $\lambda = 481 \text{ nm}$ для соединения **5a**.

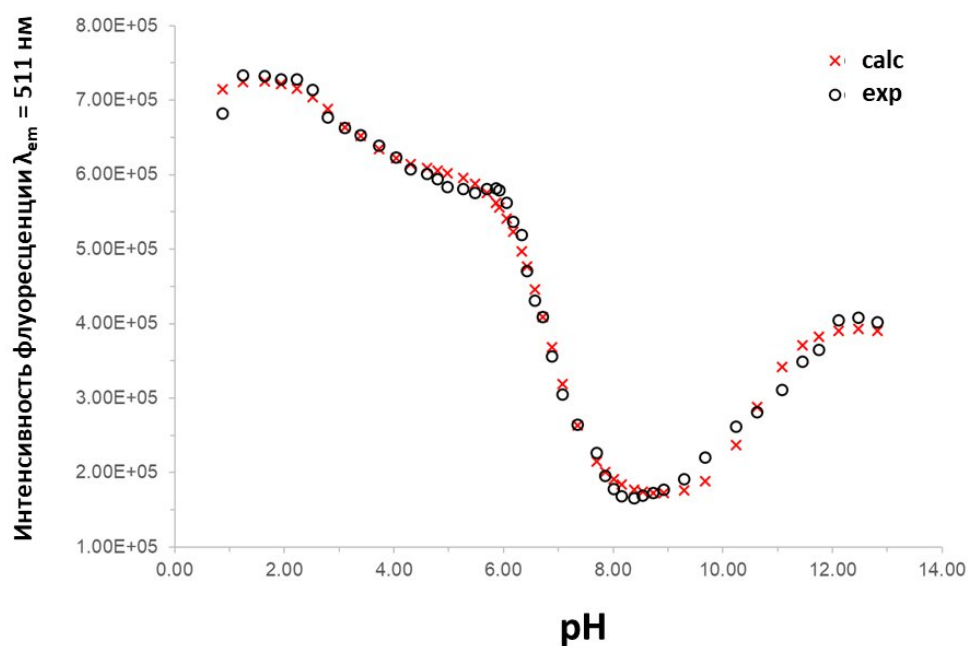


(A) Рассчитанные с использованием программы НурСпес спектры поглощения в УФ-видимой области для частиц $[5a]$, $[5aH]^+$, $[5aH_2]^{2+}$ and $[5aH_3]^{3+}$ в воде.

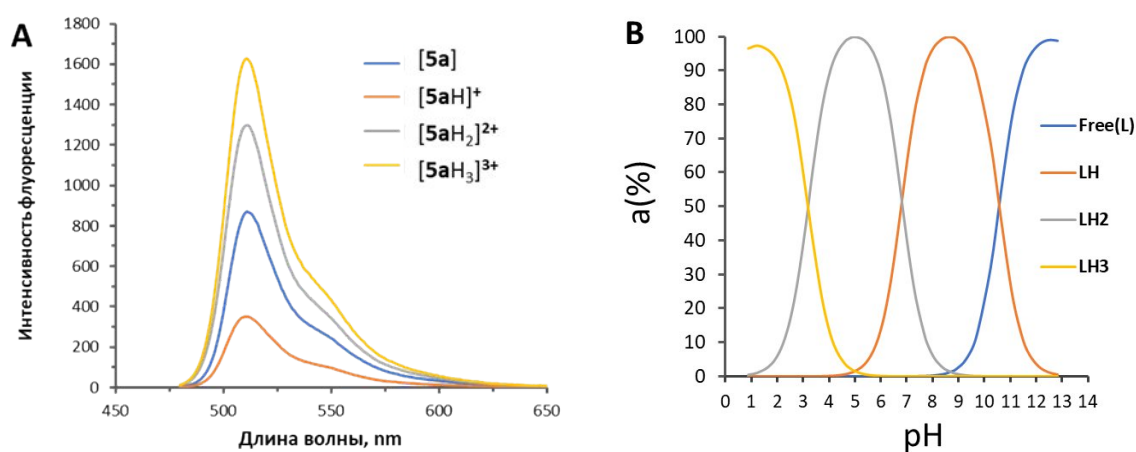
(B) Диаграмма распределения частиц системы $[5a] \rightleftharpoons [5aH]^+ \rightleftharpoons [5aH_2]^{2+} \rightleftharpoons [5aH_3]^{3+}$ в воде, рассчитанная с использованием программы НурСпес.



Флуориметрическое титрование соединения **5a** в зависимости от pH ($[5a] = 3.45 \mu M$, $I = 0.1 M$ $NaClO_4$, $\lambda_{ex} = 475 nm$, pH = 0.88 – 12.82).

