

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Синюгіна Агнеса Тарасівна

УДК 577.336+577.112.7

ДИСЕРТАЦІЯ

**ВНУТРІШНЬОІОННІ БАРВНИКИ ЯК ЗОНДИ ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ
ВІЗУАЛІЗАЦІЇ КЛІТИН І ПОТЕНЦІЙНІ РЕАГЕНТИ ДЛЯ
ФОТОДИНАМІЧНОЇ ТЕРАПІЇ**

091 – Біологія

09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі біологія

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідні джерела

 (Синюгіна А.Т.)

Науковий керівник

Ярмолюк Сергій Миколайович

доктор хімічних наук, професор

Київ – 2023

АНОТАЦІЯ

Синюгіна А. Т. *«Внутрішньоіонні барвники як зонди для флуоресцентної візуалізації клітин і потенційні реагенти для фотодинамічної терапії»* – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія (09 – Біологія) - Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2023.

Дисертація присвячена пошуку нових флуоресцентних внутрішньоіонних поліметинів на основі мероціанінових та сквараїнових барвників як реагентів для візуалізації клітин і фотодинамічної терапії.

Флуоресцентна візуалізація з використанням поліметинових барвників є важливим інструментом для біомедичних досліджень. Найбільш перспективними є поліметинові барвники, які поглинають та випромінюють світло у ближньому червоному діапазоні. Це дозволяє зменшити фоновий сигнал та покращити якість зображення. Довгохвильові барвники поліметинового ряду використовуються як реагенти для флуоресцентної візуалізації клітин та як фотосенсибілізатори для проведення фотодинамічної терапії.

Для біологічних застосувань найчастіше використовуються катіонні ціанінові барвники, оскільки вони мають високі значення квантових виходів флуоресценції та молярних коефіцієнтів екстинкції. Однак відомо, що катіонні барвники здатні до селективного накопичення в мітохондріях клітин, що ускладнює їхнє неспецифічне розподілення в об'ємі клітини, конструювання кон'югатів для адресної доставки потрібних нам лігандів. Тому виникає потреба вдосконалення методів флуоресцентного мічення, а саме пошук мінімізації впливу барвника на фармакінетику його кон'югату. Одним із рішень є розробка довгохвильових флуоресцентних барвників, що не містять заряду чи заряд є скомпенсованим всередині молекули. Використання внутрішньоіонних барвників допоможе розширити практичні можливості для флуоресцентної

візуалізації клітин та дизайну адресних флуоресцентних кон'югатів. До внутрішньоіонних барвників відносять мероціанінові та сквараїнові барвники.

Досліджені спектральні властивості ряду нових мероціанінових барвників із мезо-замісниками в поліметиновому ланцюзі, які поглинають світло в області понад 600 нм. Їх спектральні характеристики вивчені у метанолі, водному буфері та в присутності глобулярних білків. На основі експериментальних даних розраховані константи зв'язування мероціанінових барвників із людським сироватковим альбуміном та показано, що жорстка фіксація поліметинового ланцюга шляхом введення мезо-замісників в поліметиновий ланцюг сприяє зростанню констант зв'язування із білком. Утворення нековалентних комплексів із альбумінами впливає на спектрально-флуоресцентні властивості барвників, зокрема, спостерігається зростання інтенсивності флуоресценції, квантових виходів флуоресценції та зміщення максимумів поглинання в довгохвильову частину спектрального діапазону. Були передбачені можливі сайти зв'язування мероціанінів на поверхні білкової молекули людського сироваткового альбуміну за допомогою молекулярного докінгу. За результатами проточної цитометрії встановлено, що синтезовані мероціаніни проникають у клітини A2780. За результатами флуоресцентної мікроскопії живих клітин A2780 та проведеної колокалізації із мітохондріально-специфічним барвником родамін-123 та барвником селективним до ядерного хроматину Hoechst3342, показано, що мероціаніни локалізуються в мітохондріях без вираженої специфічності і не проникають до ядра клітин. Окрім того, за результатами МТТ-аналізу встановлено, що барвники з фенільними та амінодифенільними замісниками в мезо-положенні поліметинового ланцюга не проявляють цитотоксичної дії на клітини MCF-7 в представленому діапазоні концентрацій та часом інкубації 24 години.

До внутрішньоіонних барвників відносять також бетаїнові (цвіттер-йонні) барвники, в яких органічний катіон і аніон з'єднані між собою системою кон'югованих зв'язків, а їх позитивні та негативні заряди розподілені по атомах хромофору. Типовими представниками бетаїнів є барвники на основі квадратної

кислоти – сквараїнові (скварилієві) барвники. Науковий інтерес до фотохімії сквараїнів пов'язаний з їх фотостабільністю, високою інтенсивністю флуоресценції та здатністю генерувати активні форми Оксигену при опроміненні світлом відповідної довжини хвилі. Дослідження індоленінових сквараїнових барвників із N,N'-алкільними бічними замісниками показало, що барвники із позитивно зарядженими четвертинними солями амонію на кінцях N,N'-алкільних замісників виявляють найменшу спорідненість до альбумінів та мають слабку інтенсивність флуоресценції в клітинах MCF-7. В той же час, барвник з карбоксильними групами на кінцях N,N'- алкільних замісників зв'язується з сироватковими альбумінами із суттєвим підвищенням квантових виходів флуоресценції, а також проникає у клітини та фарбує елементи цитоплазми.

Заміна індоленінових гетероциклів сквараїнових барвників на бензоіндоленінові привела до суттєвого зміщення максимумів поглинання в довгохвильову спектральну область. Вивчення спектральних властивостей бензіндоленінів показало схильність до агрегації барвників із N,N'-алкільними замісниками. Однак, взаємодія із сироватковими альбумінами сприяла руйнуванню агрегатів зі зростанням інтенсивності флуоресценції барвників. Сквараїновий барвник із N,N'-метильними замісниками продемонстрував 500-кратне зростання інтенсивності флуоресценції у присутності бичачого сироваткового альбуміну. Значення величин констант зв'язування барвника із гідрофобними N,N'-метильними замісниками та барвника із гідрофільними N,N'-сульфоалкільними замісниками, виявилися схожими, що свідчить про перевагу гідрофобного механізму зв'язування барвників із альбуміном без помітної участі N,N'-алкільних замісників у зв'язуванні. Було ідентифіковано 5 найбільш ймовірних кишень зв'язування сквараїнових барвників на поверхні білкової молекули сироваткового альбуміна бика за допомогою молекулярного докінгу.

Сквараїнові барвники бензіндоленінового ряду були застосовані як фотосенсибілізатори для фотодинамічної терапії. З використанням пастки синглетного Оксигену оцінена здатність обраних барвників до генерації

активних форм Оксигену в порівнянні зі стандартом. Показано, що бензоіндоскварайн із гідрофобними N,N'-метильними замісниками генерує активні форми Оксигену ефективніше при зростанні відсотку води в етанолі, що обумовлено його більшою схильністю до агрегації у водному середовищі. Для дослідження спектральних проявів агрегації бензіндоскварайну були проаналізовані його спектри поглинання і флуоресценції у сумішах: вода-етанол та вода-ДМСО у різних співвідношеннях при постійній концентрації барвника.

На клітинній лінії MCF-7 була досліджена темнова та світлова токсичність барвників із метильними, сульфо- та карбоксильними N,N'-алкільними замісниками. За результатами МТТ-аналізу виявлено, що усі три скварайнові барвники генерують активні форми Оксигену при опроміненні червоним світлом та спричиняють загибель клітин у безсироватковому середовищі. Барвники з N,N'-алкільними гідрофільними групами не демонстрували токсичність у присутності 5% бичачого альбуміну навіть за їх високих концентраціях. В той же час для скварайнового барвника із N,N'-метильними замісниками виживання клітин MCF-7 при опроміненні лазером знижувалось майже на 40% за концентрації 0,1 μM і майже на 90% за концентрації 10 μM , навіть за присутності альбуміну. Отже, скварайновий барвник із N,N'-метильними замісниками може використовуватися як потенційний фотосенсибілізатор для фотодинамічної терапії.

Були синтезовані ковалентні кон'югати D-глюкозаміну з мероціаніновими та скварайновими барвниками. Вивчені спектральні властивості отриманих кон'югатів порівняно із вихідними барвниками, здатність до зв'язування з людським сироватковим альбуміном та проникнення в клітини MCF-7.

Ключові слова: мероціанінові барвники, сироваткові альбуміни, флуоресцентна спектроскопія, флуоресцентна мікроскопія, скварайнові барвники, спектроскопія поглинання, синглетний Оксиген, фотодинамічна терапія, поліметинові барвники, флуоресценція, цитотоксичність, клітинні лінії

SUMMARY

Syniugina A. T. *Intraionic dyes as probes for fluorescence visualization of cells and potential reagents for photodynamic therapy* – Qualification scientific work on the right of a manuscript.

The thesis for a scientific degree of Doctor of Philosophy by speciality 091 – Biology (09 – Biology) - Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, 2023.

The dissertation is dedicated to the search for new fluorescent intramolecular polymethines based on merocyanine and squaraine dyes as reagents for cell visualization and photodynamic therapy.

Fluorescent visualization using polymethine dyes is an important tool for biomedical research. Fluorescent dyes that absorb and emit in the far-red and near-infrared region are broadly applicable in many biological studies. Polymethine dyes have found applications as fluorescent labels and probes for tracking biomolecules, as contrast agents, and in photodynamic therapy due to their high quantum fluorescence yields and structural modification capabilities. Long-wavelength polymethine dyes are used as fluorescent tags for tracking biological molecules, as reagents for cell visualization, and as photosensitizers for conducting photodynamic therapy.

The main group of dyes used is cationic cyanine dyes, which can selectively accumulate in the mitochondria of cancer cells. However, such selectivity can have a negative impact on the biodistribution of their conjugates. The objective of this work is to develop long-wavelength neutral or zwitterionic polymethine fluorophores, study their spectral-luminescent properties in free form and as conjugates, interactions with proteins of different nature, penetration into cells, and their photodynamic properties.

Novel series of merocyanine dyes based on variations of heterocycles were synthesized. All synthesized dyes absorbed in the far-red spectral range, making them attractive candidates for further investigation as long-wavelength fluorescent probes in biovisualization. Using spectral-luminescent methods, their spectral characteristics have been studied in methanol, aqueous buffer, and in the presence of proteins of

various structures. It has been established that merocyanines non-covalently bind to serum albumins. Based on experimental data, binding constants with human serum albumin were determined. It has been shown that the introduction of a bulky substituent into the meso-position leads to an increase in the binding constant with human serum albumin. According to the results of molecular docking, the studied dye binds to up to five binding pockets on human albumin due to hydrophobic interactions with amino acid residues. This makes them stable and resistant to dissociation. The formation of the complex is accompanied by significant changes in the spectral-luminescent properties of the dye. This results in an increase in fluorescence intensity, quantum yields, and shifts in the absorption maxima into the long-wavelength part of the spectral range. Flow cytometry and fluorescence microscopy results show that the compounds penetrate into cells. Co-localization with a mitochondrial-specific dye and a nuclear chromatin-specific dye indicates that the merocyanines localize in mitochondria without strong specificity for the nucleus and do not penetrate it. Furthermore, MTT tests showed that dyes with phenyl and aminobisphenyl substituents at the meso-position of central rings do not exhibit cytotoxicity to MCF-7 cells within the studied concentration range and a 24-hour incubation period.

Among the intramolecular dyes, in addition to neutral ones, betaine (zwitterionic) dyes are included. In these dyes, the organic cation and anion are linked by a system of conjugated bonds, and their positive and negative charges are distributed across the chromophore atoms. Typical representatives of betaines are dyes based on squaric acid – squaraines. The scientific interest in the photochemistry of squaraines is related to their photostability, brightness, and the ability to generate reactive oxygen species upon irradiation with light of a specific wavelength. The investigation of indolenine dyes with side groups of different charges revealed that positively charged side substitutes exhibit the least affinity for bovin serum albumin and have weak penetration through the cell membrane. On the other hand, dyes with neutral and anionic side substituents exhibited significant increases in quantum yields of fluorescence and strong binding to serum albumins. The research on indolenine squaraine dyes with N,N'-alkyl substituents has demonstrated that dyes with positively

charged quaternary ammonium salts at the ends of N,N'-alkyl substituents exhibit the least affinity to albumins and have weak fluorescence in MCF-7 cells. Meanwhile, the dye with carboxylic groups at the ends of N,N'-alkyl substituents binds to serum albumins with a significant increase in fluorescence quantum yields. Additionally, it penetrates into cells and stains elements of the cytoplasm.

Replacing the indolenine terminal groups with benzindolenine resulted in a significant shift into the long-wavelength spectral range, allowing the investigation of the photosensitizing properties of these dyes when exposed to red light. Furthermore, the choice of the benzindolenine terminal group is justified by the fact that dyes based on it have low toxicity, satisfactory solubility in physiological solutions, and high quantum fluorescence yields. Study of the spectral properties of benzindolenines revealed their propensity to form aggregates in dyes containing alkyl side radicals. However, interaction with serum albumins led to the disruption of these aggregates, resulting in an increase in fluorescence intensity. The most significant increase, exceeding 500-fold, was observed for the dye with methyl radicals. The binding constants of the dyes with hydrophobic and hydrophilic substituents were found to be similar. This indicates a preference for the hydrophobic binding mechanism with albumin. In the results of the molecular docking, five the most probable binding pockets were identified, which were common for both fluorescent probes.

For benzindolenine dyes of the squaric acid series, the effectiveness of their application for photodynamic therapy was demonstrated. Using singlet oxygen probe, the ability of the selected dyes to generate reactive oxygen species was assessed in comparison with a standard. It was found that squaraine with hydrophobic side substituents generates reactive oxygen species more efficiently with an increasing percentage of water in ethanol. To investigate the spectral manifestations of aggregation, its absorption and fluorescence spectra in mixtures with water, ethanol, and DMSO at different ratios were analyzed. It was established that the aggregate has a sandwich-like structure, which likely activates the sensitization of singlet oxygen via triplet-triplet energy transfer.

On the MCF-7 cell line, the dark and light toxicity of dyes with methyl, sulfo, and carboxylic N,N'-substituents has been investigated. According to the results of the MTT assay, it was found that all compounds generate reactive oxygen species after irradiated with red light and lead to cell death. The presence of 5% bovine serum albumin affected the toxic effect of the studied dyes. In the case of dyes with hydrophilic substituents, no toxicity was detected at the given concentrations, whereas for the dye with methyl substituents, the viability of MCF-7 cells decreased by almost 40% at a concentration of 0.1 μM and nearly 90% at a concentration of 10 μM when irradiated with a laser. This indicates the toxicity of this fluorophore even in the presence of albumin.

For the possibility of using merocyanine dyes as fluorescent probes, a covalent attachment of D-glucosamine was performed. Spectral properties of the obtained conjugate were analyzed in comparison with the free dye. The ability of the conjugate to penetrate the cell membrane has been investigated.

Keywords: merocyanine dyes, serum albumins, fluorescence spectroscopy, fluorescence microscopy, squaraine dyes, absorption spectroscopy, singlet oxygen, photodynamic therapy, polymethine dyes, fluorescence, cytotoxicity, cell lines.

ПУБЛІКАЦІЇ АВТОРА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях

1. **Syniugina A.**, Chernii S., Losytsky M., Syniugin A., Slominskii Y., Balanda A., Özkan G., Mokhir A., Kovalska V., Yarmoluk, S. “The synthesis and study of novel merocyanine probes for protein detection and cells visualization” *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 2021, 7, 100046; DOI:10.1016/j.jpap.2021.100046.
Особистий внесок здобувача – збір літературних даних, синтез, спектрально-флуоресцентні дослідження барвників.
2. **Syniugina A.**, Chernii S., Losytsky M., Ozkan H.G., Slominskii Yu, Syniugin A., Pekhnyo V., Mokhir A., Yarmoluk S. “N-alkyl functionalized squaraine dyes as fluorescent probes for the detection of serum albumins”. *Biopolymers and Cell*, 2022; 38(2):103-116 (Open Access, Q4) DOI 10.7124/bc.000A75. *Особистий внесок здобувача – аналіз літературних даних, спектрально-флуоресцентні дослідження барвників, дослідження їх взаємодії із білками, написання та підготовка статті до друку.*
3. **Syniugina A.**, Malanchuk O., Chernii S., Bdzhola A., Horbatok K., Syniugin A., Yarmoluk S. “The squaraine derivatives as potential photosensitizers in photodynamic therapy of cancer”. *Biopolymers and Cell*, 2023; 39(1):3-13, DOI 10.7124/bc.000A81. *Особистий внесок здобувача – аналіз літературних даних, спектрально-флуоресцентні вимірювання, оцінка фотодинамічних властивостей барвників, проведення МТТ-аналізу, підготовка статті до друку.*
4. Ishchenko, A., **Syniugina A.** “Structure and Photosensitizer Ability of Polymethine Dyes in Photodynamic Therapy: A Review”. *Theoretical and Experimental Chemistry*, 2023; 58(6):373 – 401, DOI 10.1007/s11237-023-09754-9. *Особистий внесок здобувача – підбір та узагальнення літератури.*
5. **Синюгіна А.Т.**, Іщенко О.О. «Вплив агрегації бензоіндоскварайнів на генерацію синглетного Оксигену». *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2023. № 4. С. 60-

67. doi.org/10.15407/dopovidi2023.04.060. *Проведення експериментальної частини, підготовка статті до друку.*

Тези наукових доповідей

1. **Syniugina A.**, Chernii S., Slominskiy Yu., Yarmoluk S. /The study of N-alkyl functionalized indolenine based squaraines as fluorescent probes for proteins detection // Всеукраїнська наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених з міжнародною участю „Хімічні проблеми сьогодення”, Збірник тез, 25-27.05.2020, Вінниця, Україна. - P. 42
2. **Syniugina A.**, Chernii S., Synugin A., Balanda A., Kovalska V., Yarmoluk S. /The study of novel functionalized merocyanine dyes for albumins detection // XIV IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists, 27-28.05.2020, Kyiv, Ukraine. – P. 21.
3. **Syniugina A.T**, Chernii S.V., Synugin A.R., Losytskyy M.Yu., Slominskii Yu.L., Mokhir A.A., Kovalska V.B., Yarmoluk S.M. /Merocyanines as fluorescent probes for the detection in microscopy // IV International scientific conference for students and young scientists, 23-25.03.2021, Vinnytsia, Ukraine.
4. Chernii S.V., **Syniugina A.T.**, Slominskii Yu.L., Özkan H.G., Mokhir A.A., Kovalska V.B., Yarmoluk S.M. /Squaraine dyes as fluorescent probes for microscopy and the detection of proteins // XVII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 19–21 квітня 2021).
5. **Syniugina A.**, Cherniy S., Malanchuk O., Suniugin A., Yarmoluk S. /D-glucosamide-containing derivatives of organic dyes as fluorescence probes for cell imaging // All-Ukrainian conference on molecular and cell biology with international participation, 15 -17.06.2022, p.103. Kyiv, Ukraine.

ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	14
ВСТУП.....	15
РОЗДІЛ 1	20
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	20
1.1 Вплив хімічної структури поліметинових барвників на їхні спектральні властивості для флуоресцентної візуалізації біологічних об'єктів	20
1.2 Взаємодія поліметинових барвників з альбумінами.....	29
1.3 Поліметинові барвники як фотосенсибілізатори для фотодинамічної терапії 36	
1.4 Вплив взаємодії барвників із альбумінами на їх фотодинамічні властивості	46
РОЗДІЛ 2	51
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	51
2.1 Матеріали.....	51
2.2 Синтез барвників	51
2.3 Спектрально-флуоресцентні вимірювання	56
2.4 Визначення константи зв'язування барвників із альбумінами	58
2.5 Культивування клітин	59
2.6 Візуалізація живих клітин.....	59
2.7 Конфокальна візуалізація фіксованих клітин.....	60
2.8 Проточна цитометрія.....	60
2.9 Визначення цитотоксичності барвників.....	61
2.10 Молекулярний докінг	62
2.11 Молекулярна динаміка.....	62
2.12 Статистичний аналіз.....	63
РОЗДІЛ 3	64
МЕРОЦІАНІНОВІ БАРВНИКИ	64

3.1	Синтез мероціанінових барвників.....	67
3.2	Спектрально-флуоресцентні характеристики досліджуваних барвників ..	68
3.3	Спектральні властивості мероціанінів в присутності білків.....	75
3.4	Молекулярний докінг барвника 3.4 по всій поверхні молекули сироваткового альбуміну людини	80
3.5	Дослідження клітинної проникності барвників та їх цитотоксичності ..	87
3.6	Флуоресцентна мікроскопія барвників 3.3 та 3.4 для фарбування клітин	89
	РОЗДІЛ 4	92
	СКВАРАЇНОВІ БАРВНИКИ	92
4.1	Синтез індоленінових сквараїнів	93
4.2	Спектрально-флуоресцентні властивості індоленінових сквараїнів.....	94
4.3	Спектральні властивості індоленінових сквараїнів в присутності білків	96
4.4	Флуоресцентна мікроскопія барвників 4.1 – 4.3 для фарбування ракових клітин	99
4.5	Спектрально-флуоресцентні властивості бензіндоленінових сквараїнів.....	101
4.6	Спектрально-флуоресцентні властивості бензіндоленінових сквараїнів в присутності глобулярних білків	104
4.7	Оцінка констант зв'язування барвників з бичачим сироватковим альбуміном	107
4.8	Молекулярний докінг барвника 4.5 по всій поверхні молекули бичачого сироваткового альбуміну.....	109
4.9	Дослідження проникності барвників в клітини та їх розподіл методом флуоресцентної мікроскопії.....	117
4.10	Дослідження фотодинамічної активності бензіндоленінових барвників	118
4.11	Дослідження цитотоксичності бензіндоленінових барвників	124

РОЗДІЛ 5	130
КОН'ЮГАТИ НА ОСНОВІ МЕРОЦІАНІНОВОГО І.....	130
СКВАРАЇНОВОГО БАРВНИКІВ	130
5.1 Синтез кон'югату 3.4-GlcN.....	130
5.2 Спектральні властивості кон'югату 3.4-GlcN.....	131
5.3 Синтез кон'югату 4.3-GlcN.....	132
5.4 Дослідження спектральних властивостей кон'югату глюкозаміну із барвником 4.3.....	133
5.3 Дослідження проникності кон'югатів до клітин MCF-7	134
ВИСНОВКИ.....	136
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	138
ДОДАТОК А	161

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

DMCO	—	Диметилсульфоксид
OD	—	Оптична густина
ФДТ	—	Фотодинамічна терапія
UV	—	Ультрафіолетова область спектру
VIS	—	Область видимого спектру
HRMS		Масспектрометрією високої роздільної здатності
ТШХ	—	Тонкошарова хроматографія
ЯМР	—	Ядерний магнітний резонанс
МТТ		Тіазоліл синій тетразолій бромід
HBSS	—	Збалансований сольовий розчин Хенкса
PBS	—	фосфатно-сольовий буфер
DPBS	—	Фосфатний буферний розчин Дульбекко
ESI	—	Електроспрей іонізація
ПБ	—	Поліметиновий барвник
ФС	—	Фотосенсибілізатор
HSA	—	Сироватковий альбумін людини
BLG	—	Бета-лактоглобулін
BSA	—	Бичачий сироватковий альбумін
ESA	—	Кінський сироватковий альбумін
BLG	—	Фетальна бичача сироватка
LYS	—	Лізоцим
BLG	—	Бета лактоглобулін
OVA	—	Овальбумін
ДНК	—	Дезоксирибонуклеїнова кислота
TRIS	—	Тріс-оксиметил-аміно-метан
DPBF	—	1,3-дифенілізобензофуран
FBS	—	Фетальна бичача сироватка

ВСТУП

Актуальність теми. Швидкі темпи розвитку біотехнологій створюють необхідність у вдосконаленні методів та матеріалів для виявлення та візуалізації біологічних об'єктів. Традиційне використання радіоізотопів призводить до серйозних обмежень, таких як високі витрати, нестабільність та створення небезпечних умов праці. У цьому контексті сучасні технології флуоресцентної діагностики виходять на передній план. У порівнянні з радіоізотопами, флуоресцентні барвники виявляються менш токсичними та простішими в застосуванні. Це відкриває широкі можливості для точного вивчення біологічних процесів. Існує велика кількість флуоресцентних органічних барвників, проте найбільш привабливими є поліметинові барвники, що вирізняються яскравістю, високими квантовими виходами флуоресценції, біосумісністю та можливістю хімічної модифікації структури. Найвищу ефективність для біологічної візуалізації мають поліметини, що випромінюють світло в довгохвильовій частині спектрального діапазону, тобто в області, де світло має більшу глибину проникнення в тканини (650-1400 нм). Окрім того, для ряду досліджень надзвичайно важливим є використання внутрішньоіонних поліметинових барвників, які не мають загального електричного заряду на флуорофорі, або ж внутрішній заряд скомпенсований всередині молекули. До таких барвників відносять мероціанінові та скварайнові барвники. Власне, кон'югати нейтральних або цвіттеріонних барвників з лігандами дають змогу реалізувати їхню адресну доставку до потрібних нам молекулярних мішеней.

Основна увага при дослідженні мероціанінів приділяється барвникам із мезо-незаміщеним поліметиновим ланцюгом. Вплив мезо-замісників у поліметиновому ланцюзі на взаємодію барвників із сироватковими альбумінами та проникність в клітини практично не вивчений. Досить малочисельні дослідження, які б розглядали вплив заряду чи довжини N,N'-алкільних замісників скварайнових барвників на зв'язування із сироватковими альбумінами

та їхню проникність в клітини. Тоді як нековалентне зв'язування з альбумінами, є основним механізмом біорозподілу барвника чи його доставки до потенційної мішені.

Розробка та дослідження нових внутрішньоіонних барвників допоможе розширити практичні можливості для флуоресцентної візуалізації клітин та дизайну адресних флуоресцентних кон'югатів. Тому поставлена мета в дисертації - пошук нових флуоресцентних внутрішньоіонних барвників для біологічної візуалізації клітин є актуальною і своєчасною.

Деякі поліметинові барвники, зокрема сквараїнові барвники, здатні генерувати активні форми Оксигену. Це уможливорює їх використання як потенційних реагентів для фотодинамічної терапії. Пошук ефективних фотосенсибілізаторів є актуальним напрямком, оскільки фотодинамічна терапія є неінвазивним методом руйнування пухлин. Поряд з тим, важливо вивчати зв'язування потенційних фотосенсибілізаторів з альбумінами, оскільки це може впливати на фармакокінетику та на протипухлинну ефективність фотосенсибілізаторів у клінічній фотодинамічній терапії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та виконана в рамках гранту Європейського Союзу «Горизонт 2020» Науково-інноваційної програми імені Марії Склодовської-Кюрі “NoBiasFluors”, №872331 (2020 – 2024 рр.).

Мета і завдання. Метою роботи є пошук нових реагентів для флуоресцентної візуалізації клітин і фотодинамічної терапії на основі внутрішньоіонних барвників.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Синтезувати довгохвильові мероціанінові та сквараїнові барвники та вивчити їх спектрально-флуоресцентні характеристики.
2. Визначити вплив замісників мероціанінових та сквараїнових барвників на процеси зв'язування із альбуміном.

3. Дослідити мероціанінові та сквараїнові барвники як зонди для флуоресцентної візуалізації клітин на прикладі клітинних ліній MCF-7 та A2780.

4. Вивчити фотодинамічні властивості бензіндольних сквараїнових барвників із використанням пастки синглетного Оксигену та на клітинній лінії MCF-7.

5. Дослідити вплив агрегації та зв'язування із бичачим сироватковим альбуміном на фотодинамічні властивості сквараїнових барвників.

6. Синтезувати кон'югати мероціанінових та сквараїнових барвників із глюкозаміном, вивчити їх спектральні властивості та проникність в клітини MCF-7 за допомогою конфокальної мікроскопії.

Об'єкт дослідження: мероціанінові та сквараїнові барвники, та їх комплекси із сироватковими альбумінами.

Предмет дослідження: спектрально-флуоресцентні характеристики внутрішньоіонних барвників в органічному, водному середовищах та в присутності глобулярних білків.

Методи дослідження. У роботі використані наступні методи дослідження: органічний синтез, флуоресцентна спектроскопія, електронна спектроскопія поглинання, конфокальна та флуоресцентна мікроскопії, проточна цитометрія, молекулярний докінг.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше досліджені спектральні властивості ряду мероціанінових барвників із жорстко закріпленими мезо-замісниками в поліметиновому ланцюзі, як у вільному стані, так і в присутності глобулярних білків. Вивчені спектральні властивості низки сквараїнових барвників з N,N'-алкільними замісниками різної іонності та ліпофільності. Показано, що введення мезо-замісника в поліметиновий ланцюг мероціанінових барвників підвищує фотостійкість молекули, впливає на ефективність зв'язування із людським сироватковим альбуміном.

На прикладі сквараїнових барвників встановлено, що хімічна природа N,N'-алкільних замісників впливає на їхнє зв'язування із альбумінами, проникнення в клітини, на їх здатність до генерації активних форм Оксигену.

Встановлено, що бензоіндосквараїн із N,N'-метильними бічними радикалами генерує активні форми Оксигену ефективніше, ніж його аналоги із N,N'-алкільними гідрофільними радикалами, що обумовлено його більшою схильністю до агрегації.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблені нові реагенти для флуоресцентної візуалізації клітин на основі внутрішньоіонних мероціанінових та сквараїнових барвників. Барвники збуджуються червоним світлом, що робить їх перспективними флуоресцентними зондами через можливість їхнього використання в області низької автофлуоресцентної інтерференції.

Запропонований потенційний фотосенсибілізатор на основі сквараїнового барвника, що характеризується збудженням у довгохвильовій частині спектру та має високу світлову токсичність.

Особистий внесок здобувача. Основний обсяг експериментальних даних частини, які викладені у дисертації, отримані за безпосередньою участю її автора. Автором самостійно вивчені спектральні характеристики барвників, їх взаємодія із альбумінами, оцінені фотодинамічні властивості сквараїнових барвників *in vitro*. Синтез сполук проведено у співпраці з к.х.н. А.Р. Синюгіним. Дані по флуоресцентній та конфокальній мікроскопії отримані у співпраці з к.б.н. С.В. Черній та к.б.н. с.н.с. О.М. Маланчук. Обчислення констант зв'язування з альбумінами здійснено спільно з к.ф.-м.н. с.н.с. М. Ю. Лосицьким. Дослідження молекулярного докінгу було проведено із к.б.н. с.н.с. Г.П. Волинець. Планування роботи здійснено із д.х.н. В.Б.Ковальською, узагальнення отриманих даних та оформлення результатів здійснено разом із науковим керівником д.х.н, проф. С.М.Ярмолюком.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертаційної роботи доповідалися на конференціях: Всеукраїнська наукова конференція молодих вчених (Київ, Україна, 2020), Міжнародна наукова конференція для студентів та молодих учених «Хімічні проблеми сьогодення» (Вінниця, Україна, 2020), Міжнародна наукова конференція для студентів та молодих учених з

міжнародною участю «Хімічні проблеми сьогодення» (Вінниця, Україна, 2021), наукова конференція «Львівські хімічні читання 2021» (Львів, Україна, 2021), Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, Україна, 2021), XV Всеукраїнська конференція з молекулярної та клітинної біології з міжнародною участю (Київ, Україна, 2022), Конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики (Київ, Україна, 2023).

Публікації. Результати дисертаційної роботи опубліковано у 5 статтях у наукових фахових журналах, а також представлено на 5 наукових конференціях у вигляді усних доповідей і стендових презентацій.

Структура та обсяг дисертації

Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, літературного огляду (розділ 1), матеріали і методи (розділ 2), обговорення отриманих результатів (розділи 3, 4, 5), висновків, списку використаних джерел та додатку. Роботу викладено на 162 сторінках стандартного друкованого тексту, містить 75 рисунків та 9 таблиць, переліку використаних джерел (181 посилання).

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Вплив хімічної структури поліметинових барвників на їхні спектральні властивості для флуоресцентної візуалізації біологічних об'єктів

Наразі флуоресцентна візуалізація використовується для вирішення наступних біологічних задач: ідентифікація клітинних процесів, візуалізація однієї клітини *in vivo*, ідентифікація нових терапевтичних стратегій, полегшення хірургічного втручання із наведенням зображень. Флуоресцентна візуалізація з використанням органічних барвників є перспективним та потужним інструментом для виявлення та неінвазивної характеристики онкологічних уражень. До основних переваг техніки флуоресцентної візуалізації відносять просторово-роздільну здатність, безпечність проведення, високу вибірковість та чутливість [1-4]. Основними необхідними умовами використання органічних барвників для флуоресцентної візуалізації біологічних об'єктів є високі коефіцієнти молярної екстинкції, великі квантові виходи флуоресценції, гарна розчинність, нетоксичність. Важлива також можливість структурної модифікації, наприклад, введення функціональних груп, що впливають на ліпофільність чи розчинність барвників та груп, що можуть бути використані для кон'югації з біомолекулами, специфічними лігандами чи ліками [2, 5].

Серед широкого класу органічних флуорофорів особливо цікавими та перспективними є поліметинові барвники, адже їхні похідні можуть мати флуоресценцію в червоній та ближній інфрачервоній частині спектра (NIR-барвники), тобто у спектральній області, де світло проникає на найбільшу глибину в тканини - так зване терапевтичне вікно (650-1400 нм). Крім того, на візуалізацію біологічних молекул *in vitro* за допомогою NIR-барвників

практично не впливає фонова автофлуоресценція. Пошук нових поліметинових барвників, які одночасно задовільняють усім необхідним критеріям, зокрема високому квантовому виходу флуоресценції у водних розчинах, хімічній стійкості, фотостабільності, є актуальним станом на сьогоднішній день. Структурна модифікація є одним із варіантів зміщення максимуму поглинання флуорофору в довгохвильову частину спектрального діапазону. Наприклад, максимальна довжина хвилі поглинання та випромінювання може регулюватися кінцевими групами та довжиною поліметинового ланцюга барвників. Подовження спряженого ланцюга збільшує ступінь делокалізації π -електронів, що є класичним методом отримання барвників із батохромним зсувом. Проте, дана стратегія може призводити до порушення рівномірності у розподілі заряду в хромофорі та до зменшення фотостабільності молекул [6]. Порушення жорсткості поліметинового ланцюга спричиняє процес ізомеризації, який, як наслідок, викликає розсіювання енергії збудження та безвипромінювальної дезактивації збудженого стану, що зменшує квантовий вихід та фотостабільність барвників [7]. Для підвищення фотостабільності поліметинового барвника, проводять структурну оптимізацію, наприклад, закріплення поліметинового ланцюга каркасними угрупованнями [8]. В ролі таких угруповань найчастіше використовуються насичені шестичленні циклічні місткові групи. У γ, γ' -положенні поліметинового ланцюга вони не порушують електронну симетрію молекули своїм донорним ефектом, проте викликають додатковий батохромний зсув смуги поглинання і вирівнюють розподіл заряду між кінцевими гетероциклічними групами і ланцюгом [9]. Останнє забезпечує додаткове зростання інтенсивності і звуження смуги поглинання.

Застосування гетероциклів на кінцях поліметинового ланцюга, що мають власну розширену систему кратних зв'язків є альтернативним підходом для синтезу довгохвильових поліметинових барвників без зменшення їх фотохімічної стабільності [10]. Введення кількох донорних груп в структуру вихідного барвника типу **1** (рис. 1.1) призводить до зміщення максимумів

поглинання в інфрачервону область та зростання квантових виходів незважаючи на відносно короткий метиновий ланцюг [11]:

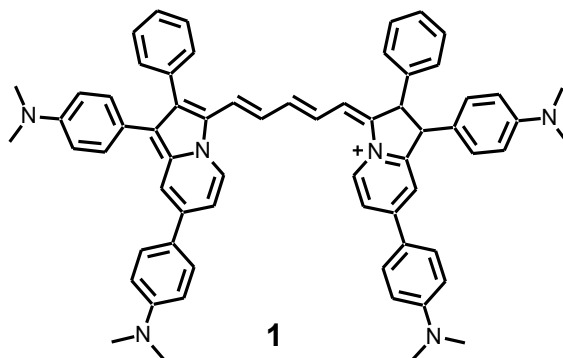


Рис. 1.1 Приклад хімічної структури барвника із розширеною π -системою

Проте, долаючи проблему поглинання в довгохвильовій області, введення гідрофобних ароматичних груп сприяє появі іншій проблемі – незадовільній розчинності отриманих сполук у фізіологічному водному середовищі.

Можливе використання заміщення атома Гідрогену в мезо-положенні каркасної групи замісниками. Наприклад, введення атому Хлору викликає додатковий батохромний зсув в спектрі поглинання [12], покращує фотостабільність, збільшує квантовий вихід, зменшує фотознебарвлення та агрегацію в розчині [13,14]. Окрім того, атом Хлору в мезо-положенні є хімічно активним і використовується для синтезу нових барвників [15, 16].

Модифікація гетероциклів бічними групами дає змогу оптимізувати розчинність, гідрофільність або ж гідрофобність барвника, дає можливість ковалентної кон'югації до біологічних молекул та, що важливо, практично не впливає на спектрально-люмінесцентні властивості отриманих сполук. Так, введення залишка капронової кислоти в барвники **IR 780** [17], **IR 808** [18] та **ICG (IR825)** [19] підвищує їх жиророзчинність та дозволяє використовувати барвники як ковалентні флуоресцентні мітки. Для уникнення агрегації барвників структуру гетероциклів модифікують гідрофільними групами [20, 21]. Проте, варто зазначити, що будь-які структурні модифікації можуть впливати на біологічні властивості барвників, що необхідно враховувати при їх розробці [22]. Так, для барвників **IR-780** [17], **IR-783** [23] та **MHI-148** [24], показана їхня

вибіркова здатність накопичуватися в ракових клітинах і давати вищі співвідношення інтенсивності флуоресценції сигнал/шум з мінімальною фонову флуоресценцією (рис. 1.2). Найкращу вибірковість для візуалізації ракових пухлин продемонстрував барвник **IR-783**, із сульфогрупами в N-алкільних бічних ланцюгах, які забезпечують більшу розчинність барвника у водному середовищі, нижчу токсичність, швидке виведення з організму та високі квантові виходи (0,095 в порівнянні з **ICG** (індо-ціаніновий зелений), що має квантовий вихід 0,025). Барвник **IR-783** специфічно поглинається культивованими клітинами раку шийки матки, що дає можливість виявляти пухлинні клітини в клінічних зразках та циркулюючій в організмі крові. Це може використовуватися для візуалізації тканин раку шийки матки [23].

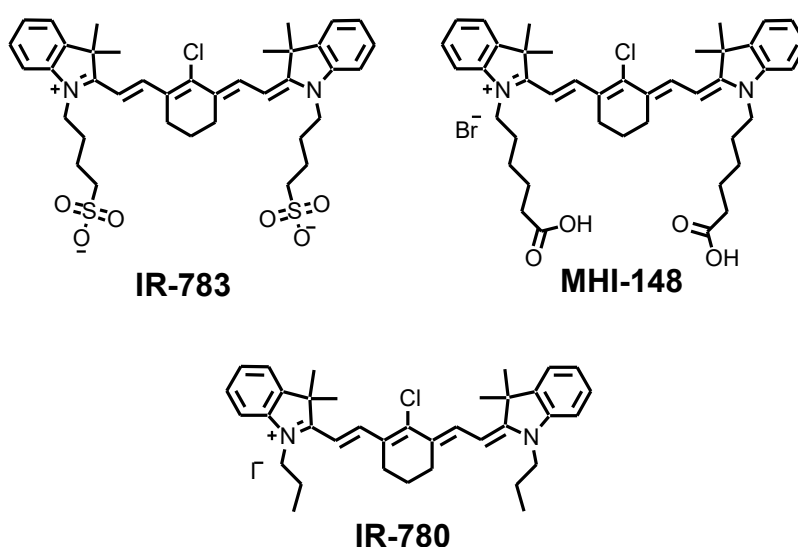


Рис. 1.2 Хімічна структура барвників **IR-780**, **IR-783**, **MHI-148**

N-карбоксиалкільна група барвника **MHI-148** дає змогу конструювати на його основі кон'югати з біологічними молекулами. Слід зазначити що, барвник із 6-вуглецевими алкільними бічними групами при гетероатомі продемонстрував найвищий сигнал при мікроскопічному дослідженні накопичення барвника в ракових клітинах підшлункової залози [25].

Кон'югати на основі поліметинових барвників застосовують для вивчення фармакінетики, розподілу в організмі фармпрепаратів [26] чи біомолекул [27].

Окрім того, кон'югація барвника з лігандом, що здатний до селективного зв'язування з молекулярною мішенню вивчається в стратегії націлювання різних молекул. Як ліганди використовують різноманітні антитіла [28], пептиди [29], фолієву кислоту [30], похідні глюкози [31-33]. Також можливе створення флуоресцентних зондів із селективним націлюванням в результаті нековалентної збірки [34].

Чимало робіт протягом останніх двадцяти років присвячені діагностиці пухлин молочної залози за допомогою барвника індоціанін зелений (**ICG**) як контрастного агенту, оскільки **ICG** є єдиним поліметиновим барвником, дозволений для медичного використання (рис. 1.3) [35-37].

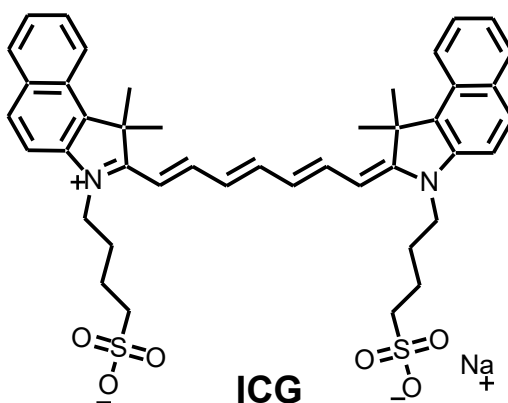


Рис. 1.3 Будова барвника індоціанінового зеленого

Проте цей барвник досить міцно зв'язується з білками плазми крові та швидко виводиться з організму печінкою, що обмежує його ефективність як агента флуоресцентної візуалізації. **ICG** селективно не зв'язується з пухлинами. Через те продовжується дизайн нових сполук на його основі для виявлення пухлин *in vivo* [99, 100]. Зокрема, ведуться спроби модифікації **ICG**, селективними до ракових пухлин, групами. Наприклад, кон'югації його рН-Low Insertion Peptide (pHLIP) – водорозчинним гідрофобним рН-чутливим пептидом, що селективно зв'язується з пухлинами завдяки його високій кислотності. Дослідження даного кон'югату продемонструвало ефективне флуоресцентне виявлення малих, середніх і великих пухлин, що розташовані глибоко в

тканинах. Такі результати дають надію на зменшення резекції краю під час операції [38]. Еберт та його співробітники провели модифікацію структури **ICG** і отримали його гідрофільний аналог, барвник **SIDAG** (рис. 1.4), з незначним зв'язуванням з білками плазми [39].

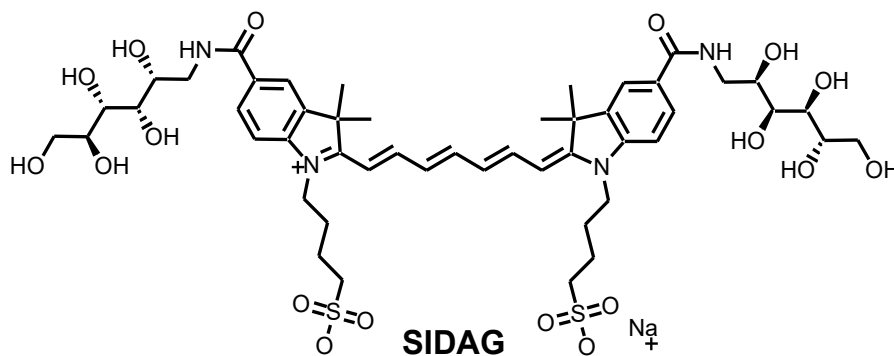


Рис. 1.4 Хімічна структура барвника **SIDAG**

SIDAG продемонстрував інтенсивний сигнал флуоресценції в пухлинній тканині, даючи достатній контраст для її візуалізації. Через низький рівень зв'язування з білками плазми барвник швидко дифундував крізь пори змінених пухлинних судин і, як наслідок, досягав більш глибоких ділянок пухлинної тканини за короткий час. Було виявлено високий флуоресцентний контраст через 24 години, проте його механізм потребує додаткового дослідження [39].

Серед поліметинових барвників ореми класом є мероціанінові барвники. Мероціанінові барвники - це нейтральні несиметричні сполуки, які складаються з двох фрагментів – донора (D) і акцептора (A), що поєднані між собою поліметиновим ланцюгом [40]. Такі барвники можна розглядати як гібрид двох симетричних барвників катіонного та аніонного типу з однаковою довжиною поліметинового ланцюга. Мероціаніни теоретично описують за допомогою суперпозиції трьох основних граничних структур, які відповідають уявним ідеальним станам: неполярний полієн (*a*) та диполярний полієн (*b*), а також ідеальний поліметин (*c*) (рис. 1.5). У випадку слабких донорно-акцепторних властивостей барвник в основному стані наближається до нейтральної структури *a* ідеального полієнового стану. При збільшенні донорних чи акцепторних

властивостей кінцевих груп відбувається збільшення або позитивного або негативного зарядів внаслідок зміщення електронної густини за допомогою поліметинового ланцюга від D до A. При певному підборі D та A усі зв'язки стають полуторними з утворенням структури **б**, яка відповідає ідеальному поліметиновому стану [41-44].

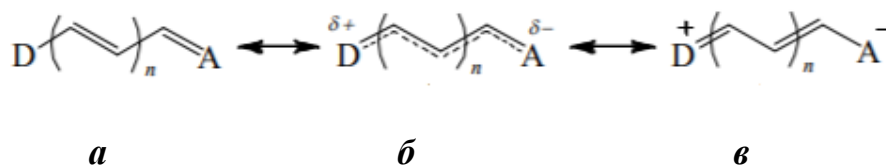


Рис. 1.5 Основні три граничні структури мероціанінових барвників

Подальше зростання донорно-акцепторних властивостей фрагментів D та A приводить до утворення структури **в** з протилежним порядком зв'язків в порівнянні зі структурою **а**: досягається структура полієну із зарядами на кінцевих групах, проте, як і в структурах **а** та **б**, із сумарним нульовим зарядом. Через можливість плавної зміни електронної будови від структури **а** до **в** шляхом підбору D та A, мероціаніни називають донорно-акцепторними полієнами [45]. Можливість резонансної делокалізації в полієновій системі робить мероціанінові барвники чутливими до зміни водневих зв'язків із оточуючим розчинником – явище сольватохромії. Для мероціанінів із граничною структурою між **б** та **в**, поглиблення кольору відбувається під час переходу до неполярних розчинників. Тоді як для структур із проміжним станом між **а** та **б** поглиблення кольору спостерігається у більш полярних розчинниках. При певному підборі донорних і акцепторних груп, а також природи розчинника, можна досягнути стану мероціаніна, що відповідає ідеальному поліметиновому стану. У такому випадку як зменшення так і збільшення полярності розчинника приводить лише до гіпсохромним зсувам смуг поглинання [45].

Оскільки мероціанінові барвники є особливо чутливими до природи розчинника чи середовища, вони знайшли своє використання для побудови порівняльної шкали полярності розчинників та для визначення води в органічних

середовищах [46]. Також, мероціанінові барвники стали перспективними матеріалами в молекулярній біології, як фотосенсибілізатори для фотодинамічної терапії [47], як флуоресцентні зонди для визначення градієнтів полярності біологічних середовищ, зонди полярності мембран [45], як мітки специфічних біологічних сайтів [48].

Зміни в локальній сольватації приводять до змін інтенсивності флуоресценції, а також до зсувів в максимумах збудження та випромінювання. Ці зміни використовують для вимірювання активності цільового білка при кількісній візуалізації живих клітин [49]. Флуоресцентні біосенсиори на основі чутливих до навколишнього середовища мероціанінів вивчали для відстеження ендогенного Cdc42 у живих клітинах. Інтенсивність флуоресценції зростала при зв'язуванні з активованим Cdc42 [50].

Активно проводяться дослідження при використанні нейтральних мероціанінових барвників ближнього інфрачервоного діапазону як зондів для візуалізації *in vivo* β -амілоїдних бляшок. Утворення β -амілоїдних бляшок у головному мозку є однією з патологічних особливостей хвороби Альцгеймера. Існує чимало зондів, що вивчаються для візуалізації β -агрегатів, оскільки це є важливим інструментом для ранньої діагностики хвороби [51]. Серед мероціанінових барвників також проводиться пошук, оскільки дані барвники здатні проникати через гематоенцефалічний бар'єр [52-54]. Шляхом модифікації ціанінового скелета барвника **IR-780** синтезовані нові мероціанінові барвники [52] та їх похідні [53], які демонстрували значне посилення флуоресценції при взаємодії з амілоїдними бляшками внаслідок зв'язування з гідрофобними щілинами фібрил. Барвники подібної роторної структури також використовувалися для моніторингу змін в'язкості ліпідних крапель [55, 56].

В'язкість і полярність розчинника, а також здатність до утворення стійких водневих зв'язків гетероатомами барвника, є важливими факторами при дослідженні флуоресценції мероціанінів. Барвники із слабкими донорами, такими як бензотіазол, бензооксазол, індоленін показали найбільші значення інтенсивності флуоресценції в полярних розчинниках [50], структурна заміна в

положенні 2 барбітурату на селен призвела суттєвого зменшення фотоізомеризації і, відповідно, до зростання флуоресценції [57]. Введення малонітрильного фрагменту як донора, приводить до посилення випромінювання флуоресценції у сильнов'язких середовищах [53]. Окрім того, увага дослідників прикута до вивчення мероціанінів з похідними барбітурової [58-61] та тіобарбітурової кислоти [60-63], індадіону [64, 65], піразолідіндіону [66], триціанофурану [67].

Скварайнові (скварилієві) барвники, які є продуктами конденсації квадратної кислоти з багатими на електрони гетероциклами, являють собою сімейство сполук, які знайшли широке застосування в галузі фотоніки завдяки своїм унікальним властивостям, а саме різкому та інтенсивному поглинанню у видимому та ближньому інфрачервоному діапазоні, високим молярним коефіцієнтам екстинкції та високим квантовим виходам флуоресценції [68-70]. Електронну будову скварайнів можна записати у вигляді граничних структур (рис. 1.6). За рахунок того, що дипольний момент структур *в*, *г* менше за *а* та *б*, скварайновим барвникам притаманна слабка від'ємна сольватхромія [71-73].

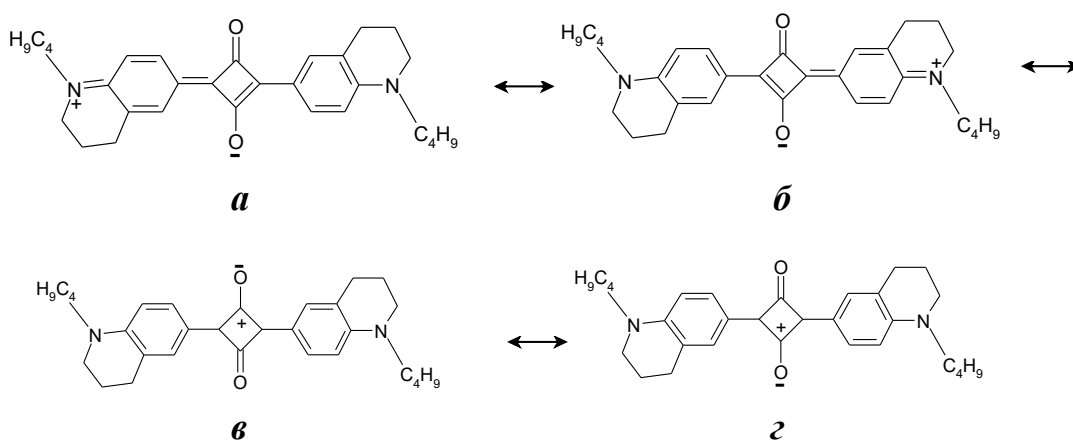


Рис. 1.6 Основні граничні структури скварайнових барвників

Встановлено, що введення диціанометилєну [74] замість центрального атома Оксигєну в квадраті та галогєнів в гетероциклічні фрагменти [75] приводить до помірного батохромного зсуву в спектрі поглинання, а найбільші квантові виходи мають барвники з бензоксазоловим гетероциклічним фрагментом [76].

Включення сульфонатних та карбоксильних груп покращує розчинність сквараїнів у воді [77] та робить їх здатними до подальшої кон'югації з біомолекулами [78] та націлюючими лігандами [79]. Завдяки своїй цвіттерйонній будові, молекули сквараїнів є більш полярними, ніж аналогічні за будовою катіонні барвники [7]. Тому для них характерним є утворення агрегатів в полярних розчинниках. І навпаки, в гідрофобному оточенні чи неполярному середовищі, квантові виходи флуоресценції зростають, що робить їх перспективними флуоресцентними зондами.

1.2 Взаємодія поліметинових барвників з альбумінами

Сироватковий альбумін є найбільш поширеним білком у крові. Взаємодія альбумінів з лігандами вивчалися завдяки використанню з клінічною, біологічною чи фармацевтичною метою. Людський сироватковий альбумін (HSA) демонструє високу стабільність і здатність зв'язування різноманітних лікарських речовин. Зміна концентрації альбуміну в крові, як її зменшення, так і зростання, вказує на ряд захворювань таких як ниркова недостатність, гіпертонія, цукровий діабет та ін. [80, 81]. Сироватковий альбумін бика (BSA), який є гомологом HSA, використовується у фармакокінетичних та афінних тестах ліків як альтернатива HSA.

Здатність альбуміну зв'язуватися з органічними сполуками залежить від тривимірної структури сайтів зв'язування в біомолекулі. Білок HSA є одним із основних білків-переносників в організмі та складає приблизно половину білка, який є в крові людини. Його структура утворена одним поліпептидним ланцюгом, який організований у три домени, кожен з яких складається з двох субдоменів А і В [82]. HSA містить численні сайти зв'язування лігандів, але загальновизнано, що органічні ліганди зв'язуються в областях, які розташовані в гідрофобних порожнинах субдоменів ІА та ІІА: сайт І та сайт ІІ. Спорідненість зв'язування із сайтом І (або сайтом варфарину), в основному відбувається через гідрофобну взаємодію, переважає зв'язування великих гетероциклічних і

негативно заряджених сполук (рис. 1.7). Тоді як сайт II (або сайт індол-бензоіазепіну) включає комбінацію гідрофобних, водневих зв'язків та електростатичних взаємодій і є кращим місцем зв'язування малих ароматичних карбонових кислот [83].

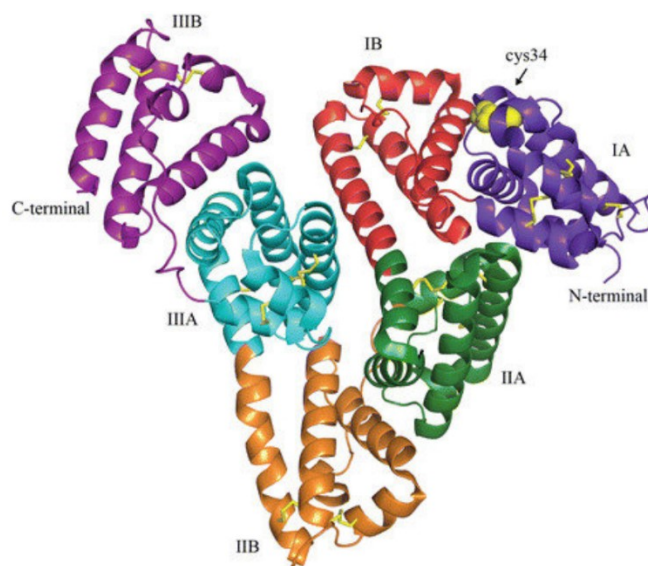


Рис. 1.7 Структурна будова людського сироваткового альбуміну

Наприклад, флубіропрофен арилпропіонової кислоти в основному зв'язується із сайтом II, тоді як його метиловий ефір переважно розташовується в сайті I [83]. Альбумін може зв'язуватися з декількома лігандами в різній мірі і сила зв'язування сполуки може варіюватися від дуже сильної до слабкої залежно від афінності зв'язування.

При взаємодії поліметинових барвників із альбуміном в більшості випадків відбувається зростання інтенсивності флуоресценції барвників. Розглядають два механізми взаємодії: гідрофобні при фіксуванні молекули барвника в гідрофобній кишені протеїну та електростатичні за рахунок створення йонних пар між зарядженими групами барвника та амінокислотами білка. Вцілому HSA має загальний негативний заряд (його $pK_a \approx 5,4$ [84]) при фізіологічних значеннях pH і демонструє високу розчинність у воді завдяки наявності на поверхні великої кількості іонізованих груп.

Якщо обговорювати застосування барвників до візуалізації та накопичення в пухлинах, потрібно брати до уваги фармакінетику процесу їх доставки до клітин. Основними факторами, що впливають на процес розподілення барвників в тканинах є структура тканин, рН середовища і здатність барвника зв'язуватися із макромолекулами [85]. При потраплянні у плазму крові барвник переміщується разом із кров'ю і на його розподіл може вплинути його зв'язування з білками плазми. Взаємодії білок–ліганд відбуваються переважно в результаті гідрофобних сил, водневих зв'язків і сил Ван-дер-Ваальса. Через високу молекулярну масу білків плазми, зв'язані з ними барвники не можуть проникати крізь стінки капілярів. Отже, фракція барвників, що зв'язана з білками плазми, не одразу доступна для розподілу в позасудинний простір [86]. Взаємодія хімічної речовини з білками плазми є зворотнім процесом. Проникнення в клітину і повернення в плазму можливе лише для речовин, які не зв'язані. Сполуки кислотного характеру зв'язуються з альбуміном, що присутній як в плазмі, так і в тканинах, тоді як основні – утворюють зв'язки з кислотними залишками α -глікопротеїнів і ліпопротеїнів.

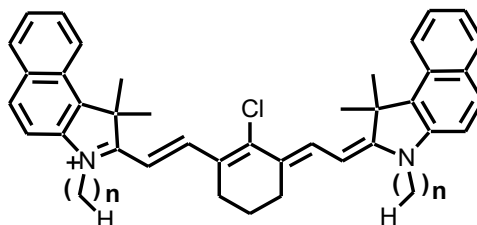
Здатність барвників поглинатися і накопичуватися в пухлинах пов'язують із зв'язуванням барвників з поліпептидами, що транспортують органічні аніони (ОАТР), які надмірно експресуються в різних типах пухлин, включаючи карциноми легенів, мозку та в гіпоксичному мікрооточенні ракових клітин [87]. Також активно вивчається роль людського альбуміну у накопиченні та персистенції барвників у пухлині. Так, Усама та співавтори наводять дані, які свідчать про те, що поглинання барвників опосередковується скоріше рецепторами альбуміну, ніж ОАТР [88]. Ковалентні і нековалентні комплекси з альбуміном проникають в клітини пухлин через рецептори альбуміну, що надмірно експресовані в ракових клітинах [89]. Разом з тим, ковалентні аддукти альбуміну накопичуються в пухлинній тканині завдяки ефекту ЕПР (Enhanced Permeability and Retention), тобто полегшеному проникненню та накопиченню частинок у пухлинах за рахунок пасивної дифузії через характерні для пухлин капілярні пори збільшеного розміру, та утримуються протягом деякого часу. Про

це свідчать роботи з дослідження накопичення міченого альбуміну в пухлинах [90-92]. Беручи до уваги високу концентрацію HSA у плазмі, афінність зв'язування органічних молекул з HSA є важливим фактором, який слід враховувати при проектуванні та розробці нових флуорофорів [93], оскільки така взаємодія впливає на кінцеву фармакінетику і, відповідно, на біологічний розподіл.

Поглиблене вивчення взаємодії між альбуміном і барвниками має важливе значення для розробки покращених методів та засобів флуоресцентної візуалізації. Необхідно враховувати, що в більшості випадків утворення комплексів білок-барвник супроводжується зміною спектрально-люмінесцентних властивостей барвників [94]. Зокрема, зв'язування з альбуміном перешкоджає їх агрегації барвників та сприяє збільшенню квантового виходу [95]. Тому чимало робіт присвячено дослідженню впливу молекулярної структури барвників на зв'язування з альбумінами та дослідженню фармакінетики комплексу барвник-білок [25, 96, 97]. Зв'язування **ICG** з білками плазми крові, в першу чергу з β -ліпопротеїнами, відбувалося за його низьких концентраціях у дослідженнях із використанням колонкової хроматографії. Тоді як у більш високих концентраціях барвник зв'язувався з усіма фракціями білків [98]. Оскільки **ICG** має як ліпофільні, так і гідрофільні властивості, він також проявляв оборотне зв'язування з альбуміном і глобулінами сироватки, такими як альфа1-ліпопротеїнами. На відміну від вільного барвника, комплекс, утворений **ICG** з цими білками, поводить як макромолекула [35].

В роботі [25] досліджений вплив довжини N,N'-алкільних бічних груп модифікованого барвника **MNI-148** на зв'язування з транспортними білками та поглинання пухлинами. Показано, що короткі алкільні ланцюги перешкоджають взаємодії з білками, тоді як довгі замісники змінюють гідрофобність і жорсткість структури отриманих сполук, впливаючи на їх утримання раковими клітинами. Схожі результати отримані в роботі японських вчених [97], що вивчали вплив довжини N,N'-алкільних бічних ланцюгів похідних барвника **IC7-1** на біологічний розподіл зонду у пухлинах пацієнтів. Для цього були синтезовані

ціанінові барвники з різною довжиною (від 1 до 7) метиленових груп в бічних ланцюгах (рис. 1.8), що забезпечило широкий діапазон ліпофільності і зв'язування із сироватковим альбуміном:

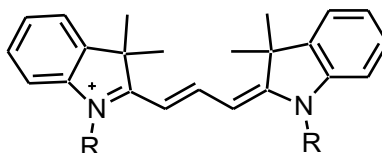


IC7-1-Me ($n=1$); **IC7-1-Et** ($n=2$); **IC7-1-Pr** ($n=3$);
IC7-1-Bu ($n=4$); **IC7-1-Pe** ($n=5$); **IC7-He** ($n=6$).

Рис. 1.8 Хімічна структура барвника **IC7-1** та його аналогів

Мікроскопія клітин показала, що краще поглинаються барвники з короткими бічними ланцюгами біля атома Нітрогену, тоді як вищу інтенсивність флуоресценції при дослідженнях *in vivo* спостерігали для похідних барвників, що мали алкільні ланцюги середньої довжини ($n=3-5$). Для останніх продемонстровано специфічне зв'язування з альбуміном із високими константами зв'язування.