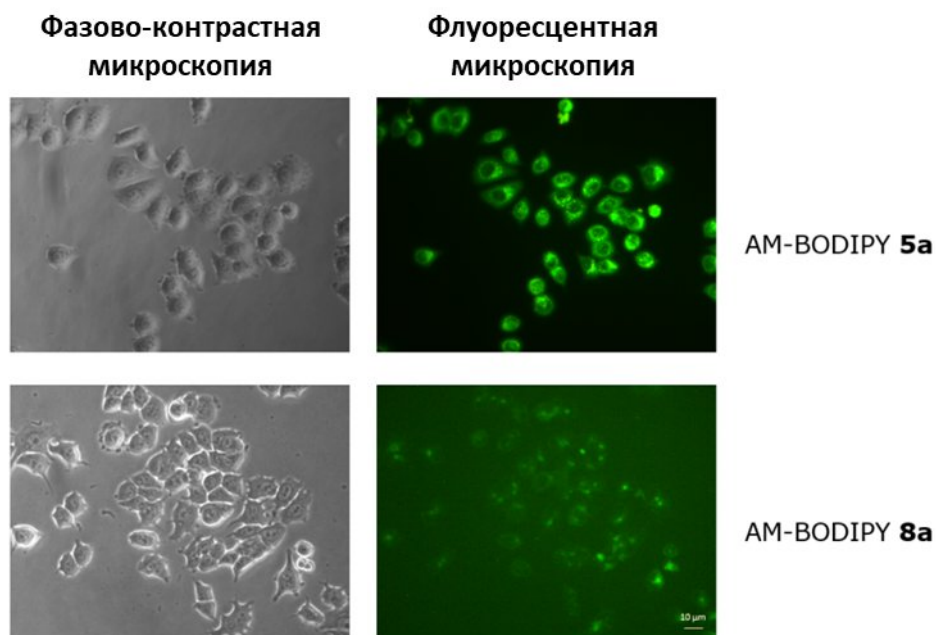


Изменение интенсивности испускания в зависимости от pH при $\lambda = 511$ нм для соединения **5a**.



(A) Спектры испускания частиц **5a**, $[5aH]^+$, $[5aH_2]^{2+}$ и $[5aH_3]^{3+}$ в воде, рассчитанные с использованием программы HupSpec. (B) Диаграмма распределения частиц системы $[5a] \rightleftharpoons [5aH]^+ \rightleftharpoons [5aH_2]^{2+} \rightleftharpoons [5aH_3]^{3+}$ в воде, рассчитанная с использованием программы HupSpec.

Приложение 6.

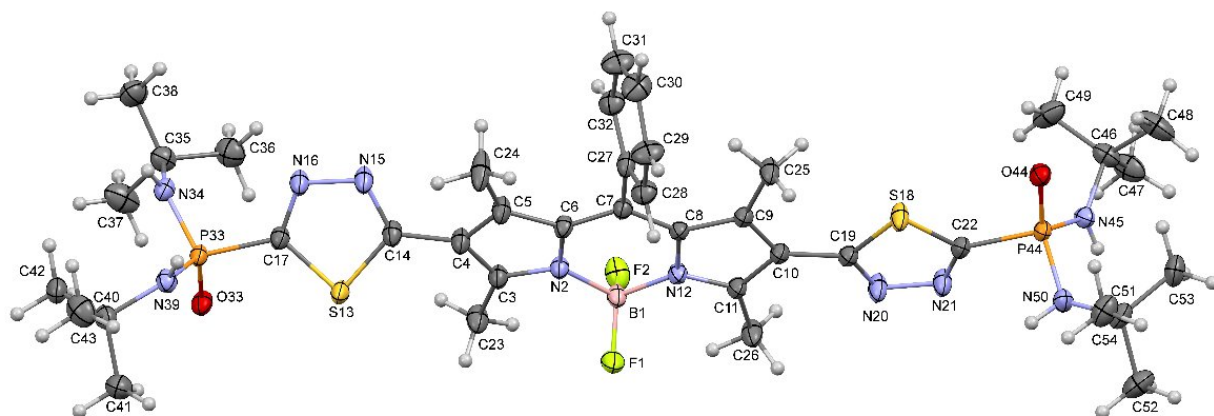


Микрофотографии инкубированных соединениями AM-BODIPY клеток MCF7, полученные с помощью флуоресцентной и фазово-контрастной микроскопии. Клетки инкубировали с соединениями **5a** (7,5 мкМ) и **8a** (30 мкМ) при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 4 часов. Для получения изображений использовали микроскоп Carl Zeiss Axiovert 200 с объективом Plan-Neofluar 40x, набором фильтров 09 (EX BP 450-490, BS FT 510, EM LP 515) и камерой AxioCam MRc.

Приложение 7.

Таблица данных рентгеноструктурного анализа и параметров уточняющих структур.

Характеристики	Структура 12b
CCDC	2446743
Брутто-формула	C47 H59 B Cl2 F2 N12 O4 P2 S2
Молекул. Вес	1101.83
Температура	100.00(10) K
Сингония	Triclinic
Пространственная группа	P-1
<i>Z</i>	2
<i>a</i> , Å	15.30926(13)
<i>b</i> , Å	15.86213(10)
<i>c</i> , Å	16.43388(13)
<i>a</i> , °	69.0631(7)
<i>b</i> , °	78.1859(7)
<i>g</i> , °	71.2137(7)
<i>V</i> , Å ³	3510.52(5)
<i>D</i> _{calc} , (g/cm ³)	1.042
Коэффициент поглощения (мм ⁻¹)	2.209
<i>F</i> (000)	1152
2θ _{max} , °	
Зарегистрированные отражения	110783
Независимые отражения	15256
Наблюдаемые отражения [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	14605
Параметры	705
<i>R</i> ₁	0.0350
<i>wR</i> ₂	0.0978
GOF	1.028
Δρ _{max} /Δρ _{min} (e Å ⁻³)	0.446/ - 0.378



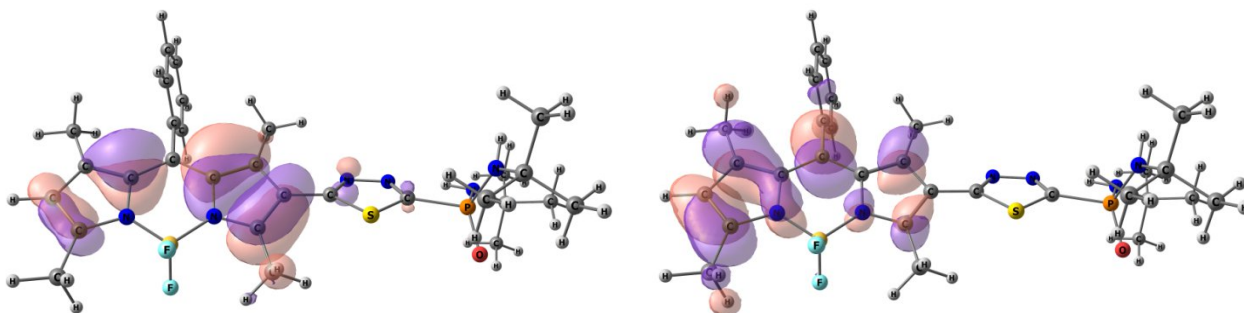
Рентгеноструктурный анализ (PCA) комплекса BODIPY **12b** с 4,5-дихлор-3,6-дигидроксифталонитрилом. Атомы представлены 50%-ными тепловыми эллипсоидами.

Приложение 8.

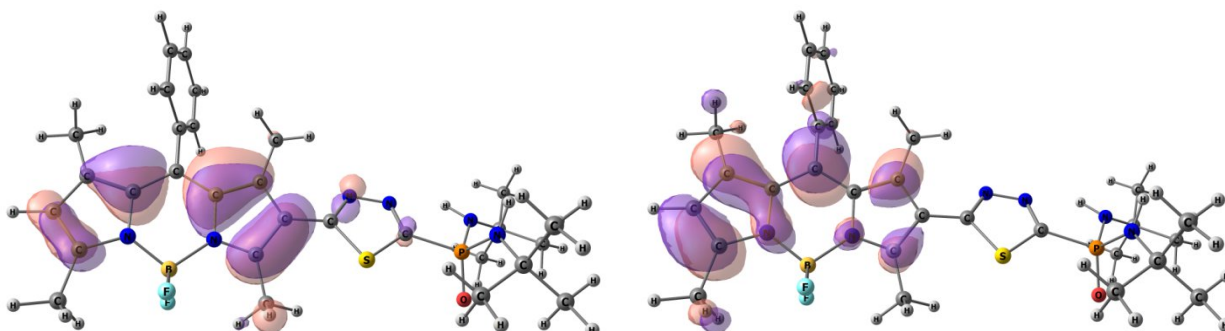
Таблица анализа взаимосвязи между спектральными характеристиками соединений **11** и **12** с моделями Липперта – Матаги, Кэмлета – Тафта и Каталана.