На прикладі триметинціанінів **2-4** (рис. 1.9) показано, що розмір замісників при гетероатомі впливає на зв'язування із людським альбуміном, зокрема заміна N,N'-етильних груп на бутильні чи фенілпропільні спричинює зростання констант зв'язування з альбуміном, проте у випадку барвника **4** виникає стерична перешкода у взаємодії з білками [90]:



2, $R = C_2H_5$; **3**, $R = C_4H_9$; **4**, $R = (CH_2)_3Ph$

Рис. 1.9 Хімічна структура триметинціанінових барвників

Проводилися дослідження впливу зміни гідрофобності барвників на здатність зв'язуватися з білками плазми і, відповідно, на їхні фармакінетичні властивості [101]. Для цього були синтезовані несиметричні ціанінові барвники, що відрізнялися кількістю груп сульфокислоти ($n = 1 - 4$). Константа зв'язування найбільш гідрофобного барвника, що містив одну сульфогрупу в структурі ($n = 1$), із сироватковим альбуміном бика (BSA) була у 18 разів більша, ніж у найбільш гідрофільного барвника ($n = 4$). Додавання однієї сульфогрупи в структуру призводило до зменшення константи зв'язування приблизно в 2-3 рази [101].

Чимало робіт присвячено вивченню взаємодії сквараїнових барвників із сироватковими альбумінами. Зокрема, селективне зв'язування сквараїнового барвника **5** із BSA використовували для моніторингу ендоцитозу бичачого альбуміну в живих клітинах у режимі реального часу [102], а нековалентні комплекси його аналога **6** із людським альбуміном досліджували як перспективний реагент для флуоресцентного визначення білків (рис. 1.10) [103].

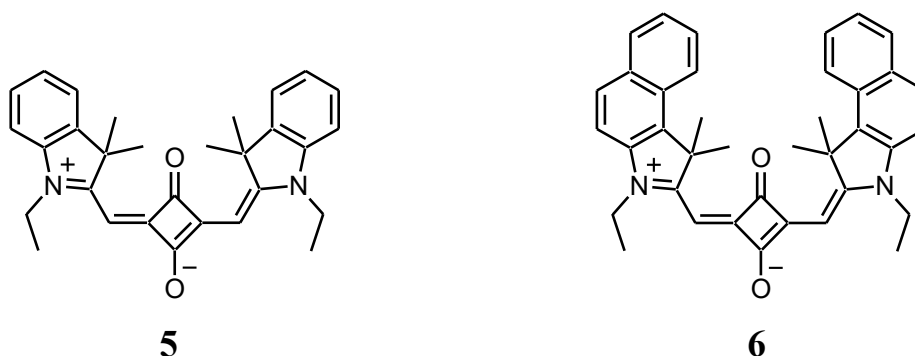


Рис. 1.10 Хімічні структури сквараїнових барвників **5** та **6**

Для здійснення контрольованої фармакінетики розробляють флуоресцентні зонди для візуалізації шляхом як ковалентної кон'югації з барвником, так і супрамолекулярної інкапсуляції. Нековалентна взаємодія сквараїнових барвників з BSA сприяла 10-кратному зростанню інтенсивності флуоресценції та збільшення часу життя флуорофорів з 0,32 нс до 3,7 нс. Утворені наноконплекси барвник-білок були використані як зонди для внутрішньоклітинної візуалізації [104].

Для барвників, що містять Хлор в мезо-положенні зазначається можливість ковалентного зв'язування, серед якої і зв'язування з альбумінами [15, 105]. Так, для **МНІ-148** та його аналогу, що містить фенільну групу замість атому Хлору, були проведені дослідження з поглинання та флуоресценції при взаємодії з розчином HSA. Для обох барвників був виявлений характерний зсув максимуму поглинання в довгохвильову область, що свідчить про нековалентну взаємодію з альбуміном. Проте, для **МНІ-148** з атомом Хлору спостерігалось з часом повільне гіпсохромне зміщення від 805 до 791 нм, ймовірно пов'язане з утворенням ковалентного комплексу альбуміну з барвником [88]. Широко досліджується вплив мезо-замісників на спектральні властивості барвників, а також їх взаємодія із нуклеїновими кислотами та білками [90]. При розгляді спектральної поведінки тіокарбоціанінових барвників, що містять в поліметиновому ланцюзі мезо-замісники показана наявність цис- і транс-ізомерів, що знаходяться в термодинамічній рівновазі. На зміщення цієї рівноваги у бік флуоресцентних транс-ізомерів може впливати мікрооточення барвників. Барвники даного типу запропоновані як зонди для детекції нуклеїнових кислот та для виявлення альбумінів [90].

Кон'югати на основі поліметинових барвників із лікарським засобом потребують мінімальної взаємодії із транспортними білками [28, 106], щоб уникнути швидкого виведення з організму. В ряді робіт показано, що одним з ключових факторів впливу на зв'язування барвників з альбумінами є розподілений по поверхні флуорофору заряд. Виявлено, що катіонні +2 (**ZW800-3a**) та аніонні -4 (**CW800**) барвники неспецифічно поглинаються в різних органах (рис. 1.11). При чому аніонний барвник демонстрував значну екскрецію в жовч з високим флуоресцентним сигналом по всьому шлунково-кишковому тракту, катіонний розподілявся в печінці, кишечнику та в нирках. Тоді як цвіттерйонна молекула **ZW800-1** виводилася виключно нирками без помітного неспецифічного фонового сигналу в тканинах та інших органах.

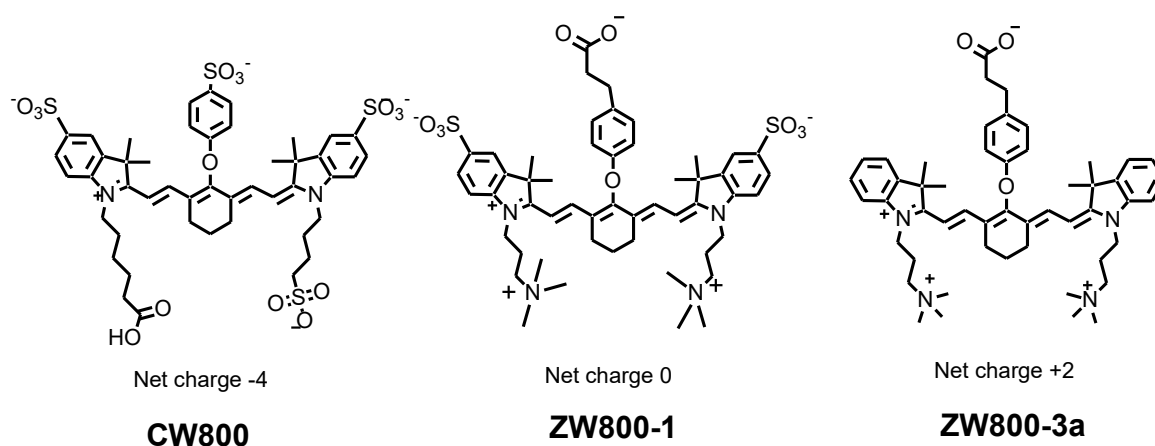


Рис. 1.11 Хімічні структури барвників із різним сумарним зарядом на поверхні

Припускають, що цвіттерйонні молекули мінімізують взаємодію із сироватковими білками через внутрішню скомпенсованість зарядів [107].

Негативним наслідком взаємодії білок-барвник може бути утворення неспецифічної флуоресценції, яка маскує специфічний сигнал від аналіту чи заважає аналізу даних при використанні донорно-акцепторних пар з ефектом гасіння, а також дає неконтрольовану фармакінетику [105]. Окрім того, зв'язування з альбумінами часто призводить до швидкого вивільнення барвника з організму.

1.3 Поліметинові барвники як фотосенсибілізатори для фотодинамічної терапії

Фотодинамічна терапія (ФДТ) – неінвазійний терапевтичний метод лікування пухлин, що проводиться в безпосередній локації світлопоглинаючого фотосенсибілізатора [108]. Історична першість PS належить сполукам порфіринового ряду. До теперішніх часів проводяться розробки та модифікації похідних порфірину, оскільки досі залишається не розв'язаною ціла низка проблем, що пов'язана з їх використанням, зокрема, темнова токсичність, нестабільність. Більшість клінічно схвалених фотосенсибілізаторів (ФС) – це сполуки порфірійного ряду, що характеризуються генерацією синглетного

Оксигену при опроміненні світлом з довжиною хвилі, специфічною для фотосенсибілізатора. Основний механізм дії ФС полягає у проходженні фотодинамічної реакції (ФДР), при цьому ФС фотозбуджується до синглетно-збудженого стану (наприклад S1) з подальшим міжсистемним перетинанням (ISC) та утворенням триплетно-збудженого стану (T1). Далі, завдяки триплет-триплетному переносу енергії можливе утворення синглетного Оксигену (тип II) або утворення радикалів та інших активних форм Оксигену (АФО) (наприклад, супероксид-радикальний аніон) (тип I) [109]. Обидва типи передбачають присутність Оксигену, водночас схильність до проходження реакцій за I чи II типом залежить від рівня Оксигену та від типу субстрату. Проникнення світла залежить від оптичних властивостей тканини та довжини хвилі світла, що використовують. Зокрема, використання спектрального діапазону або так званого «фототерапевтичного вікна» (600 – 1300 нм), є важливою умовою при створенні нових ФС. Пошук нових ефективних ФС також зосереджується на їх низькій темновій токсичності та вибіркоvim накопиченням у пухлинній тканині. Поліметинові барвники мають значний потенціал для функціоналізації під різноманітні умови використання у медико-біологічних застосуваннях. Наприклад, можуть бути функціоналізовані гідрофільними, гідрофобними, ліпофільними, ліпофобними і амфіфільними групами. Однак слід зазначити, що значення квантових виходів генерації $^1\text{O}_2$ у ПБ значно нижче, ніж похідних порфірину. Це пов'язано з тим, що у поліметинах основним каналам дезактивації електронно-збудженого стану є фотоізомеризація, яка відбувається на декілька порядків швидше, ніж заборонена інтеркомбінаційна конверсія [110-113]. Тому триплетний стан у ПБ заселяється недостатньо, щоб ефективно сенсибілізувати синглетний Оксиген. Для вирішення цієї проблеми розроблені різні модифікації структури ПБ. Одна з найбільш поширених базується на введенні в структуру важких атомів, які посилюють спін-орбітальну взаємодію, а відповідно інтеркомбінаційну конверсію.

Основними вимогами для створення ефективного фотосенсибілізатора є:

- високий коефіцієнт молярної екстинкції в діапазоні робочої смуги поглинання світла.
 - інтенсивне поглинання світла у вікні прозорості тканин, тобто у діапазоні довжин хвиль 650-1200 нм, оскільки глибина проникнення світла збільшується у напрямку від видимого до ближнього ІЧ діапазону спектра.
 - висока інтенсивність флуоресценції, яка дозволить використовувати флуоресцентні ознаки злоякісних або передракових утворень замість гістологічної діагностики, а також контролювати процес лікування;
 - ефективна генерація кисневих або некисневих активних форм, що здатні руйнувати онкоклітини;
 - мати низьку темнову цитотоксичність і високу фототоксичність. Для цього електронний перехід барвника, який збуджується під дією світла, повинен значно перевищувати по інтенсивності інші електронні переходи і відстояти від них на достатній відстані, щоб мінімізувати шкідливе поглинання;
 - мати здатність накопичуватися в пухлині порівняно зі здоровими тканинами.
- Це один із найважливіших аспектів вибіркової дії ФДТ.

Серед поліметинових барвників відомим і найбільш дослідженим є фотосенсибілізатор на основі мероціанінового барвника - **МС 540** (рис. 1.12).

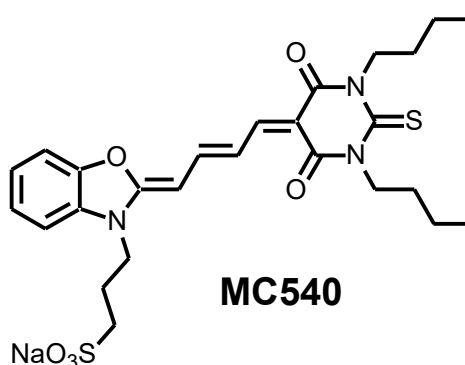
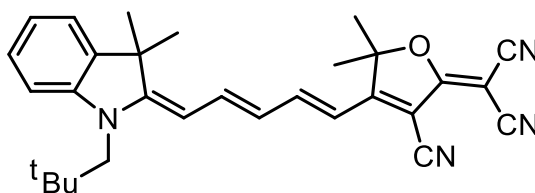


Рис. 1.12 Хімічна структура барвника **МС 540**

Барвник успішно досліджувався на тваринних моделях аутологічної трансплантації кісткового мозку для усунення клітин лейкемії або нейробластоми з імітованих аутологічних трансплантантів кісткового мозку

[114]. Крім того, мероціаніни прекрасні зонди полярності біомембран. На їх основі розроблені унікальні зонди, що можуть вибірково реагувати на універсальні або специфічні (нуклеофільну і електрофільну) сольватацію [115]. До недоліків групи мероціанінів можна віднести максимальне поглинання світла за межами ближнього ІЧ діапазону спектра. Ця проблема сьогодні вирішена розробкою нового типу мероціанінів на основі триціанофурану, які інтенсивно поглинають і люмінесціюють у терапевтичному вікні, наприклад, **МС-6ТСФ** ($\lambda_{\text{amax}} = 812 \text{ нм}$, $\varepsilon = 22.1 \times 10^4 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$, $\lambda_{\text{fmax}} = 840 \text{ нм}$, $\Phi_f = 22\%$ в ДМФА) (рис. 1.13) [116]:



МС-6ТСФ

Рис. 1.13 Хімічна структура барвника **МС-6ТСФ**

Ще один недолік – невисокі значення виходу $^1\text{O}_2$. Для покращення цього аспекту є широке коло структурних модифікацій мероціанінів. Мероціаніни викликають перекисне окиснення фосфоліпідів у мембрані [117], що індукує некроз та обмежує ефективність ліків. Однак дослідження мероціанінів для лікування раку не припиняється. Так, застосування мероціаніну **MCRh** для лікування лейкемії виявило зниження життєздатності ракових клітин K562 [118]. Крім лікування раку, мероціаніни також застосовують для антимікробної терапії (рис. 1.14) [119].

Встановлено, що мероціаніни виявляють імунорегуляторні властивості [120]. ФДТ з **МС540** у мишачих гемопоетичних стовбурових клітинах миші показало, що чутливість клітин до мероціаніну визначається барвником зв'язування з клітинами-мішенями. Спорідненість зв'язування знижується у зрілих лімфоцитах і підвищується у гемопоетичних стовбурових клітинах.

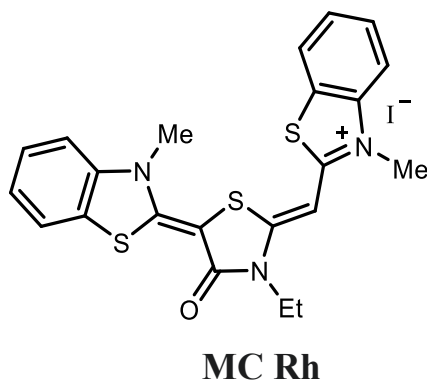
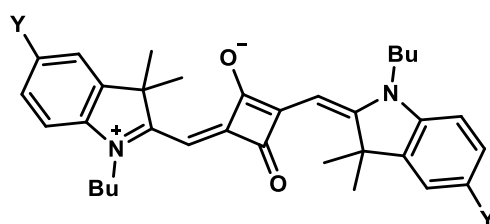


Рис. 1.14 Хімічна структура барвника **MCRh**

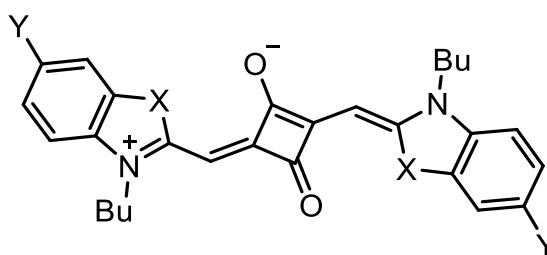
Окрім мероціанінових барвників, як фотодинамічні агенти широко досліджуються представники сквараїнового ряду. Сквараїни характеризуються значною фото- і термостійкістю, високими значеннями молярної екстинкції і досягають діапазону поглинання світла 1000 нм. Ці властивості зробили їх привабливими для біомедичних застосувань, у тому числі як сенсibilізатори для ФДТ. Введення важких атомів, зокрема, йоду, індукують вироблення значної кількості синглетного Оксигену, що призводить до опосередкованого мітохондріями апоптичного руйнування пухлини [121]. У індоленінових сквараїнів **7 – 9** (рис. 1.15) здатність до генерації синглетного Оксигену зростає зі збільшенням атомної маси галогену [122], бутильні групи при цьому сприяють збільшенню розчинності і проникненню крізь біологічні мембрани.



7 Y = H; **8** Y = Br; **9** Y = I

Рис. 1.15 Будова індоленінових сквараїнових похідних

В наступній серії сквараїнів заміна ізопропіліденової групи барвника **10** атомами S (ПБ **11**) і Se (ПБ **12**) (рис. 1.16) підвищує генерацію синглетного Оксигену і ФДТ активність [122,123]:

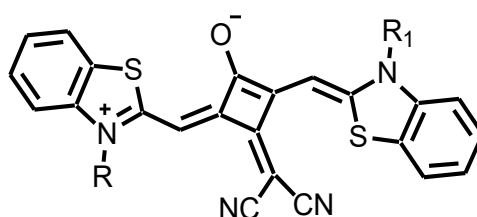


10, $X = C(CH_3)_2$, $Y = H$; **11**, $X = S$, $Y = H$;

12, $X = Se$, $Y = H$; **13**, $X = Se$, $Y = I$

Рис. 1.16 Будова сквараїнових похідних барвника **10**

Максимальний ефект досягається при комбінації двох важких атомів: у катіонному хромофорі атому Se, а у аніонному – I (ПБ **13**) [124]. Цікаво що барвник **10** ефективно генерував 1O_2 в порівнянні зі стандартом - метиленовим синім, хоча в його структурі відсутні важкі атоми [125]. Ймовірно така здатність сквараїну є наслідком ефекту взаємодії катіонного і аніонного хромофорів. Ця їх взаємодія відзначалася на прикладі ковалентно зв'язаних таких хромофорів у катіон-аніонних барвників [126, 127], а також у незв'язаних хромофорів в йонних парах катіон-аніонних барвників [128]. Взаємодія хромофорів приводить до зближення S_1 і T- рівнів, і, відповідно, до зростання ймовірності інтеркомбінаційної конверсії. Її зростанням можна пояснити таку ж активність у диціанометиленових аналогів **14** - **17** сквараїну **11** (рис. 1.17) [129,130]:



14, $R = R_1 = Me$; **15**, $R = R_1 = (CH_2)_3COOMe$;

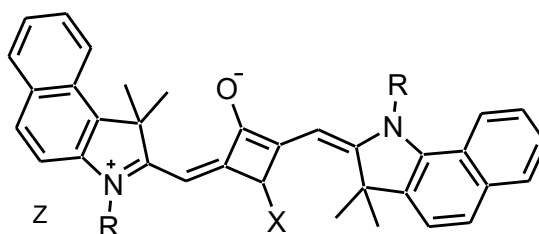
16, $R = Me$, $R_1 = (CH_2)_3COOMe$; **17**, $R = R_1 = (CH_2)_3SO_3^-$

Рис. 1.17 Будова диціанометиленових сквараїнів

Вони, як і типові сквараїни, характеризується високою інтенсивністю поглинання і флуоресценції. Заміна атома Оксигену на діціанометиленову групу приводить до батохромного зсуву смуг поглинання і флуоресценції за рахунок

подовження хромофора, що збільшує глибину зондування тканин порівняно з аналогічним сквараїном. Усі сполуки проявили дуже низьку темнову цитотоксичність, але виявляли різну фотоцитотоксичність за рахунок генерації $^1\text{O}_2$ у порядку **15**, **16**, **14**, **17**, що узгоджується з глибиною поглинання клітинами цих сполук. Експерименти *in vivo* у моделі підшкірного ксенотранспланта миші під опроміненням лазером 690 нм показали, що диціаноскваїн **15** повністю інгібує ріст злоякісних клітин шляхом як некрозу, так і апоптозу, що свідчить про високу ефективність його як фотосенсибілізатора PDT. Одним з його обмежень є відсутність націлювання на пухлину. Проте результати *in vitro* показали, що висока ефективність ФДТ барвника **15** в основному визначається його диціанометилензаміщеним ядром. Бічні ланцюги впливають на фармакокінетичні властивості. Тому шляхом модифікування такими ланцюгами та іммобілізацією за допомогою націлюючих агентів, наприклад, фолієвої кислоти, гефітинібу, RGD пептиду, антитіл та наночастинок, на основі диціанометилензаміщених сквараїнових барвників можна отримати ефективні ФС для ФДТ.

Модифікація вихідних барвників **18** та **19** піколіл та дипіколіламіногрупами сприяла зростанню темної токсичності, тоді як значення IC_{50} після опромінення світлом визначено від 0,15 до 2 μM , в залежності від клітинної лінії, що у 8-24 разів вище, ніж темнова токсичність (рис. 1.18) [131].