Красите ль	$\lambda_{abs}^{max}, \text{нм}$			$\lambda_{em}^{max}, \text{нм}$			Стоксов сдвиг $[\text{см}^{-1}]$	$\Phi_{em} [\%]$	
	SP	nD	Δf	SP	nD	Δf	$E_t(30)$	$E_t(30)$	SB
11a	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	49.7756 SP +	58.3084 nD +	82.3920 Δf +	40.8098 SP +	48.5796 nD +	66.8399 Δf +	3.4198ET(3 0) +	0.3226ET(30) +	14.4784 SB +
	473.124 3, $R^2 =$ 0.983	426.683 1, $R^2 =$ 0.999	529.5223 , $R^2 =$ 0.960	498.586 4, $R^2 =$ 0.946	459.417 7, $R^2 =$ 0.993	544.648 5, $R^2 =$ 0.905	572.8635, $R^2 = 0.407$	68.7568, $R^2 = 0.428$	79.0766, $R^2 =$ 0.485
11b	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	47.0941 SP +	55.6193 nD +	78.4184 Δf +	40.9227 SP +	47.1909 nD +	67.2930 Δf +	2.5265ET(3 0) +	0.2409ET(30) +	9.9809S B +
	474.306 9, $R^2 =$ 0.964	429.729 4, $R^2 =$ 0.996	527.7825 , $R^2 =$ 0.953	499.254 9, $R^2 =$ 0.995	462.128 2, $R^2 =$ 0.980	545.511 4, $R^2 =$ 0.960	650.2489, $R^2 = 0.108$	96.8236, $R^2 = 0.393$	88.8770, $R^2 =$ 0.379
11c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	47.9741 SP +	56.1331 nD +	78.5896 Δf +	39.0083 SP +	46.4043 nD +	63.0374 Δf +	10.8707ET(30) +	0.4600ET(30) +	20.7253 SB +
	473.672 7, $R^2 =$ 0.980	429.004 2, $R^2 =$ 0.994	527.8252 , $R^2 =$ 0.938	502.134 8, $R^2 =$ 0.931	464.738 7, $R^2 =$ 0.976	545.951 4, $R^2 =$ 0.867	346.6357, $R^2 = 0.974$	57.8356, $R^2 = 0.099$	72.5259, $R^2 =$ 0.113
11d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48.8183 SP +	57.9151 nD +	80.2642 Δf +	39.8526 SP +	48.1863 nD +	64.7121 Δf +	6.3470ET(3 0) +	0.9197ET(30) +	38.7860 SB +
	473.564 2, $R^2 =$ 0.957	426.988 4, $R^2 =$ 0.997	528.7423 , $R^2 =$ 0.922	500.026 3, $R^2 =$ 0.893	460.723 0, $R^2 =$ 0.967	544.868 5, $R^2 =$ 0.840	458.8592, $R^2 = 0.752$	122.8161, $R^2 = 0.973$	92.6801, $R^2 =$ 0.972
12a	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	64.7225 SP +	77.9746 nD +	106.6598 Δf +	52.3440 SP +	62.3861 nD +	85.9125 Δf +	6.1175ET(3 0) +	0.0634ET(30) +	3.8781S B +
	481.851 3, $R^2 =$ 0.913	418.419 3, $R^2 =$ 0.981	555.0669 , $R^2 =$ 0.884	513.273 1, $R^2 =$ 0.944	462.926 4, $R^2 =$ 0.994	572.399 2, $R^2 =$ 0.907	499.1722, $R^2 = 0.366$	93.3463, $R^2 = 0.006$	91.6179, $R^2 =$ 0.013
12b	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	66.5596 SP +	78.8817 nD +	108.9588 Δf +	52.2667 SP +	62.5065 nD +	83.9559 Δf +	8.0192ET(3 0) +	0.4695ET(30) +	22.0677 SB +
	478.777 1, $R^2 =$ 0.957	415.388 8, $R^2 =$ 0.995	553.8896 , $R^2 =$ 0.914	515.078 8, $R^2 =$ 0.906	464.506 4, $R^2 =$ 0.960	573.661 8, $R^2 =$ 0.834	508.9885, $R^2 = 0.918$	108.3420, $R^2 = 0.301$	93.6110, $R^2 =$ 0.374
* Использовали веб-инструмент http://solvatochrome.isc-ras.ru/ . Поляризуемость – SP, показатель преломления – nD, ориентационная поляризуемость – Δf , полярность растворителя – Et(30).									

Приложение 9

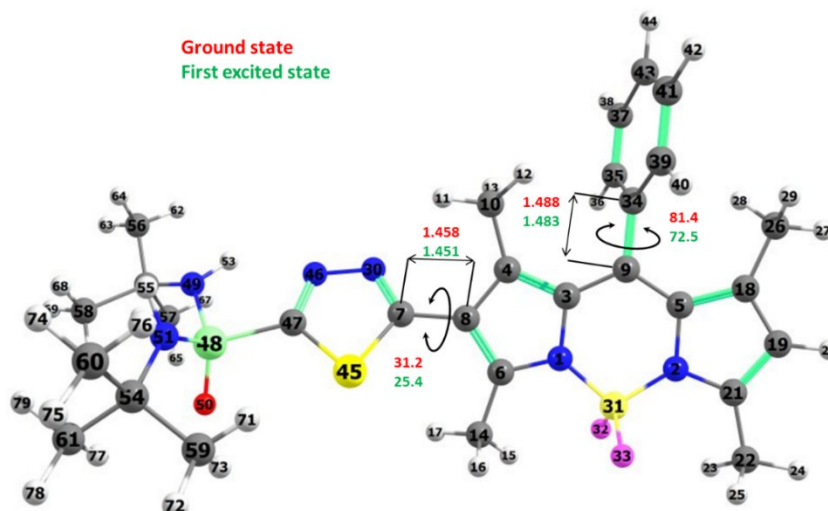


Естественные орбитали ВЗМО (слева) и НСМО (справа), рассчитанные методом SA-CASSCF(4,4) на оптимизированной геометрии основного состояния соединения **11c**.



Естественные орбитали ВЗМО (слева) и НСМО (справа), рассчитанные методом SA-CASSCF(4,4) на оптимизированной геометрии первого синглетного возбужденного состояния соединения **11c**.

Приложение 10



Выбранные геометрические параметры для оптимизированных геометрий основного (красный) и первого возбужденного (зеленый) состояний соединения **11c**.

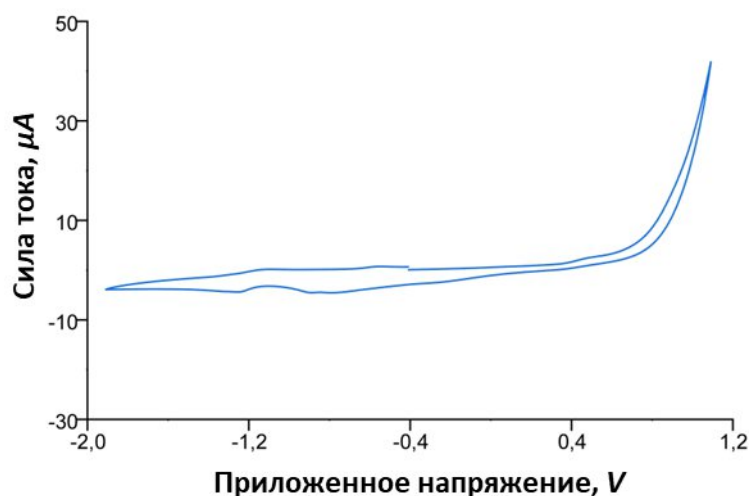
Таблица рассчитанных значений $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ и $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (в приближении вертикальных переходов) для первого синглетного возбужденного состояния соединения **11c**.

Статус	$\lambda_{\text{max abs}} \text{ нм}^{\text{a}}$	f (сила осциллятора) ^a	$\lambda_{\text{max emis}} \text{ нм}^{\text{a}}$	E gap eV ^b
Первое синглетное состояние	533.1	0.63300	572.1	2.74

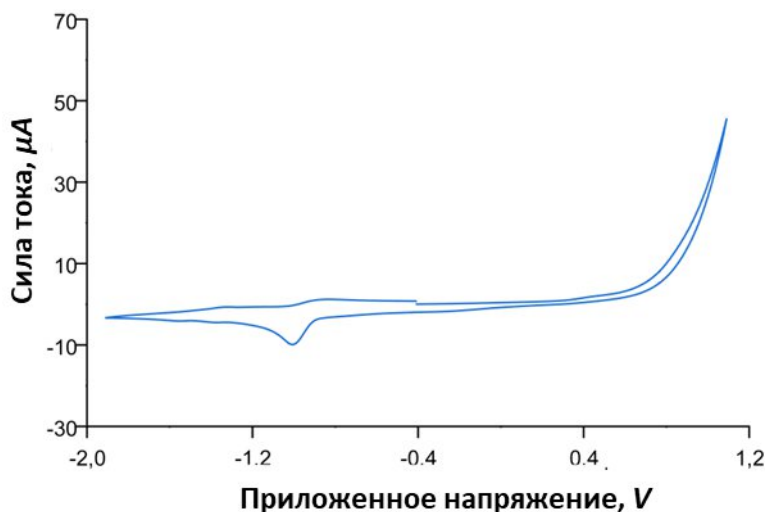
a – было рассчитано с использованием QD-SA-CASSCF(4,4).

b – было рассчитано с использованием TD-DFT (метод Франка-Кондона-Герцберга-Теллера) спектр поглощения в УФ-видимой области. E_{gap} = 1240 / λ_{onset} .

Приложение 11

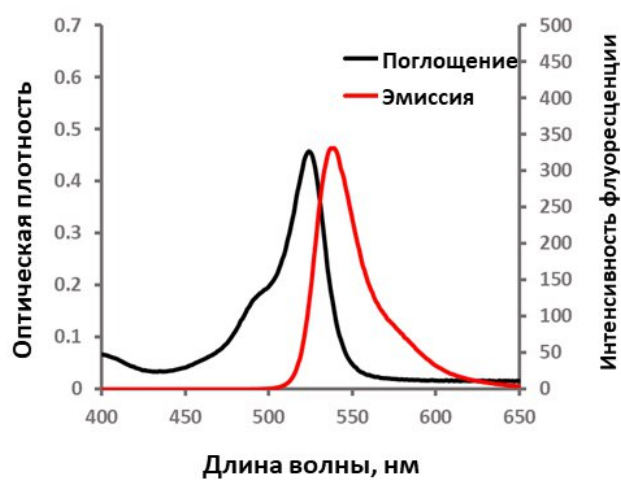


Циклическая вольтамперограмма соединения **11c** (условия: 100 mM TBAPF₆ в ДМСО, рабочий и вспомогательный электроды - Pt диск, электрод сравнения - Pt проволока, скорость сканирования 100 мВ/с, относительно пары Fc/Fc⁺).