18, $\text{X} = \text{O}^-$, $\text{Z} = -$, $\text{R} = \text{CH}_2\text{CH}_3$,

19, $\text{X} = \text{O}^-$, $\text{Z} = -$, $\text{R} = (\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$

Рис. 1.18 Будова барвників **18** та **19**

Сильний ефект спін-орбітальної взаємодії спостерігався при заміні атома Оксигену в аніонному хромофорі атомом Сульфуру (тіосквараїн **20**) [132]. Звісно, що останній, як важкий атом, вносить певну долю в IST-конверсію (рис. 1.19). Важкий атом значно впливає на взаємодію хромофорів за рахунок зближення їх діапазонів поглинання і зростання сили осцилятора аніонного хромофора при такій заміні. Квантово-хімічний аналіз показує, що при поглинанні кванту світла у барвника **20** відбувається інверсія безвипромінювального $\pi\pi^*$ і випромінювального $\pi\pi^*$ нижчих електронних станів.

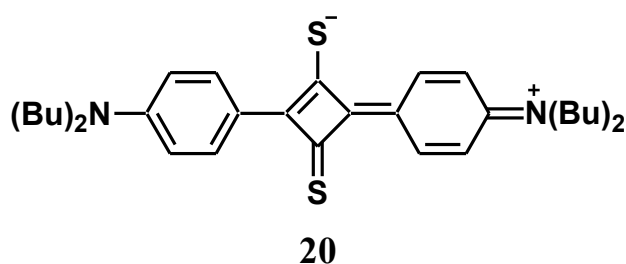


Рис. 1.19 Будова тіосквараїну **20**

Це значно зменшує енергію синглет-триплетного розщеплення і збільшує час життя збудженого стану. Наслідком цього є сильне підвищення квантового виходу в триплет і генерації синглетного Оксигену практично до 100% [132].

Слід зазначити, що присутність важкого атома не завжди впливає на фотодинамічний ефект [12, 122]. Так, у роботі [12] повідомляють про синтез і спектроскопічні характеристики бромзаміщених бензіндопентаметинціанінів із N-алкільними замісниками різної довжини при гетероциклічному атомі Нітрогену. Показано, що ці ПБ здатні генерувати реактивні види Оксигену в незалежності від присутності галогену в структурі. Автори припускають, що така поведінка пов'язана з глибиною локалізації PS у біомембрані, яка визначається довжиною N-алкільних ланцюгів при атомі Нітрогену в гетероциклі. Про схожі результати повідомляється в роботі [122]. Крім того, фотодинамічна активність похідних сквараїнових барвників із галогенами залежить від положення останніх у гетероциклі. Вона сильніше виражена для барвників із атомами Броду та

Йоду при четвертому атомі Карбону в гетероциклі, ніж при другому, ймовірно, через відмінність в ліпофільності структур. Ліпофільність впливає на характеристики лікарських засобів, сприяючи їх розчинності та проникності через біологічні мембрани. Також останніми роками проводиться пошук безатомних триплетних ФС із малими органічними молекулами, з довшим часом життя в триплетному стані, оскільки вони є більш ефективні в сенсibilізації синглетного Оксигену в гіпоксичному мікрооточенні пухлинної тканини. Такі триплетні ФС можуть базуватися на спин-орбітальному переносі ISC, ISC посиленому радикалами та інше.

Окрім будови, на ефективність фотосенсibilізатора також впливає їх внутрішньоклітинний розподіл. Зокрема помічено, що цільове розташування в лізосомах та мітохондріях приводить до зростання терапевтичної дії [133, 134]. Роль мітохондріально-націленої терапії раку у ФДТ виявилася більш ефективною, ніж інші подібні ненацілені методи, оскільки мітохондрії відіграють ключову роль у регуляції апоптозу та виробляють більшу частину енергії клітини [133]. Мітохондрії можуть бути використані як маркери раку через їх високий трансмембранний потенціал. Роль мітохондрій у протипухлинному підході досягається шляхом націлювання на їх метаболізм (гліколіз і цикл Кребса), також на апоптоз і гомеостаз ROS. Націлені на мітохондрії сенсibilізатори відіграють вирішальну роль у подоланні фактора гіпоксії, що забезпечує високу терапевтичну ефективність. Тому багатьма науковими групами розробляються нові фотосенсibilізатори із селективністю до мітохондрій. Так, заміна атома Хлору у **IR-780** на дифторид бору підвищує фотостійкість барвника, призводить до накопичення в мітохондріях та до апоптозу ракових клітин [135]. До структури ФС вводять також гуанідинієві чи бісгуанідинієві [133], трифенілфосфінові групи [136] та ін. для збільшення делокалізованого позитивного заряду та підвищення ліпофільності сполук (рис. 1.21).

У розроблених ФС на основі ПБ **21-26**, мезо-положення кон'юговано з похідним трифенілфосфонію для націлювання на мітохондрії, N-алкільний

бічний ланцюг модифікований для регулювання зарядового балансу та розчинності, а індоленінові ядра бромовані для посилення генерація ROS після лазерного опромінення. ПБ **21** - **23** підвищують ефективність лікування раку, завдяки ліпо-катіонним властивостям трифенілфосфонію з одного боку. З другого боку за рахунок чутливості мітохондрій до ROS, у відповідь на яку мітохондрії вмикають апоптичний протипухлинний процес. Ці результати одержані *in vitro* та *in vivo*, що свідчить про значний потенціал ПБ **21** – **23** як PS для ФДТ.

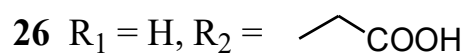
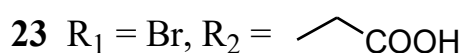
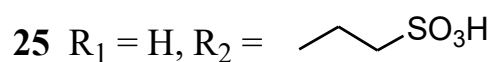
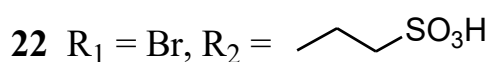
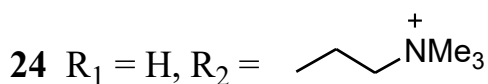
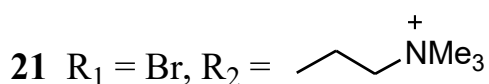
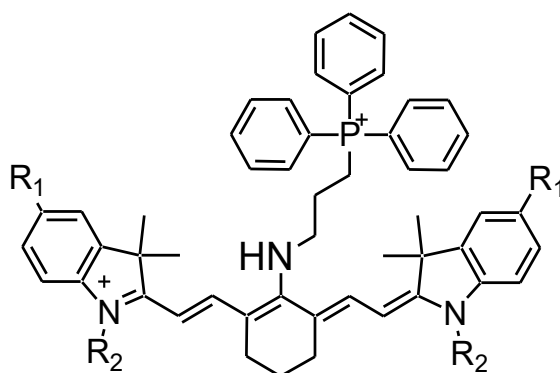


Рис. 1.21 Будова мітохондріально націлених барвників **21** – **26**

В роботі [137] описані барвники **27** і **28** на основі мероціаніну з трифенілфосфонієвою групою, яка націлена на мітохондрії (рис. 1.22). У водному розчині обидва барвники демонстрували високу чутливість до pH середовища, а також здатність до самозбірки з утворенням наночастинок розміром 1,5 нм, наймовірніше J-агрегатів. На це вказує батохромний зсув смуги поглинання, сильне звуження, зростання інтенсивності і практично

резонансне співпадіння зі смугою флуоресценції при збільшенні концентрації.

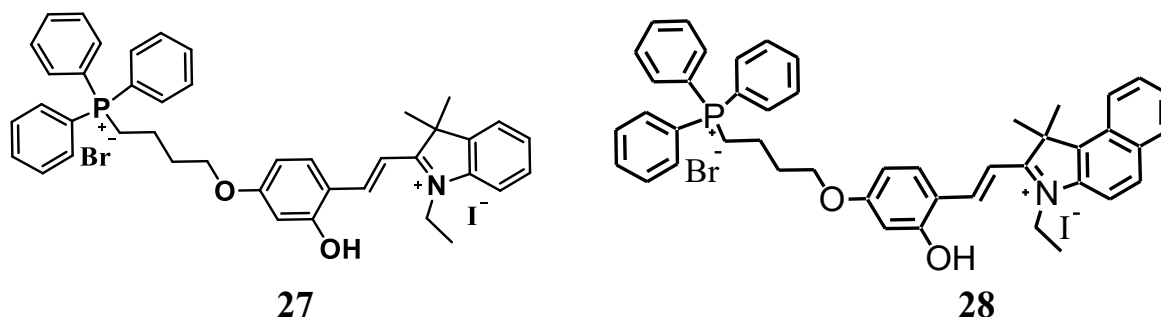


Рис. 1.22 Будова барвників **27** та **28**

При цьому ПБ **25** має сильніший флуоресцентний сигнал при конфокальному зображенні клітин. Тести на життєздатність клітин продемонстрували підвищений рівень цитотоксичності обох сполук для ракових клітин, тоді як нормальні клітини піддавалися їх цитотоксичному впливу лише при високих концентраціях. Це пояснюється тим, що ракові клітини мають більш високий потенціал мітохондріальної мембрани. Тому зонди, що націлені на мітохондрії, накопичуються більше в ракових клітинах, внаслідок чого виявляють сильніший токсичний ефект.

1.4 Вплив взаємодії барвників із альбумінами на їх фотодинамічні властивості

Розподіл у крові та зв'язування з білками плазми може впливати на фармакокінетику та на протипухлинну ефективність фотосенсибілізаторів у клінічній фотодинамічній терапії. Пряме знищення клітин залежить від вибіркового накопичення достатньої кількості ФС в пухлині. Розподіл і утримання сенсibilізатора в пухлині залежить від фізико-хімічних властивостей ФС [138]. Наприклад, ліпофільні фотосенсибілізатори поглинаються неопластичними клітинами частково через рецептор-опосередкований шлях і зв'язуються переважно з клітинними мембранами. Тому фотоактивація цих

препаратів може призвести до прямого знищення клітин. Навпаки, гідрофільні сенсibilізатори, такі як три- і тетрасульфати порфіринів і фталоціанінів, нековалентно зв'язуються з білками плазми (альбумін і глобуліни) і згодом локалізуються в стромі судин та пухлинних тканинах [140]. Фотоактивація таких ФС спричиняє пошкодження мікроциркуляторного русла, призводить до стазу судин і інфаркту пухлини (непряме знищення клітин). Альбуміни крові можуть покращувати пасивну пухлинну селективність препарату головним чином за рахунок ефекту проникнення та утримання (ЕПР). Значна кількість робіт пов'язана із здатністю барвників нековалентно зв'язуватися із сироватковими альбумінами, що може бути одним із засобів транспортування і розподілу цих молекул *in vivo* [138-142]. Окрім того, взаємодія більшості барвників з альбумінами сприяє руйнуванню нефлуоресцентних агрегатів та підвищує їх флуоресценцію, а отже надає можливість використовувати барвники при флуоресцентно-керованій хірургії [139]. Так, досліджений комплекс диціанометилен-заміщеного сварилієвого барвника з бичачим сироватковим альбуміном для комбінування візуалізації та терапії. Утворені нековалентні комплекси барвник-білок продемонстрували значний цитотоксичний ефект при опроміненні лазером у мишей з ксенотрансплантованими пухлинами [143]. Іншим підходом для покращення терапевтичних властивостей є інкапсуляція ПБ з метою підвищення їх терапевтичної активності. Диціанометиленсварилієвий барвник інкапсульований у фосфоліпідні подвійні шари ліпосом продемонстрував бімодальне зображення пухлин [144]. Підвищене поглинання кон'югату фталоціанінового фотосенсibilізатору з BSA призводило до загибелі 90% клітин Нер-G2 [145]. А включення ICG у везикулярний колоїдний наноносій (трансферсоми) для уникнення швидкої деградації та швидкого вивільнення барвника, підтримувало вивільнення ICG більше двох годин [146]. Подібна стратегія застосована з використанням людського альбуміну HSA. Для створення білкового комплексу спершу проведена модифікація структури ICG: введення жорсткого циклогексенілу та заміна бічних алкільних груп на карбоксильну та ефірну. Далі отримані наноконплеси з 66,7% інкапсуляції

барвника та малим діаметром (10 нм). Такі комплекси ефективно накопичувалися в пухлинах завдяки ефекту ЕПР та викликали гіпотермію та високу генерацію активних форм Оксигену в ракових клітинах при опроміненні [147].

Дослідження зміни фотодинамічних властивостей хлорину еб при його інкапсуляції з HSA показало, що присутність білка сприяє проходженню фотохімічних реакцій при опроміненні світлом за типом I і не впливає суттєво на механізм типу II. Генерація синглетного Оксигену залишалася на високому рівні, тоді як присутність альбуміну сприяла зростанню також і значної кількості пероксидних радикалів [148].

Проте зв'язування з альбумінами може мати і негативні наслідки для фототоксичних властивостей ФС. Так, присутність BSA зменшувала ступінь агрегації Zn-фталоціаніну та його похідних у водному розчині, проте асоціація з BSA негативно вплинула на фотофізичні властивості ФС (рис. 1.23). За рахунок обмеженого доступу Оксигену крізь білкову оболонку спостерігалось гасіння триплетних станів ФС. Це призводило до зменшення генерації синглетного Оксигену та зниження фотодинамічної активності [149,150].

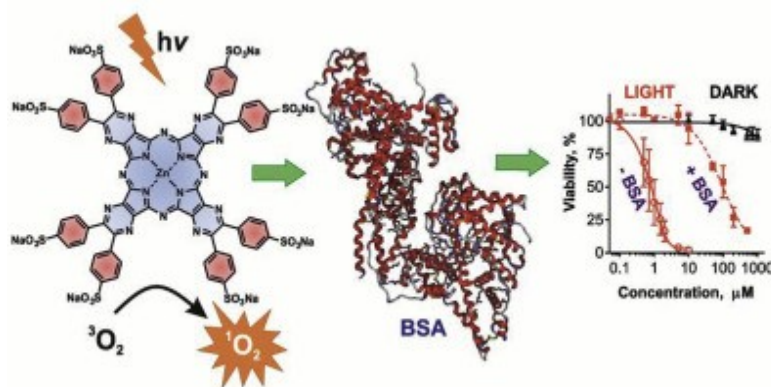


Рис. 1.23 Зменшення цитотоксичності Zn-фталоціаніну в присутності BSA

Життя триплетних збуджених станів фталоціанінів алюмінію в присутності HSA залежало від кількості сульфогруп в молекулі ФС. Дисульфоване похідне продемонструвало в два рази більший час життя триплетів в присутності альбуміну, ніж у вільному стані. Тоді як для моно-, три- та тетрасульфованих сполук такий ефект не спостерігався. Автори пояснюють

збільшення тривалості життя триплетного стану здатністю альбуміну забезпечувати певний захист від водної фази та залежності констант зв'язування з альбуміном від хімічної будови молекул ФС, зокрема, від положення сульфогруп [151]. Також, позитивний і негативний вплив біокон'югації на фототоксичність продемонстровано при дослідженні фотодинамічної активності фталоціанінів кремнію [152]. При нековалентному зв'язуванні з BSA виявлено, що фотоцитотоксичність зростала у 8 разів для ФС з незарядженими групами, тоді як тетрокатионний ФС агрегував в білковій кишені і його цитотоксичність була найменшою серед досліджуваних сполук.

Отже, враховуючи вищенаведені літературні дані, потрібно відмітити, що при дослідженні флуоресцентних зондів основна увага зосереджена на йонних барвниках, найчастіше катіонного типу. Дійсно, такі барвники мають ряд переваг, а саме: високі молярні коефіцієнти екстинкції і квантові виходи флуоресценції, здатність селективно накопичуватися у мітохондріях. Але здатність до селективного накопичення катіонних барвників в мітохондріях не дає змогу сконструювати кон'югати для адресної доставки потрібних нам молекул в певні компартменти клітини. Довгохвильові флуоресцентні барвники, що не містять заряду чи заряд є скомпенсованим всередині молекули, розширюють практичні можливості для флуоресцентної візуалізації клітин та дизайну адресних флуоресцентних кон'югатів. До таких барвників відносять поліметинові мероціанінові та сквараїнові барвники. В літературі особлива увага зосереджена на дослідженні барвників із мезо-незаміщеним поліметиновим ланцюгом, що здатний до негативного ефекту ізомеризації. Практично не відображений вплив мезо-замісників у поліметиновому ланцюзі на взаємодію із сироватковими альбумінами та клітинну проникність. Окрім того, увага дослідників прикута до вивчення мероціанінів з похідними барбітурової та тіобарбітурової кислоти, індадіону, піразолідіндіону, триціанофурану. Проте відомо, що такі сполуки можуть утворювати водневі зв'язки, які впливають на кінцевий результат при вивченні біорозподілу. Тоді як похідні з

малонодинітрильним фрагментом згадуються лише при вивченні амілоїдних агрегатів. Виходячи з вищесказаного, введення мезо-замісників в поліметиновий ланцюг може покращити фотостійкість нових мероціанінових барвників, вплинути на їх взаємодію із білками та на проникність у клітини.

Існує велика кількість робіт із дослідженням різноманітних за структурою сквараїнів, проте логічних серій, які б розглядали вплив заряду замісників при гетероатомі чи довжини N,N'-бічного алкільного радикалу на зв'язування із глобулярними білками малочислені. Окрім того, розглядаючи здатність сквараїнів до генерації синглетного Оксигену, численні наукові групи зосереджуються на посиленні впливу важкого атома за рахунок введення галогенів, Сірки чи Селену в структуру барвника. В той же час, дуже мало досліджень, які вивчають вплив агрегації на генерацію активних форм Оксигену.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1 Матеріали

У роботі використані: бичачий сироватковий альбумін (BSA), сироватковий альбумін людини (HSA), кінський сироватковий альбумін (ESA), яєчний лізоцим (LYS), бета лактоглобулін (BLG), курячий овальбумін (OVA), ДМСО (диметилсульфоксид) вітчизняного виробництва; TRIS (трис(гідроксиметил)амінометан) виробництва «Sigma-Aldrich» (США), DPBF (1,3-дифенілізобензофуран) Sigma-Aldrich (США). Сквараїнові барвники **4.4 – 4.7, 3.0** були люб'язно надані Л.Ю. Сломінським та О.О. Іщенком, Інститут органічної хімії НАНУ. Чистота всіх досліджуваних сполук складала > 95%.

2.2 Синтез барвників

Солі імінію **a**, **b** і **c** були отримані за описаними реакціями з реактивом Вільсмайєра [146,147] (Схема 4.1). Проміжні продукти (**3.2a**, **3.3a**, **3.1c**, **3.4b**, **3.5b**) отримані з використанням конденсації солей бензотіазолію або 4,5-дигідротіазолію та солей імінію в присутності ацетату натрію як основи. До суміші 1,2 ммоль відповідних солей імінію **a-c** і 1,0 ммоль солей бензотіазолію або 4,5-дигідротіазолію у 5 мл сухого EtOH додавали 0,2 г (2,5 ммоль) свіжорозплавленого NaOAc однією порцією. Після продування аргоном реакційну посудину закривали і нагрівали при 80°C протягом 3 годин. Розчинник випарювали, а залишок, що залишився, обробляли 5% водним розчином HCl (5 мл). Отриману тверду речовину відфільтрували та сушили у вакуумі при 60°C.

Досліджувані мероціанінові (**3.1 -3.5**) барвники синтезовано шляхом взаємодії інтермедіатів з малонодинітрилом в етанолі в присутності ацетату натрію. До суміші 1 ммоль відповідних проміжних продуктів і 1,2 ммоль малонодинітрилу в 5 мл сухого EtOH додавали 2,0 ммоль свіжерозплавленого NaOAc однією порцією. Після продування аргоном реакційну посудину закривали і нагрівали при 80°C протягом 3 годин. Розчинник випарювали, а осад, що залишився, обробляли 5% водним розчином HCl (5 мл). Отриману речовину відфільтровували та сушили у вакуумі при 60°C. Продукти були очищені методом препаративної тонкошарової хроматографії (ТШХ) з рухомою фазою CH₂Cl₂-CH₃OH (9:1).

Структури отриманих барвників були підтверджені ¹H ЯМР, ¹³C ЯМР та маспектронетрією високої роздільної здатності (HRMS). Чистота сполук була підтверджена методом високоефективної рідинної хроматографії з мас-приставкою (LCMS) і становила 92-99 %

Барвник (**3.1**) HRMS m/z: calc for C₂₅H₂₄ClN₃O₂S⁺ 465,9958 obsd 465,1261; ¹H ЯМР (400 MHz, DMSO-d₆): δ 1.36-1,44 (m, 2H); 1,51-1,59 (m, 2H); 1,67-1,80 (m, 4H); 2,20 (t, J₁=7,09Hz, 2H); 7,54 – 7,59 (m, 2H); 2,75-2,79 (m, 2H); 4,32 (t, J =7,34Hz, 2H); 6,24 (d, J₁=13,21, 1H); 7,32 (t, J₁=7,58Hz, 1H); 7,49 (t, J₁=7,09Hz, 1H); 7,59 (s, 1H); 7,60-7,63 (m, 1H); 7,68 (d, J₁=12,72Hz, 1H); 7,87 (d, J₁=7,83Hz, 1H); 11,91 (bs, 1H). ¹³C ЯМР (100 MHz, DMSO-d₆) δ 24,57; 25,92; 26,37; 27,09; 27,22; 33,93; 45,92; 61,78; 97,23; 113,31; 118,14 (CN); 119,79 (CN); 121,14; 122,28; 123,28; 125,05; 128,37; 130,03; 133,95; 141,25; 142,06; 146,53; 148,69; 162,52; 174,96.

Барвник (**3.2**) HRMS m/z: calc for C₂₇H₂₉N₃O₂S⁺ 459,6042 obsd 459,1960; ¹H ЯМР (400 MHz, CDCl₃) δ 1,32-1,34 (m, 2H); 1,50-1,64 (m, 4H); 1,75-1,83 (m, 2H), 2,31-2,34 (m, 4H); 2,70-2,85 (m, 2H); 2,94-2,97 (m, 2H); 3,25-3,29 (m, 2H); 3,65-3,69 (m, 2H); 5,30 (d, J₁=12.08Hz, 1H); 6,12 (d, J₁=11,72Hz, 1H); 6,74 (s, 1H); 6,95-7,05 (m, 2H); 7,30-7,4 (m, 3H); 10,70 (b.s., 1H). ¹³C ЯМР (100 MHz, CDCl₃) δ 21,59; 24,32; 25,39; 26,11; 26,41; 26,56; 27,25; 29,78; 33,60; 47,92; 56,11; 67,32; 92,08; 116,87 (CN); 118,39(CN); 127,07; 127,41; 128,06; 130,33; 137,69; 144,30; 156,30; 160,13; 160,19; 178,42.

Барвник **(3.3)** HRMS m/z : calc for $C_{31}H_{29}N_3O_2S^+$ 507,647 obsd 507,1966; 1H ЯМР (601 МГц, $CDCl_3$) δ 1.40 – 1.54 (m, 2H), 1.74 (dp, $J_1 = 26.4$, $J_2 = 7.5$ Hz, 4H), 1.91 (p, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.39 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.48 (s, 2H), 2.87 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 3.85 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 5.59 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 6.21 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H), 6.83 (s, 1H), 6.89 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.01 (td, $J = 7.6$, 0.9 Hz, 1H), 7.07 – 7.12 (m, 2H), 7.20 – 7.29 (m, 3H), 7.38 – 7.47 (m, 3H). ^{13}C ЯМР (100 МГц, $CDCl_3$) δ 21,46; 24,25; 25,39; 26,05; 26,31; 26,41; 33,34; 44,95; 62,87; 91,45; 109,75; 116,56 (CN); 118,08 (CN); 121,76; 122,71; 124,63; 126,85; 127,64; 128,07; 128,31; 128,53; 130,35; 137,44; 140,47; 142,00; 155,77; 156,21; 159,17; 177,63.

Барвник **(3.4)** HRMS m/z : calc for $C_{32}H_{32}N_4O_2S^+$ 536,6882 obsd 536,2236; 1H ЯМР (601 МГц, $CDCl_3$) δ 1.32 – 1.40 (m, 2H), 1.60 (p, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.62 – 1.69 (m, 2H), 2.37 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.62 – 2.67 (m, 2H), 3.01 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.03 – 3.09 (m, 2H), 3.26 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 3.67 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 5.04 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H), 6.35 (dt, $J = 12.1$, 2.0 Hz, 1H), 7.00 – 7.07 (m, 7H), 7.21 – 7.27 (m, 5H).

^{13}C ЯМР (100 МГц, $CDCl_3$) δ 21,18; 26,25; 26,27; 26,47; 26,85; 27,22; 33,40; 47,76; 65,80; 92,41; 117,00 (CN); 118,13 (CN); 122,47; 123,53; 128,86; 129,45; 130,55; 134,88; 147,44; 147,59; 158,44; 163,42; 178,13.

Барвник **(3.5)** HRMS m/z : calc for $C_{36}H_{32}N_4O_2S^+$ 584,731 obsd 584,2248; 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 1,32-1,35 (m, 2H), 1,51-1,63 (m, 4H); 2,18 (t, $J_1=7,32$ Hz, 2H); 2,72-2,81 (m, 2H); 2,91-3,00 (m, 2H); 4,05 (t, $J_1=7,14$ Hz, 2H); 5,68 (d, $J_1=12,45$ Hz, 1H); 6,51 (d, $J_1=12,45$ Hz, 1H); 6,84 (s, 1H); 7,04-7,13 (m, 7H); 7,29-7,37 (m, 6H); 7,62 (d, $J_1=7,32$ Hz, 1H); 12,06 (bs, 1H). ^{13}C ЯМР (100 МГц, $DMSO-d_6$) δ 24,12; 25,54; 26,15; 26,19; 26,31; 33,50; 44,69; 60,10; 94,38; 111,59; 117,55 (CN); 118,81 (CN); 122,07; 123,29; 123,51; 123,92; 127,36; 127,99; 129,57; 129,66; 131,01; 133,24; 141,76; 144,39; 147,05; 156,72; 174,35.

Для синтезу барвника **4.2** суміш четвертинної солі **2** 0,996 г (2,1 ммоль) і квадратної кислоти 0,117 г (1 ммоль) кип'ятили в 12 мл суміші н-бутанол/толуол (2:1 об'єм/об'єм) за допомогою апарату Діна–Старка. Реакційний розчин охолоджували до кімнатної температури і потім фільтрували. Отриманий осад промивали EtOAc і перекристалізовували з ІПС, після чого сушили у вакуумній

печі при 60 °С. Структуру отриманого барвника підтверджено ^1H ЯМР та ^{13}C ЯМР: ^1H ЯМР (601 MHz, DMSO- d_6) δ 7.55 – 7.52 (m, 2H), 7.47 – 7.44 (m, 2H), 7.38 (td, J = 7.8, 1.2 Hz, 2H), 7.19 (td, J = 7.4, 0.9 Hz, 2H), 5.86 (s, 2H), 3.41 – 3.36 (m, 4H), 3.26 (q, J = 7.2 Hz, 12H), 2.02 (p, J = 7.7 Hz, 4H), 1.69 (s, 12H), 1.19 (t, J = 7.2 Hz, 22H). ^{13}C ЯМР (151 MHz, DMSO) δ 180.52, 179.79, 168.99, 141.94, 141.28, 128.04, 123.90, 122.39, 110.25, 86.30, 53.06, 52.27, 48.82, 26.55, 19.21, 7.22, 7.15.

Для одержання барвника **4.1** суміш солі **3** (3,26 г; 9,2 ммоль) і скварайнової кислоти (0,5 г; 4,4 ммоль) кип'ятили в 30 мл суміші н-бутанол/толуол (2:1 об./об.) за допомогою апарату Діна-Старка. Реакційний розчин охолоджували до кімнатної температури і потім випарювали, до отриманого сирого продукту додавали 50 мл EtOAc і тверду речовину фільтрували. Отриманий порошок перекристалізовували з етанолу і сушили у вакуумній печі при 60°C. Структуру отриманого барвника підтверджено ^1H ЯМР та ^{13}C ЯМР: ^1H ЯМР (601 MHz, DMSO- d_6) δ 7.52 – 7.48 (m, 2H), 7.35 – 7.28 (m, 4H), 7.15 (td, J = 7.2, 1.2 Hz, 2H), 5.78 (s, 2H), 4.07 (s, 4H), 3.95 (t, J = 6.6 Hz, 4H), 2.27 (t, J = 7.2 Hz, 4H), 1.71 (t, J = 7.8 Hz, 4H), 1.67 (s, 12H), 1.57 (p, J = 7.3 Hz, 4H), 1.51 – 1.45 (m, 4H), 1.37 (tt, J = 9.6, 6.3 Hz, 4H), 1.30 – 1.22 (m, 4H), 0.84 (t, J = 7.4 Hz, 6H). ^{13}C ЯМР (151 MHz, DMSO) δ 180.54, 178.76, 172.73, 168.95, 142.22, 141.37, 127.91, 123.60, 122.20, 110.26, 86.03, 63.36, 48.66, 42.77, 33.27, 30.12, 26.49, 26.25, 25.65, 24.20, 18.57, 13.50.

Для синтезу барвника **4.3** 0,5 г (0,68 ммоль) **4.1** кип'ятили в 10 мл 10 М водного розчину HCl протягом 2 годин. Після того як ТШХ показала завершення реакції, реакційний розчин охолоджували до кімнатної температури і потім фільтрували. Отриманий барвник **4.3** був висушений у вакуумній шафі при 60°C. Структуру отриманого барвника підтверджено ^1H ЯМР та ^{13}C ЯМР: ^1H ЯМР (601 MHz, DMSO- d_6) δ 12.01 (s, 2H), 7.51 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.43 – 7.22 (m, 4H), 7.22 – 7.05 (m, 2H), 4.06 (s, 4H), 2.20 (t, J = 7.2 Hz, 4H), 1.71 (q, J = 7.6 Hz, 4H), 1.67 (s, 12H), 1.55 (p, J = 7.4 Hz, 4H), 1.39 (qtd, J = 9.8, 9.1, 6.1 Hz, 4H). ^{13}C ЯМР (151 MHz, DMSO) δ 180.62, 178.55, 174.29, 168.65, 142.21, 141.41, 127.95, 123.63, 122.22, 110.28, 86.00, 55.53, 48.67, 42.83, 33.47, 26.49, 25.83, 24.16, 23.41.

Синтез кон'югату барвника **3.4** із глюкозаміном проводили за наступною методикою: до розчину 25 мг (0,04 ммоль) барвника **3.4** в 2 мл ДМФА додавали 15 мг (0,2 ммоль) гідроксибензотриазолу (НОВТ), 20 мг (0,2 ммоль) ммоль EDCI і 0,03 мл (0,2 ммоль) триметиламіну при інтенсивному перемішуванні. Через 15 хвилин додавали водний розчин 24 мг (0,1 ммоль) гідрохлориду D-глюкозаміну з 0,03 мл (0,2 ммоль) триметиламіну та реакційну суміш перемішували протягом ночі. Після випаровування продукт очищали препаративною ТШХ з CH_2Cl_2 - CH_3OH (9:1) як рухомою фазою. Одержаний кон'югат **3.4-GlcN** очищений за допомогою ПТШХ, структура була підтверджена за допомогою ^1H ЯМР, ^{13}C спектроскопії та LCMS. ^1H ЯМР (400 MHz, DMSO- D_6) δ ppm 1.50 (m, 4H), 2.11 (m, 2H), 2.67 (m, 2H), 2.92 (m, 2H), 3.17 (m, 2H) 3.2 (s, 1 H) 3.41-3.64 (m, 6 H), 3.88 (t, $J=7.3$ Hz, 2H), 4.39-4.54 (d, 2H), 4.56-4.82 (m, 2H), 4.88-4.93 (m, 2H), 5.40 (d, $J=12.2$ Hz, 1H), 6.38-6.52 (m, 1H), 6.57 (d, $J=12.7$ Hz, 1H) 6.69 (s, 1H), 6.97-7.07 (m, 6H), 7.27-7.34 (m, 4H), 7.54-7.68 (m, 1H, CONH). ^{13}C ЯМР (101 MHz, DMSO- d_6) δ (172.47, 172.11, CONH ротамери) 163.92, 163.41, 147.03, 142.83, 138.30, 129.56, 128.47, 126.56, 123.24, 121.82, (119.57, 118.25 CN ротамери), 116.69, (95.57, 94.85 ротамери), 90.60, (76.76, 74.34 ротамери), 72.03, 71.20, (70.89, 70.45 ротамери), 61.15 CH_2OH , (57.09, 56.75 ротамери), 56.50, 54.19, 47.61, (35.40, 34.93 ротамери), 26.79, 26.17, 26.09, 25.91, 25.74, 25.64, 24.80. LCMS R_f – 0.954 мин. $m/z = 698$ [M+1]

Методика синтезу (**4.3-GlcN**): до розчину 50 мг (0,08 ммоль) барвника **4.3** в 3 мл ДМФА додавали 27 мг (0,2 ммоль) гідроксибензотриазолу (НОВТ), 38 мг (0,2 ммоль) ммоль EDCI і 0,03 мл (0,2 ммоль) триметиламіну при інтенсивному перемішуванні. Через 15 хвилин додавали водний розчин 42 мг (0,2 ммоль) гідрохлориду D-глюкозаміну з 0,03 мл (0,2 ммоль) триметиламіну та реакційну суміш перемішували протягом ночі. Після випаровування продукт очищали препаративною ТШХ з CH_2Cl_2 - CH_3OH (9:1) як рухомою фазою. Структуру отриманого барвника підтверджено ^1H ЯМР та ^{13}C ЯМР: ^1H ЯМР (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.77 – 7.48 (m, 4H), 7.38 – 7.31 (m, 4H), 7.20 – 7.13 (m, 2H), 6.44 (s, 1H), 5.79 (s, 2H), 4.93 (d, $J = 3.4$ Hz, 3H), 4.65 (s, 1H), 4.45 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 4.05

(s, 4H), 3.70 – 3.41 (m, 8H), 3.11 (dd, $J = 19.5, 10.3$ Hz, 3H), 2.18 – 2.05 (m, 4H), 1.68 (s, 12H), 1.60 – 1.52 (m, 4H), 1.40 (d, $J = 6.7$ Hz, 4H). ^{13}C ЯМР (101 MHz, DMSO) δ 180.70, 178.29, 172.43, 172.12, 169.05, 142.16, 141.44, 127.98, 123.65, 122.19, 110.31, 90.59, 85.95, 72.02, 71.17, 70.47, 61.16, 54.28, 48.68, 42.93, 40.43, 35.39, 35.00, 26.50, 25.85, 25.00. LCMS R_f – 0.723 мин. $m/z = 927$ [M+1]

2.3 Спектрально-флуоресцентні вимірювання

Стокові розчини барвників готували шляхом розчиненням відповідних наважок у ДМСО з концентрацією 2 мМ. Стокові розчини білків (HSA, BSA, ESA, BLG, LYS та OVA) готували розчиненням у 50 мМ Трис-НСl буфері (pH 7,9) у концентрації 0,2 мг/мл. Молярна концентрації білка у вихідному розчині дорівнювала 3 μM для BSA, HSA та ESA та 4,5 μM для OVA, BLG та LYS.

Робочі розчини барвників готували шляхом розведення стокових розчинів в 50 мМ буфері Трис-НСl (pH 7,9) та органічних розчинниках. Розчини усіх барвників у ДМСО та метанолі підчинялися закону Ламберта – Бера в інтервалі концентрацій 1 – 100 μM . Це означає, що вони в них знаходилися у неагрегованій мономерній формі. Робочі розчини барвників у присутності білків готували шляхом додавання основного розчину барвника до основного розчину білка. Концентрація барвників в робочих розчинах становила від 5 до 10 μM .

Абсорбційна та флуоресцентна спектроскопії використані для вивчення спектрально-флуоресцентних властивостей синтезованих барвників та їхніх комплексів із білками. Усі спектроскопічні вимірювання виконувались при кімнатній температурі, одразу ж після приготування розчинів барвників та їхніх комплексів із макромолекулами.

Електронні спектри поглинання реєстрували на приладі «Specord M-40» (CarlZeiss, Німеччина), який має дві дифракційні ґратки по 1302 штрих/мм. Спектральний діапазон приладу становив 185-900 нм. Спектри флуоресценції

були записані за допомогою флуориметра «Cary Eclipse» (Varian, Австрія). Виміри проводили в кварцевих кюветах (10×10 мм) при кімнатній температурі.

Значення квантових виходів барвників у вільному стані та в присутності сироваткових альбумінів визначали з використанням розчину нільського синього Nile Blue (NB) в етанолі як еталон ($Q_{NB} = 0,27$). А саме, розчини кожного барвника без вмісту білків у буфері та NB в EtOH були взяті в таких концентраціях, щоб значення їх оптичної густини були рівними при певній довжині хвилі поглинання. Флуоресценцію обох розчинів збуджували на цій довжині хвилі, і розраховували площу під кожним спектром ($S_{\text{барвник}}$ і S_{NB} відповідно). Значення квантового виходу флуоресценції було розраховано за наступним рівнянням:

$$Q_{dye} = \frac{S_{dye}}{S_{NB}} \times \frac{n_{H_2O}}{n_{EtOH}} \times Q_{NB} \quad (1)$$

де n_{H_2O} та n_{EtOH} – показники заломлення водного розчину та етанолу відповідно.

Фотостійкість барвників вивчалася при опроміненні їх етанольних розчинів інтегральним світлом ксенонової лампи, що має безперервне спектральне розподілення випромінювання в УФ та видимій областях, інтенсивність в зоні опромінення складала приблизно 50 мВт/см². Реєстрація відбувалася за зміною оптичної густини в максимумі поглинання барвника.

Визначення синглетного Оксигену проводили з використанням свіжовиготовленого стокового розчину 1,3-дифенілізобензофурану (DPBF) (5мМ) в етанолі. Виміри були проведені в суміші етанол-буферний розчин (1:1), концентрація усіх барвників була однакова і у вимірювальному розчині складала 5 μМ, концентрація DPBF складала 50 μМ. Спектр поглинання розчину був записаний після кожного опромінення лазером 670 нм (180 мВт/см²) через рівні інтервали часу при постійному перемішуванні в темряві.

2.4 Визначення константи зв'язування барвників із альбумінами

Константу зв'язування барвників із білками оцінювали на підставі експериментальних вимірювань в залежності інтенсивності флуоресценції сполук при сталій концентрації 5 μM від концентрації білків в буфері (рН 7,9). Для кожного барвника експеримент було проведено тричі та вираховане середнє значення інтенсивності флуоресценції, яке використовували в подальших розрахунках. Припускаючи, що константа рівноваги зв'язування має однакове значення для усіх сайтів зв'язування, записуємо вираз:

$$K = \frac{C_{BL}}{(C_L - C_{BL})(nC_P - C_{BL})} \dots \dots \dots (2)$$

де n - кількість сайтів зв'язування в HSA, C_{BL} , C_P , C_L - концентрації зв'язаних молекул барвника з HSA, концентрація HSA та концентрація барвника, відповідно.

Розв'язуючи квадратне рівняння (2) отримуємо вираз для концентрації зв'язаних молекул барвника:

$$C_{BL} = \frac{nC_P}{2} + \frac{C_L}{2} + \frac{1}{2K} - \sqrt{\left(\frac{nC_P}{2} + \frac{C_L}{2} + \frac{1}{2K}\right)^2 - nC_P C_L} \quad (3)$$

Припускаючи що інтенсивність флуоресценції барвника пропорційна кількості зв'язаних молекул барвника, експериментальну інтенсивність флуоресценції барвника можна виразити рівнянням:

$$I = \frac{C_L - C_{BL}}{C_L} \times I_0 + \frac{C_{BL}}{C_L} \times I_{max} \quad (4)$$

де I_0 та I_{max} - інтенсивності флуоресценції вільного барвника та усіх молекул барвника, що зв'язані з білком, відповідно.

Поєднуючи рівняння (4) та (3), отримуємо вираз для обчислення константи зв'язування:

$$Y = A \times \left[\frac{1}{2} + \frac{X \times n}{2 \times C_L} + \frac{1}{2K \times C_L} - \sqrt{\left(\frac{1}{2} + \frac{X \times n}{2 \times C_L} + \frac{1}{2 \times K \times C_L}\right)^2 - \frac{X \times n}{C_L}} \right] \quad (5)$$

де $X = C_P$, $Y = (I - I_0)$, $A = (I_{max} - I_0)$;

Експериментально отримана крива інтенсивності флуоресценції сполук будується у вигляді залежності $(I - I_0)$ від C_p , а потім апроксимується за рівнянням (5), де значення K , n та A отримують як параметри підгонки.

2.5 Культивування клітин

Лінія клітин раку A2780 (ендометроїдна аденокарцинома яєчників) отримана від Sigma-Aldrich. Клітини A2780 вирощували в середовищі RPMI-1640 з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки (FBS), 1% L-глутаміну та 1% пеніциліну/стрептоміцину. Клітини культивували до 80–90% конфлюентності та відокремлювали від колби за допомогою розчину трипсину/ЕДТА (0,025%/0,01%, мас./об., Biochrom GmbH, Німеччина) у DPBS буфері.

Лінію клітин аденокарциноми молочної залози людини MCF-7 культивували в культуральному середовищі DMEM (Gibco, США) з додаванням 10% FBS, 2 мМ глутаміну, 50 ОД/мл пеніциліну та 0,25 мкг/мл стрептоміцину (Lonza). Клітини культивували до 80–90% конфлюентності та відокремлювали від колби за допомогою розчину трипсину/ЕДТА (0,025%/0,01%, мас./об., Biochrom GmbH, Німеччина) у PBS буфері. Клітини культивували в атмосфері 5 % вуглекислого газу (CO_2) при 37 °C.

2.6 Візуалізація живих клітин

Для візуалізації живих клітин, їх ресуспендували в середовищі RPMI-1640, що містило 5% FBS, 1% L-глутаміну та 1% пеніциліну/стрептоміцину, і висівали в концентрації 80 клітин/мкл на флуоресцентну чашку зі скляним дном (μ -dish 35 мм, ibidi GmbH, Німеччина). Кожну чашку із загальним об'ємом 2 мл залишали на ніч при 37 °C у камері, заповненій CO_2 (5%). Наступного дня клітини промивали (2×2 мл DPBS) і додавали свіжу порцію HBSS (2 мл). Розчини Hoechst 33342, MitoTracker Green і досліджуваного барвника у відповідних концентраціях в ДМСО додавали в окремі та в одну чашку на 30 хв. Потім

клітини двічі промивали DPBS і додавали свіжий HBSS (2 мл). Флуоресцентні зображення були отримані за допомогою Zeiss Axio Vert.A1 і набору фільтрів: зб. 625–655/випр 665–715 нм (темно-червоний) для візуалізації барвників, зб. 335–383/випр 420–470 нм (синій) для візуалізації Hoechst 33342, зб 450–490/випр 500–550 нм (зелений) для візуалізації MitoTracker Green. Об'єктив: 40x/1,30. Масло (DIC). Отримані зображення аналізували за допомогою безкоштовного програмного забезпечення Fiji/ImageJ v1.52b.