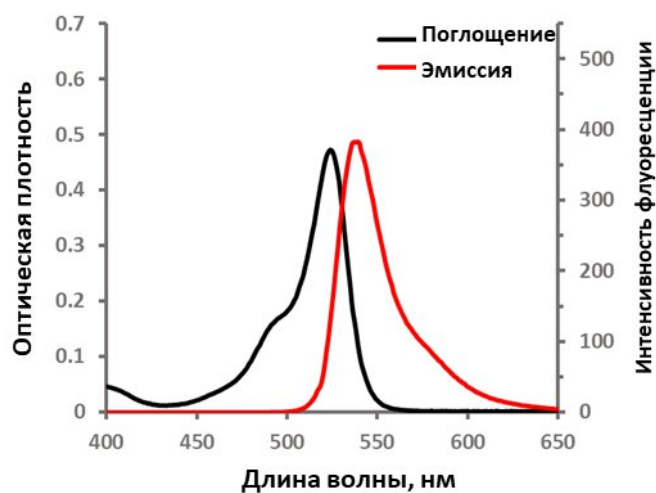


Циклическая вольтамперограмма соединения **11d** (условия: 100 mM TBAPF₆ в ДМСО, рабочий и вспомогательный электроды - Pt диск, электрод сравнения - Pt проволока, скорость сканирования 100 мВ/с, относительно пары Fc/Fc⁺).

Приложение 12

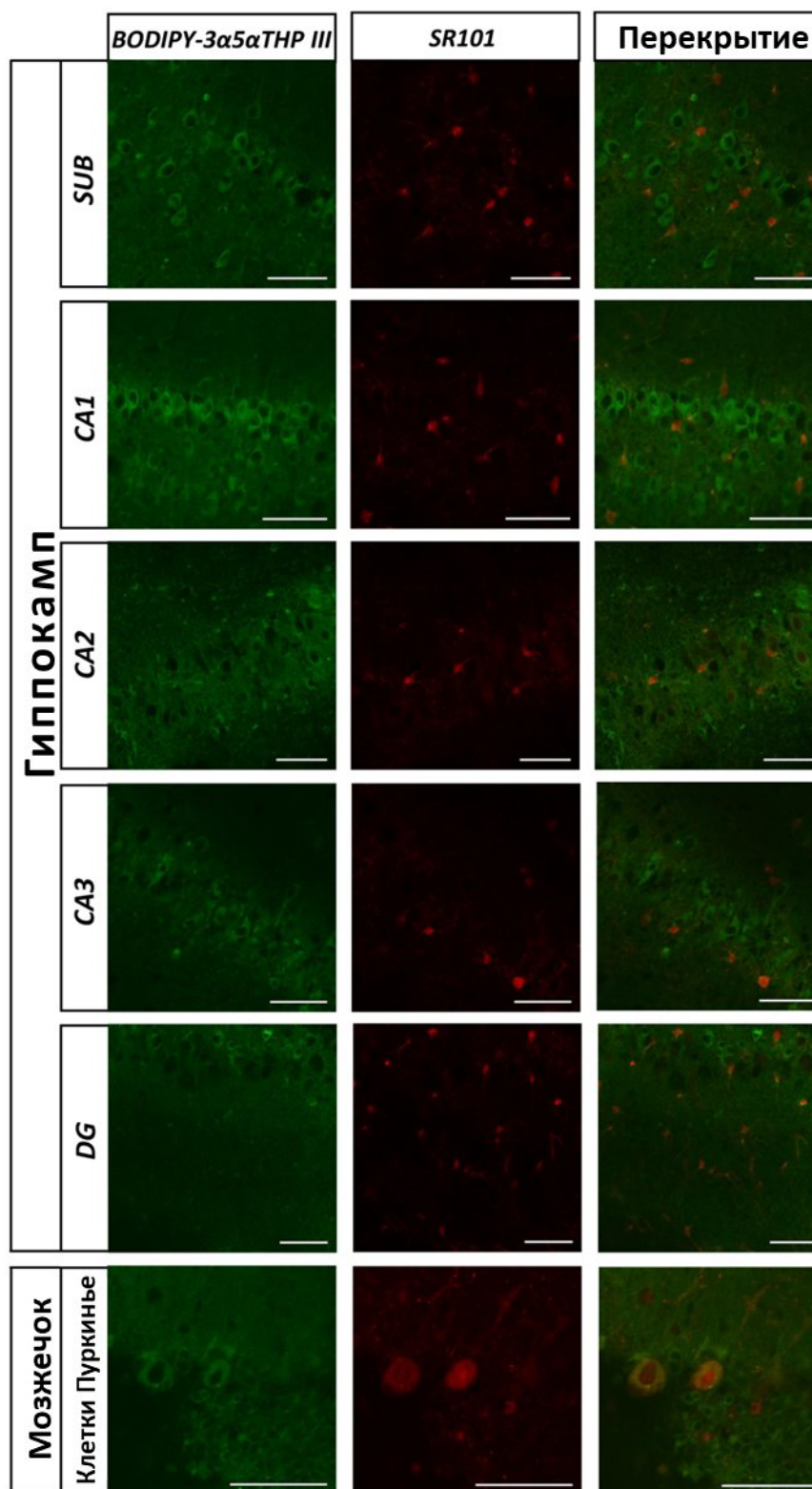


Спектры поглощения в УФ-видимой области (10 мкМ; H₂O/MeCN, 1:1) и флуоресцентные спектры (1 мкМ; H₂O/MeCN, 1:1) зонда BODIPY-3α5αTHP I.