2.7 Конфокальна візуалізація фіксованих клітин

Для конфокального аналізу клітини MCF-7 поміщали в культуральні планшети з 12 лунками, що містять круглі стерильні скляні покривні скельця, і інкубували протягом 48 годин при 37 °C у присутності 5% CO₂. Після досягнення 80% конфлюентності, середовище для росту видаляли і клітини тричі промивали PBS. Далі клітини інкубували з досліджуваними барвниками в концентрації 0,1 μM у FluoroBrite DMEM (Gibco, США) без FBS протягом 15 хв при 37 °C у присутності 5% CO₂. Після інкубації клітини промивали PBS, фіксували в 10% нейтральному забуференому формаліні (Sigma-Aldrich, США) протягом 15 хв при 22° C і знову промивали PBS. Потім протягом 15 хвилин додавали Hoechst 33342 у концентрації 1 μM і повторно промивали PBS. Нарешті, скляні покривні скельця вставляли в середовище, що містило 0,1 % DABCO. Аналіз проводили за допомогою конфокального мікроскопа Zeiss.

2.8 Проточна цитометрія

Флуоресценцію живих клітин кількісно визначали за допомогою проточного цитометра Guava easyCyte™ 6-2L від Merck Millipore (Дармштадт, Німеччина) шляхом моніторингу випромінювання при 695±26 нм з використанням джерела збудження λ_{ex} 642 нм (червона флуоресценція). Для цього трипсиновані клітини ресуспендували в середовищі RPMI-1640, що містить 5% FBS, 1% L-глутаміну

та 1% пеніциліну/стрептоміцину, і переносили в 24-лунковий планшет в концентрації 200 клітин/мкл на лунку. Планшет із загальним об'ємом 0,5 мл на лунку залишали при 37 °C у камері, заповненій CO₂ (5%), на ніч. Через 12 годин клітини промивали (2×0,5 мл DPBS) і додавали свіжу порцію HBSS (0,5 мл). Розчини барвників в ДМСО або просто ДМСО додавали в окремі лунки протягом 30 хв інкубації. Концентрація барвників **3.2** і **3.4** становила 1 μM (1% ДМСО). Потім клітини двічі промивали DPBS і додавали свіжий HBSS (0,5 мл) і обробляли трипсином (0,2 мл/мас.) протягом 1 хвилини, залишали сухими протягом 5 хвилин в інкубаторі. Потім додавали свіжий HBSS (0,5 мл) і клітини переносили в поліпропіленові мікропробірки. Була кількісно визначена флуоресценція клітин, не оброблених жодним барвником (які містять лише аліквоту ДМСО як контроль), а також барвники **3.2** і **3.4**. Дані обробляли за допомогою програмного пакету inCyte™ від Merck Millipore.

2.9 Визначення цитотоксичності барвників

Цитотоксичність була оцінена з використанням МТТ-реагенту. Спершу клітини рівномірно висівали в кожен лунку 96-лункових планшетів (6000 клітин на лунку) і інкубували у культуральному середовищі DMEM з 10 % FBS протягом 24 годин. Далі середовище видаляли і додавали розчини досліджуваних барвників в різних концентраціях або у свіжому безсироватковому середовищі, або в середовищі, що містило 5% BSA. Одну частину планшетів залишали на 24 години для визначення темної токсичності, іншу – після однієї години інкубації з барвниками, опромінювали світлодіодом із довжиною хвилі 670 нм (180 мВт/см²) протягом 1 хв на лунку і також залишали протягом доби при 37 °C у камері, заповненій CO₂ (5%). Вживаність клітин вимірювали з використанням МТТ-реагенту. Для цього видаляли середовище та додавали МТТ реагент (5,0 мг/мл, 100 мкл) у безсироватковому середовищі, у темряві з подальшою інкубацією протягом 4 годин. Після цього розчини видаляли і додавали 150 мкл ДМСО для розчинення кристалів формагану. Оптичну густину (OD) реєстрували

при 570 нм за допомогою пристрою для зчитування мікропланшетів після 15 хв інкубації при кімнатній температурі. Число живих клітин, що залишилися після проведення дослідів, розраховували за наступним рівнянням:

$$\text{Вживаємість клітин (\%)} = (\text{OD}_{\text{барвник}} - \text{OD}_{\text{бланк}}) / (\text{OD}_{\text{контроль}} - \text{OD}_{\text{бланк}}) \times 100 \%, \quad (3)$$

В експериментах використовували наступні типи контролю: лунки з клітинами без барвників і без дії лазера, лунки з клітинами без барвників та після дії лазера, лунки з клітинами і з ДМСО без барвників (без лазера та з обробкою світлом). Кожний експеримент проводили в чотирьох повторях.

2.10 Молекулярний докінг

Молекулярний докінг флуоресцентних зондів здійснювали по всій поверхні молекули сироваткового альбуміну людини (кристалічна структура з PDB ID: 1AO6) здійснювали за допомогою веб-сервера CB-DOCK (<http://clab.labshare.cn/cb-dock/php/index.php>) [155, 156]. Візуалізацію комплексів флуоресцентного барвника з альбуміном людини здійснювали за допомогою Discovery Studio Visualizer 2017 R2.

2.11 Молекулярна динаміка

При проведенні розрахунку молекулярної динаміки комплексу “сироватковий альбумін людини – флуоресцентний барвник” (“рецептор – ліганд”) використовували пакет програм GROMACS. Топологію ліганда (формат файлу .itp) будували за допомогою серверу ATB (<https://atb.uq.edu.au/>).

Початкову позицію ліганда у гемін-зв'язувальному сайті рецептора генерували за допомогою веб-сервера CB-DOCK (<http://clab.labshare.cn/cb-dock/php/index.php>). Наступним етапом проводили конвертацію вихідного молекулярного комплексу (формат PDB) у внутрішній формат GRO пакету GROMACS, протонування амінокислотних залишків молекули рецептора

проводили програмою `pdb2gmx` у відповідності до структури топологій та силового поля GROMOS54A7. Розташування структури комплексу “ліганд-рецептор” в центрі кубічного боксу проводили з таким розрахунком, щоб дистанція від граничних атомів комплексу до стінок боксу не перевищувала 1 нм. Далі бокс заповнювали молекулами води та проводили мінімізацію енергії комплексу у водному оточенні з використанням алгоритму крутого спуску (steepest descent) протягом 1000 кроків. Фінальні координати системи “рецептор – ліганд – розчинник” використовували для розрахунку “обмеженої” молекулярної динаміки протягом 40 пс, яка включала гармонічну прив’язку позицій атомів рецептора та ліганда до вихідних координат. Як вихідну брали систему “протеїн – ліганд – вода”, отриману в результаті “обмеженої” динаміки. Молекулярну динаміку проводили при температурі 300К. Для підтримання константної температури системи застосовували метод слабкого сполучення Берендсена.

2.12 Статистичний аналіз

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики та кореляційного аналізу з використанням комп’ютерної програми Excel, пакету програм Origin та за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., США). Статистичне порівняння проводили з використанням t-критерія Стьюдента з р-значеннями < 0,05 як мінімального рівня достовірності.

РОЗДІЛ 3

МЕРОЦІАНІНОВІ БАРВНИКИ

Флуоресцентна візуалізація використовується для низки біологічних завдань таких як ідентифікація клітинних процесів, вивчення розподілу в клітині, візуалізація однієї клітини *in vivo* та для розробки нових прогностичних і терапевтичних стратегій. Нині досить активно досліджуються наночастинки металів як агенти візуалізації, які є біосумісними, фотостабільними та мають яскраву флуоресценцію [157]. Поряд з тим, розробляються різноманітні флуорофори на основі неорганічних матеріалів [158], такі як вуглецеві нанотрубки, квантові точки [159], наночастинки, що леговані рідкоземельними елементами [160]. Квантові точки мають значні переваги на противагу органічним барвникам завдяки поглинанню в широкому спектральному діапазоні в залежності від їх розмірів, високим коефіцієнтам екстинкції (вищі майже в 10 разів в порівнянні з органічними молекулами) та стійкості до фотознебарвлення [161]. Проте застосування квантових точок все ж є обмеженим. Перш за все через кількісну оцінку сигналу та необхідність затверджених протоколів. Окрім того, неорганічним матеріалам властива неконтрольована фармакінетика і здатність до накопичення в різних органах, також необхідною є їх солюбілізація за рахунок введення гідрофільних поверхневих молекул. На відміну від неорганічних флуоресцентних матеріалів, органічні молекули відрізняються простотою використання, комерційною доступністю та можливістю проводити структурну модифікацію в залежності від потреб використання.

Окрім оптичних властивостей, при дослідженні розподілу флуоресцентних барвників чи їх кон'югатів у клітині, велике значення має заряд молекули барвника. Як правило, для вивчення клітинних процесів, використовуються позитивно заряджені ціанінові барвники Cy5/Cy5.5/, оскільки вони мають високі

квантові виходи флуоресценції та молярні коефіцієнти екстинкції. Проте здатність катіонних барвників до накопичення в мітохондріях може впливати на біорозподіл їх кон'югатів, окрім того, призводити до зміни мітохондріального мембранного потенціалу і як наслідок – розриву мембрани [162, 163]. Тому метою нашого дослідження була розробка довгохвильових барвників, які не проявлятимуть (або матимуть низьку) здатність селективного накопичення в органелах клітин.

В дисертаційній роботі розроблений ряд барвників, які не мають загального заряду і мають або нейтральні, або цвіттер-іонні хромофори. Внутрішньоіонні барвники - це сполуки, в яких катіон та аніон поєднані між собою системою спряжених зв'язків із розподіленням заряду по атомам хромофору. Сумарний позитивний заряд внутрішньоіонних барвників є $+1$, а негативний -1 , а в цілому така молекула є електронейтральною, тому внутрішньоіонний барвник не містить протиіону і відноситься до числа несолетворних сполук. Наявність різнойменних зарядів, а також можливість їх локалізації в різних частинах молекули, обумовлює виникнення постійного дипольного моменту. Тоді як молекули іонних барвників є монополями і не існують без протиіону. При електронному збудженні внутрішньоіонних барвників дипольний момент може як різко зростати, так і падати до нуля [163]. За цією ознакою ці барвники умовно поділяють на нейтральні і бетаїнові. До нейтральних внутрішньоіонних барвників відносять мероціанінові барвники, у яких, як висвітлено в літературному огляді, один із станів (основний чи збуджений) може бути представлений у вигляді як нейтральної структури, так і біполярної [164]. Бетаїнові барвники – це барвники, що мають біполярну будову як в основному так і збудженому стані [163].

Мероціаніни широко використовуються для вирішення різних біологічних задач, наприклад, як зонди для визначення полярності мембран [46]. Барвник MC-540, знайшов своє застосування у фототерапевтичних дослідженнях. В даний час мероціаніни знаходяться в доклінічних дослідженнях, спрямованих на лікування лейкемії. Найпоширенішими є мероціаніни на основі барбітурової [58,

59] і тіобарбітурової [62, 63] кислоти та індандіону [64, 65], які мають заборонені $n \rightarrow \pi^*$ переходи, що гасять флуоресценцію, а також утворювати водневі зв'язки із біологічними молекулами, що, в свою чергу, може впливати на кінцевий результат. Окрім того, для більшості мероціанінових барвників характерним є поглинання світла в області до 600 нм, яка знаходиться за межами терапевтичного вікна. В літературі особлива увага приділяється дослідженню барвників із мезо-незаміщеним поліметиновим ланцюгом, який здатний до негативного ефекту ізомеризації. Практично не вивчена взаємодія барвників із мезо-замісниками у поліметиновому ланцюзі з сироватковими альбумінами, та їхня клітинна проникність.

Отже, в даній частині роботи досліджуються нові мероціанінові барвники із замісниками в поліметиновому ланцюзі, для зменшення фотоізомеризації та зміщення максимуму поглинання в довгохвильову область. Для порівняння впливу мезо-замісника в поліметиновому ланцюгу на зв'язування із білками, синтезовано барвник **3.0** із «відкритим» поліметиновим ланцюгом. Усі барвники **3.0 – 3.5** містили малонодинітрильний фрагмент як акцепторну частину та бензотіазоловий чи тіазолідиновий фрагменти як донор. Малононітрильний акцептор, на відміну від карбонільної групи барбітуратів, тіобарбітуратів і індандіону, практично не утворює водневі зв'язки і їх $n \rightarrow \pi^*$ перехід неактивний у безвипромінювальних процесах [165, 166]. Донорну та акцепторну частини поєднано поліметиновим ланцюгом, в який введені каркасні насичені шести та п'ятичленні місткові угруповання з різними замісниками (рис. 3.1), що відрізнялися за своєю ліпофільністю. Окрім того, усі синтезовані барвники містили аліфатичний лінкер при гетероатомі із карбоксильною групою для підвищення їхньої розчинності та для ковалентного приєднання до потрібних нам лігандів.

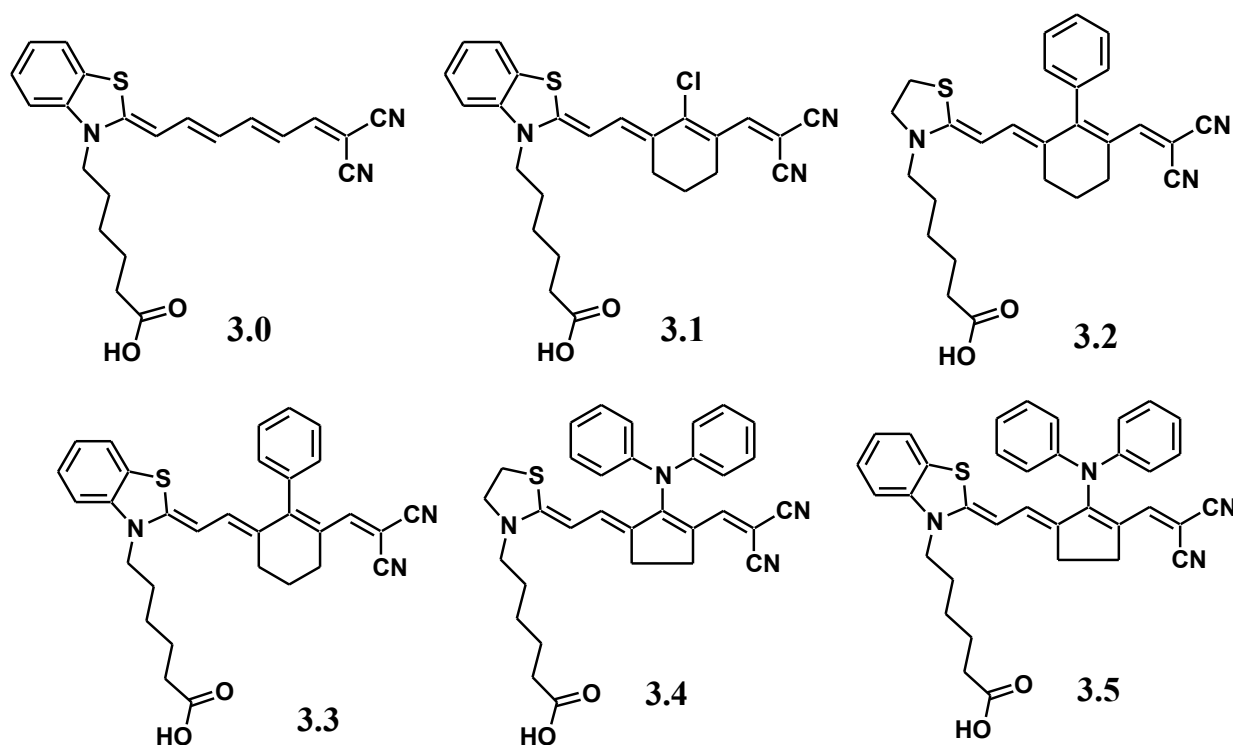


Рис. 3.1. Хімічні структури мероціанінових барвників 3.0 – 3.5

3.1 Синтез мероціанінових барвників

Комерційно доступні 2-метилбензотіазол і 2-метил-4,5-дигідротіазол алкілували 6-бромогексановою кислотою з утворенням відповідних четвертинних солей. Введений лінкер із карбоксильною групою надає змогу отримувати широкий спектр кон'югатів із біологічно активними молекулами або ліками. Проміжні продукти (3.2а, 3.3а, 3.1с, 3.4b, 3.5b) отримані з використанням конденсації солей бензотіазолію або 4,5-дигідротіазолію та солей імінію в присутності ацетату натрію як основи (рис. 3.2).

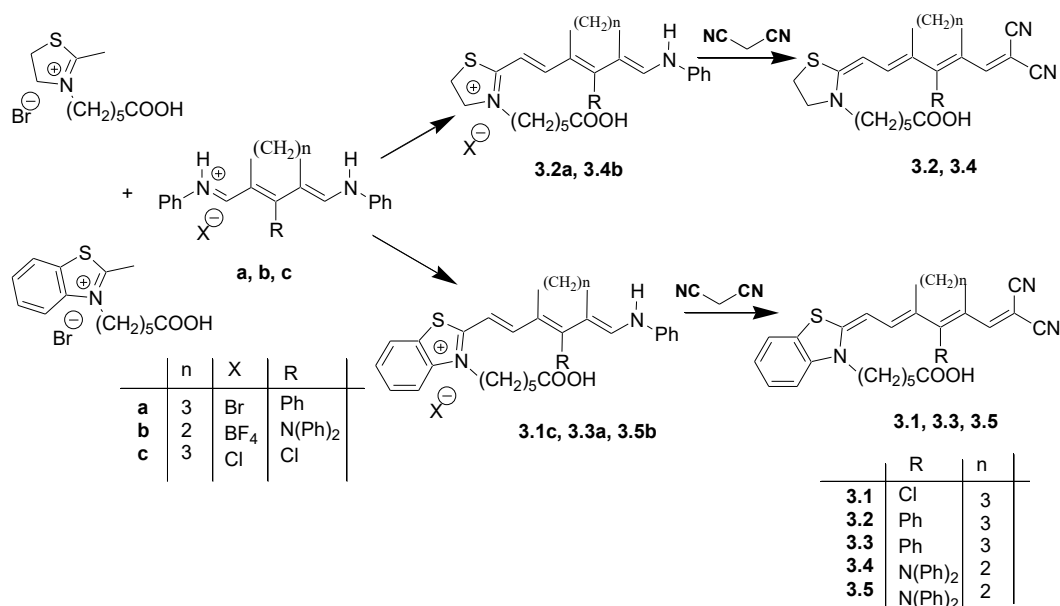


Рис. 3.2 Схема синтезу мероціанінових барвників 3.1 – 3.5

Оскільки відомо, що малонітрильний фрагмент барвників практично не утворює водневих зв'язків із біологічними молекулами, а також може мати роторні властивості, що сприяє зростанню інтенсивності флуоресценції молекул барвників у в'язких середовищах, його було обрано як акцепторний фрагмент в розробці дизайну нових барвників.

3.2 Спектрально-флуоресцентні характеристики досліджуваних барвників

Оскільки синтезовані барвники є новими, спершу був досліджений вплив хімічної будови на їх спектральні властивості. Максимуми поглинання та флуоресценції барвників розташовані в області 624 – 730 нм, що дає змогу їх використовувати в біологічній візуалізації *in vitro*. Цьому сприяють високі молярні коефіцієнти екстинкції досліджуваних барвників. В метанолі вони лежать в межах $(0.73 - 1,84) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (рис. 3.3, таблиця 3.1).

При переході від одного типу донора – тiazолідинового замісника (3.2 та 3.4) до донора, що містить бензотіазоловий замісник (3.0 - 3.3 та 3.5), спостерігається зміщення максимуму поглинання в довгохвильову спектральну

область. Так, наприклад, заміна тiazолідинового фрагменту в структурі барвника **3.4** на бензотіазоловий в **3.5** спричинює зсув максимуму абсорбції на 44 нм.

Таблиця 3.1

Спектральні характеристики барвників **3.0** – **3.5** в метанолі ($\lambda_{\max}$ – максимум поглинання, λ_{em} - максимум випромінювання, ϵ – молярний коефіцієнт екстинкції)

Барвники	метанол		
	$\lambda_{\text{abs}},$ nm	$\lambda_{\text{em}},$ nm	$\epsilon,$ $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
3.0	640	672	1.6
3.1	685	703	0.73
3.2	624	645	0.92
3.3	673	697	1.82
3.4	653	688	1.84
3.5	697	730	1.27

Структурні зміни в центральному фрагменті поліметинового ланцюга також впливають на спектрально-флуоресцентні властивості мероціанінів. Для барвників із цикlopентильним кільцем з дифеніламіновими замісниками, максимуми збудження та випромінювання флуоресценції зміщуються в довгохвильову спектральну область порівняно з їх аналогами, які мають циклогексильне кільце із фенільною групою (**3.4** і **3.2** та **3.5** і **3.3**, відповідно).