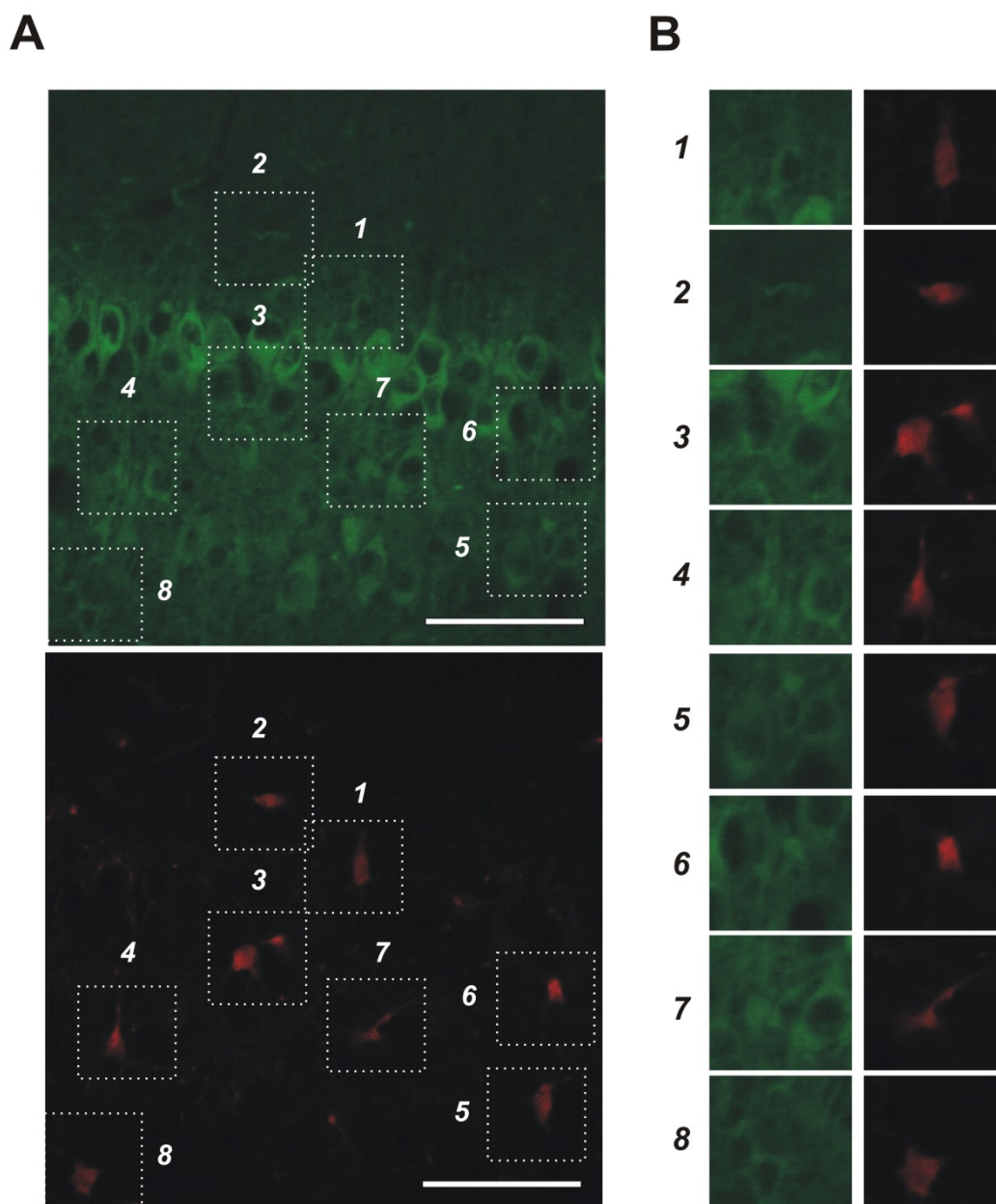


Спектры поглощения в УФ-видимой области (10 мкМ; H₂O/MeCN, 1:1) и флуоресцентные спектры (1 мкМ; H₂O/MeCN, 1:1) зонда BODIPY-3α5αTHP II

Приложение 13

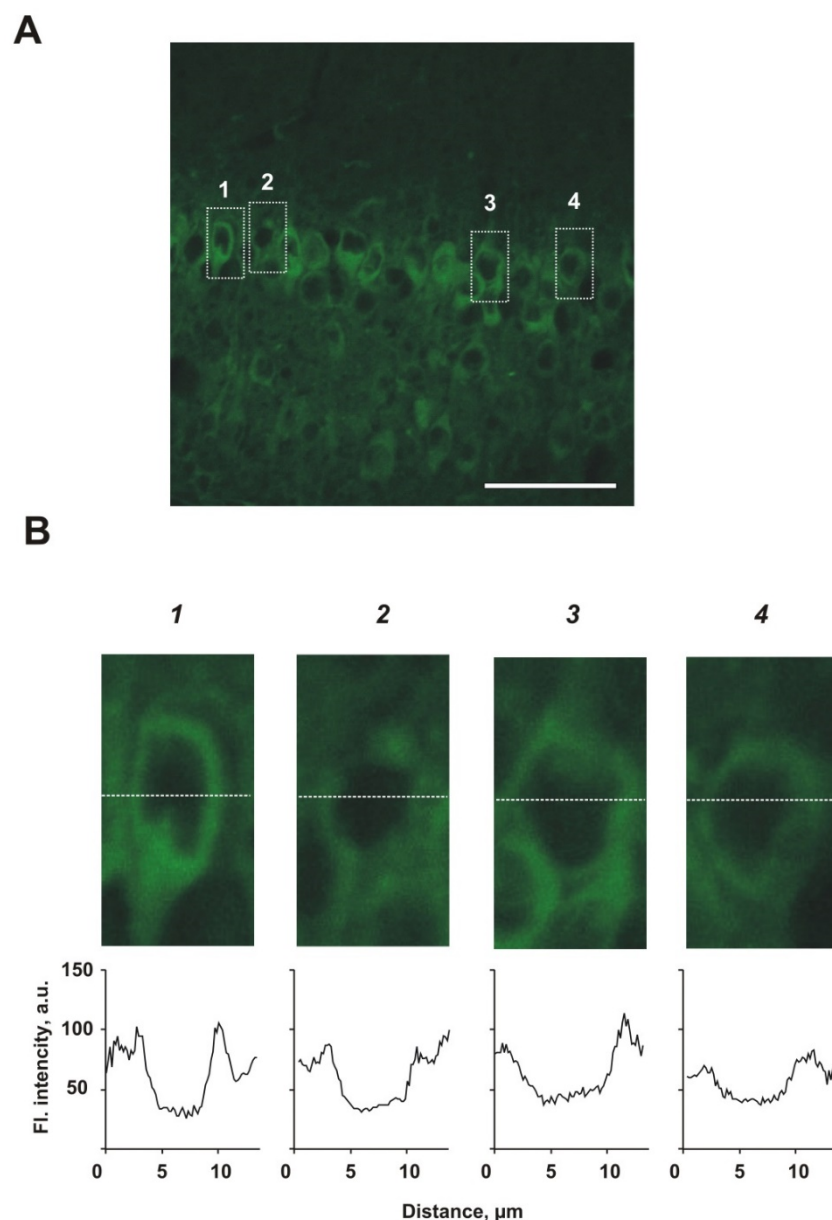


Окрашивание BODIPY-3 α 5 α THP III и SR101 субрегионов гиппокампа (субикулум (SUB), области CA1-CA3 (Аммонов рог), зубчатая извилина (DG)) и мозжечка (слой Пуркинье) на нефиксированной ткани головного мозга крысы. Масштабная линейка 50 мкм.



(А) Результаты двойного окрашивания срезов гиппокампа (область CA1) флуоресцентными зондами BODIPY-3 α 5 α THP **III** (зеленый, верхнее фото) и SR101 (красный, нижнее фото). Вся область изображений была разделена на области интереса (ООИ) на основе результатов окрашивания SR101: локальные максимумы интенсивности (предположительно, тела астроцитов) были выбраны в качестве центров квадратных областей — ООИ. Позиции пронумерованных ООИ идентичны на обоих изображениях. Масштабная линейка (белая горизонтальная линия) на обоих изображениях соответствует 50 мкм.

(В) Детальный вид пронумерованных ООИ, взятых с обоих изображений на левой панели (А). Каждый номер на рисунке соответствует номеру области на панели (А). Левое изображение (зеленое) — представляет ООИ из окрашивания BODIPY-3 α 5 α THP **III** (зеленый, верхнее изображение на панели (А)), правое изображение (красное) — из окрашивания SR101 (красный, нижнее изображение на панели (А)).



(A) Конфокальное изображение среза гиппокампа (область CA1), окрашенного BODIPY-3α5αTNP III. Случайно выбранные тела пирамидальных клеток были взяты в качестве центров областей интереса (ООИ, границы обозначены белой пунктирной линией) и пронумерованы. Белая горизонтальная линия — масштабная линейка, соответствует 50 мкм.

(B) Распределение интенсивности флуоресценции в каждой пронумерованной ООИ, взятое с изображения выше, было оценено вдоль линии (белая пунктирная линия вблизи центра каждой области). Каждая из этих линий проходит вблизи центров соответствующих клеточных тел. Профили интенсивности флуоресценции вдоль линий показаны под соответствующими ООИ.