Як видно з таблиці 3.1, введення мезо-замісника в поліметиновий ланцюг спричинює гіпсохромний зсув максимуму поглинання та флуоресценції. Атом Хлору (барник **3.1**) дає зміщення максимуму поглинання та флуоресценції на 45 та 31 нм, відповідно, а дифеніламінова група (барвник **3.5**) - на 57 та 58 нм, порівняно із барвником **3.0** без мезо-фрагмента.

Отже, введення дифеніламінової групи чи атому Хлору в центральний замісник поліметинового ланцюга та використання бензотіазолу як акцепторної частини барвника сприяє найбільшому зсуву максимумів поглинання та флуоресценції в довгохвильову спектральну область.

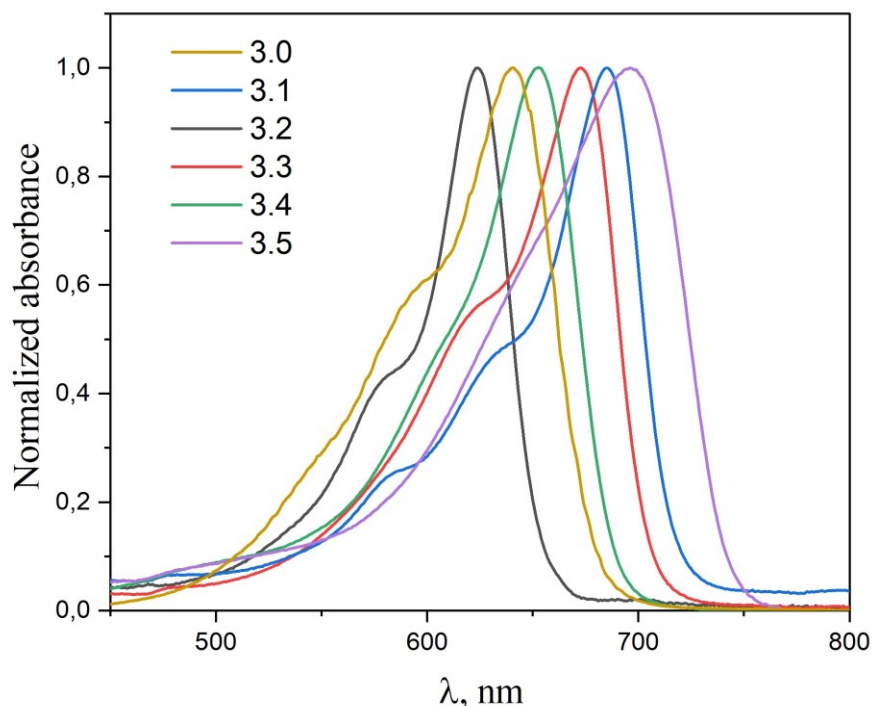


Рис. 3.3. Нормалізовані спектри поглинання в метанолі $C(\text{dye}) = 5\mu\text{M}$

Однак відомо, що наявність гідрофобних груп в структурі барвника може негативно вплинути на його спектральні властивості у водному середовищі. Тому наступним етапом нашої роботи було дослідження впливу будови барвників на їх спектральні властивості у водному буферному середовищі (pH 7,9).

Як зазначено на рис. 3.4, перехід від метанольного до водного буферного розчину впливає на форму спектральної кривої барвників. Зокрема, для мероціанінів **3.1** та **3.3** спостерігається поява додаткових короткохвильових максимумів, а криві поглинання барвників **3.0** та **3.5** розширюються, що може вказувати на тенденцію барвників до агрегації у водному буфері. Аналогічні

форми кривих спектрів поглинання спостерігаються і для барвників з тiazолідиновими замісниками (3.2 та 3.4)

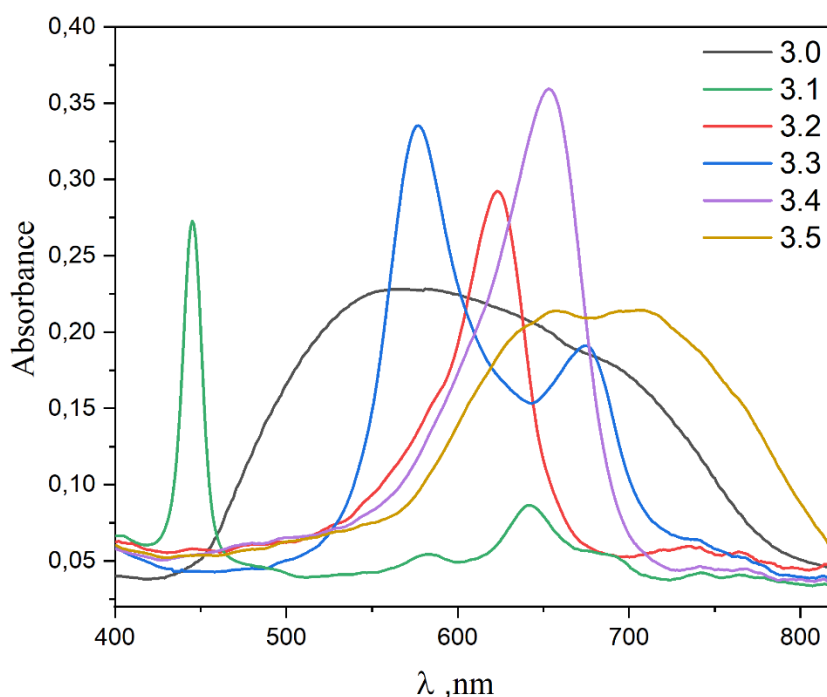


Рис. 3.4 Спектри поглинання барвників **3.0 – 3.5** в буферному розчині $C(\text{dye}) = 5\mu\text{M}$

Поліметинові барвники найбільш схильні до утворення асоціатів сендвічевої будови за рахунок дисперсійних взаємодій, які виникають завдяки протяжній спряженій системі π -зв'язків, що легко поляризуються [167]. Цьому сприяє планарна будова хромофора і відсутність об'ємних замісників. Барвник **3.1** найбільш відповідає критеріям утворення асоціатів. Атом Хлору у мезоположенні менш об'ємний ніж фенільна і, особливо, дифеніламінова група, яка за рахунок стеричних перешкод, виведена з площини хромофору майже на 90° . Крім того, атом Хлору, який легко поляризується, додатково підсилює дисперсійні взаємодії між мономерними молекулами барвника у сендвічі. Тому барвник **3.1** практично весь утворює Н-агрегат, про що свідчать сильно гіпсохромно зсунута та звужена смуга поглинання, зниження інтенсивності флуоресценції. При поступовому додаванні метанолу до водного розчину

барвника **3.1** (рис. 3.5) відбувається зменшення інтенсивності короткохвильового максимуму із одночасним зростанням довгохвильового, що свідчить про руйнування Н-агрегатів барвника. Це видно неозброєним оком, якщо по краплинах додавати метанол до водного розчину барвника. Спостерігається зміна кольору розчину від зеленого до блакитного.

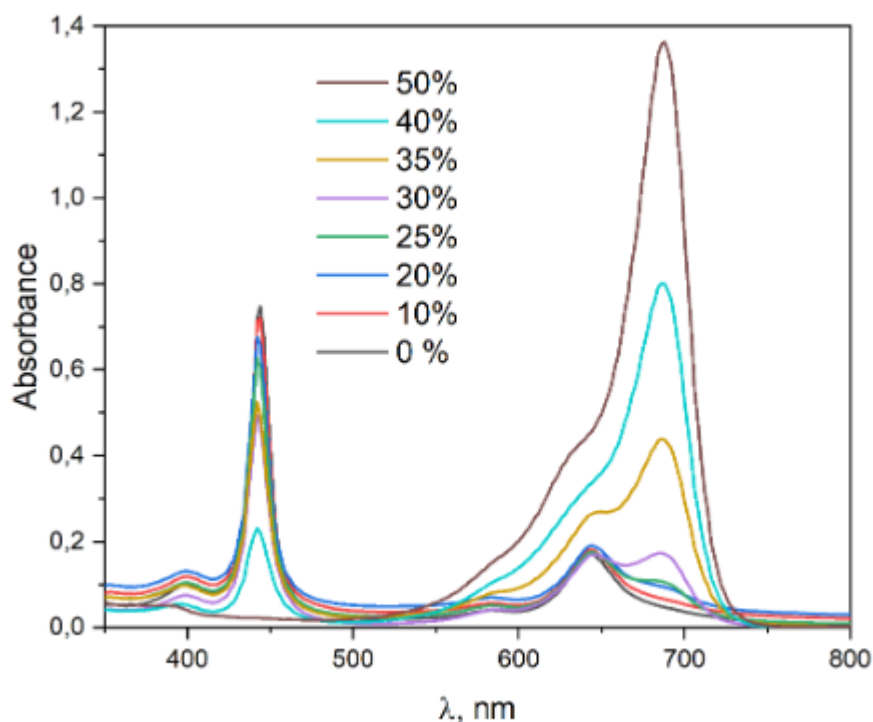


Рис. 3.5 Спектри поглинання **3.1** у водному розчині з вмістом метанолу від 0 до 50%; концентрація барвника 5 μM

Барвники **3.2** - **3.5** із об'ємними мезо-замісниками мають значно меншу здатність до утворення асоціатів сендвічевої будови, про що свідчать спектри поглинання цих барвників. Мероціаніни **3.2** та **3.4**, як видно з рис. 3.4, найменш схильні до агрегації. Це можна пояснити їхньою найкоротшою довжиною π -спряженої електронної системи серед досліджуваних барвників, наслідком чого є послаблення дисперсійних взаємодій.

При вивченні залежності агрегації барвника **3.3** від його концентрації встановлено, що зменшення концентрації барвника призводить до перерозподілу між його агрегованим (λ_{max} при 578 нм) та мономерним (λ_{max} при 674 нм)

станом. При концентрації 2 μM максимум Н-агрегатів в короткохвильовій області спектру практично відсутній (рис. 3.6).

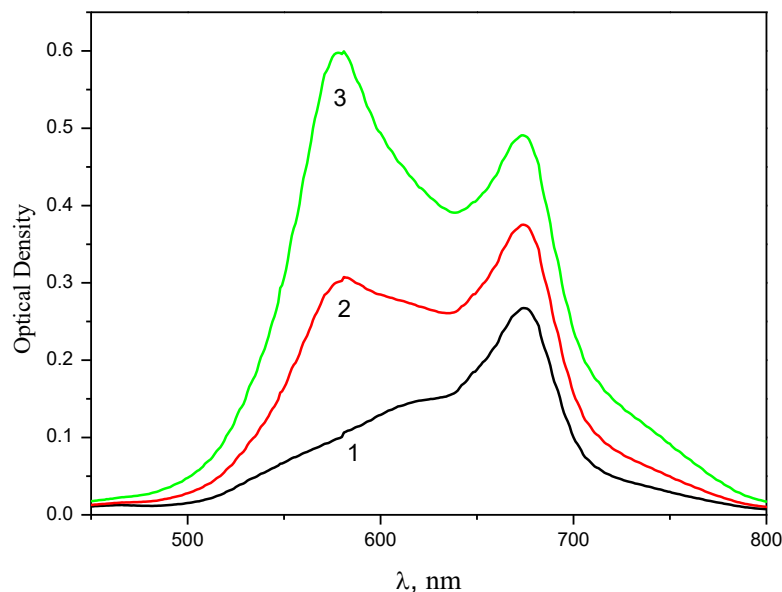


Рис. 3.6. Зміни спектрів поглинання барвника **3.3** в залежності від концентрації (1 – 2 μM , 2 – 5 μM , 3 – 10 μM)

Сироваткові альбуміни є основними транспортними білками в плазмі крові. Зв'язування барвників із сироватковими альбумінами використовується для біомедичної візуалізації, для визначення константи зв'язування лікарських засобів з альбуміном та для дослідження конформаційних змін в просторовій структурі білкових молекул.

В присутності HSA відбувається батохромне зміщення максимумів поглинання усіх досліджуваних барвників порівняно з їх максимумами у водному буфері (рис. 3.7). Для барвника **3.1** характерним є зростання інтенсивності довгохвильового максимуму та його зміщення на 59 нм в червону область спектру. Одночасно інтенсивність короткохвильового максимуму при 445 нм зменшується (рис. 3.7).

Форма кривої поглинання барвника **3.5** в присутності HSA змінюється, зокрема, широка смуга, що спостерігалася в буферному розчині в області 600 – 800 нм зникає і з'являється максимум поглинання $\lambda_{\text{abs}} = 712$ нм. Тоді як для барвника **3.0** спостерігається поява довгохвильового піку мономера, проте

основна форма кривої залишається уширеною, що говорить про сильну тенденцію до утворення агрегатів за відсутності замісників в поліметиновому ланцюзі. Схожі криві спектрів поглинання барвників в MeOH та в присутності HSA вказує на те, що барвники **3.2** – **3.5** в розчині з альбуміном перебувають переважно в мономерній формі.

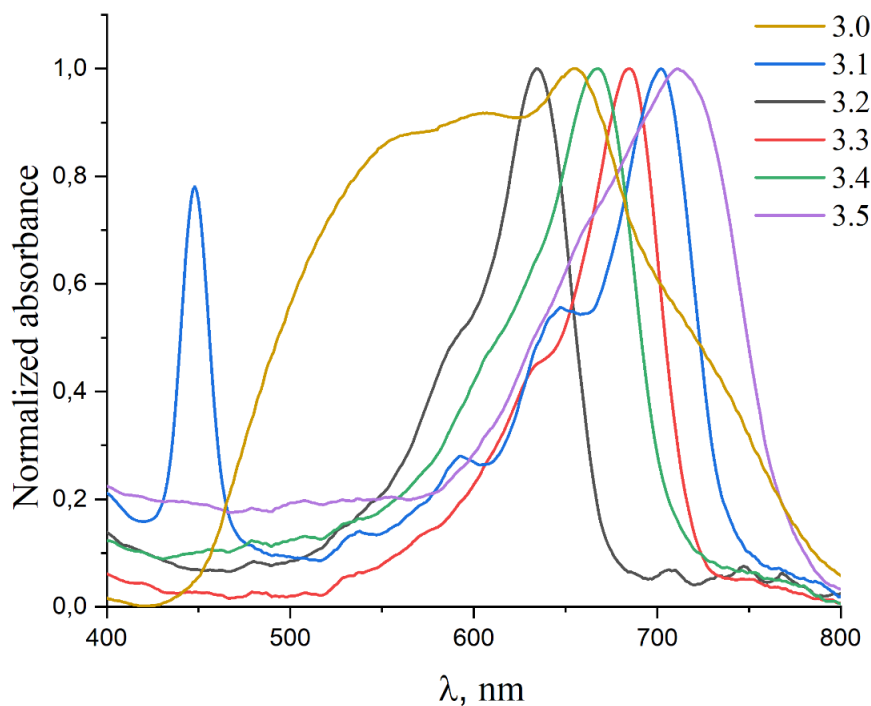


Рис. 3.7 Нормовані спектри поглинання досліджуваних барвників **3.0** – **3.5** при додаванні HSA (0.2 мг/мл); $C(\text{dye}) = 5\mu\text{M}$

Для встановлення впливу мезо-замісника в поліметиновому ланцюзі на фотостабільність барвників вивчені зміни оптичної густини при опроміненні етанольних розчинів барвників **3.0** та **3.3** інтегрованим світлом ксенонової лампи з неперервним спектральним розподіленням випромінювання в УФ і видимій області. Як видно з рис. 3.8, швидкість фотознебарвлення барвника **3.0** є вищою, ніж для барвника **3.3**, що свідчить про підвищення фотостабільності барвника при введенні центрального мезо-замісника в поліметиновий ланцюг.

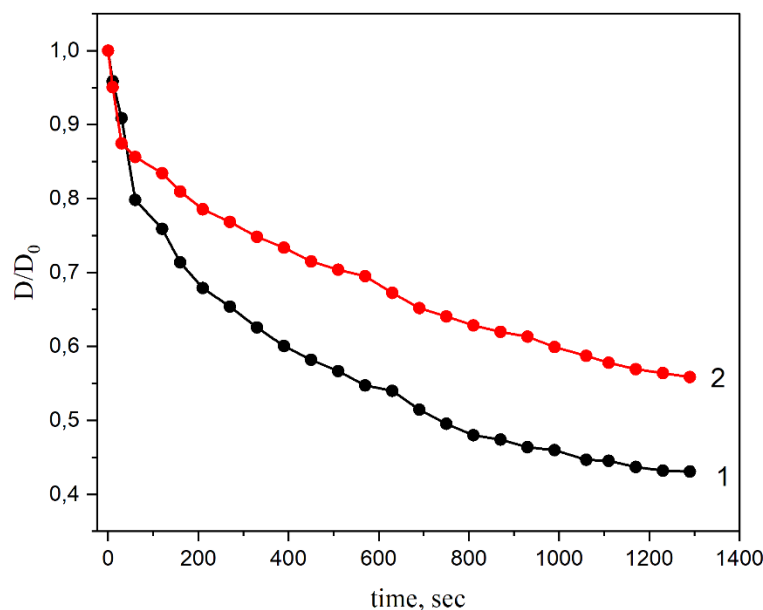


Рис. 3.8 Фотостабільність мероціанінових барвників: 1 – барвник **3.0**, 2 – барвник – **3.3**

3.3 Спектральні властивості мероціанінів в присутності білків

Дослідження флуоресцентних властивостей показало, що додавання HSA збільшує інтенсивність флуоресценції барвників: спостерігається зростання квантових виходів у 8 – 20 разів, а також зміщення максимумів збудження та випромінювання флуоресценції в червону область (таблиця 3.2). Ізомеризація барвників, а також агрегаційні процеси у водному середовищі можуть призводити до безвипромінювальної конверсії $S_1 - S_0$, наслідком якої є невисокі квантові виходи флуоресценції вільних барвників. В той же час нековалентне зв'язування з молекулою альбуміну ускладнює обертання барвника навколо зв'язків поліметинового ланцюга та знижує конформаційну ізомеризацію в полярних середовищах. Це приводить до зростання їхніх квантових виходів флуоресценції. Отже, батохромний зсув максимумів поглинання та флуоресценції, а також зростання інтенсивності флуоресценції і квантових виходів вказує на взаємодію барвників з HSA.

Оскільки синтезовані барвники виявилися чутливими до альбуміну, важливо було дослідити їхню спектрально-флуоресцентну відповідь на інші структурно-подібні альбуміни, а також на глобулярні білки іншої структури. Поглиблене вивчення взаємодії між білками та барвниками має важливе значення для виявлення механізмів зв'язування, розробки покращених методів та засобів візуалізації. Спектральні властивості мероціанінів проаналізовані в присутності бичачого сироваткового альбуміну (BSA), людського сироваткового альбуміну (HSA), кінського сироваткового альбуміну (ESA), овальбуміну (OVA) та лізоциму (LYS). Взаємодію оцінювали за зростанням інтенсивності флуоресценції мероціанінових барвників за присутності білків (таблиця 3.2).

Таблиця 3.2

Максимуми збудження та випромінювання флуоресценції для барвників **3.0 – 3.5** у вільному стані та в присутності білків (λ_{ex} – максимум збудження флуоресценції; λ_{em} – максимум випромінювання флуоресценції, QY – квантовий вихід флуоресценції)

Барвники	буфер			BSA			HSA			ESA		
	λ_{ex} , nm	λ_{em} , nm	QY	λ_{ex} , nm	λ_{em} , nm	QY	λ_{ex} , nm	λ_{em} , nm	QY	λ_{ex} , nm	λ_{em} , nm	QY
3.0	650	665	0.01	662	674	0,09	664	677	0,10	662	676	0,10
3.1	688	704	-	702	714	0.19	708	718	0.16	707	718	0.17
3.2	624	644	0.02	640	654	0.21	643	657	0.17	639	653	0.20
3.3	678	694	0.03	697	710	0.41	693	709	0.25	694	708	0.33
3.4	662	682	0.02	673	696	0.15	680	696	0.31	674	691	0.12
3.5	716	730	0.01	722	743	0.11	737	748	0.21	722	742	0.13

Додавання барвників до розчину альбумінів приводить до зміщення максимумів збудження та випромінювання флуорофорів у довгохвильову область спектру та зростанню квантових виходів та інтенсивності флуоресценції. Підвищення інтенсивності флуоресцентного сигналу спостерігається в

середньому у 5-14 разів за присутності BSA, в 6 - 24 і 7-13 разів в комплексі з HSA та ESA відповідно.

Як видно з рис. 3.9 барвник **3.2** демонструє найнижчу флуоресцентну відповідь на всі сироваткові альбуміни. Виявлена специфічність барвників до деяких альбумінів, зокрема, найбільше зростання інтенсивності флуоресценції спостерігається при взаємодії барвників з HSA.

В той же час, досліджувані барвники продемонстрували помітно менше зростання інтенсивності флуоресценції в присутності білків інших класів - овальбуміну та лізоциму. Наприклад додавання OVA приводить до збільшення інтенсивності флуоресценції в 1,5 – 7 разів, а LYS в 1 - 1,5 рази.

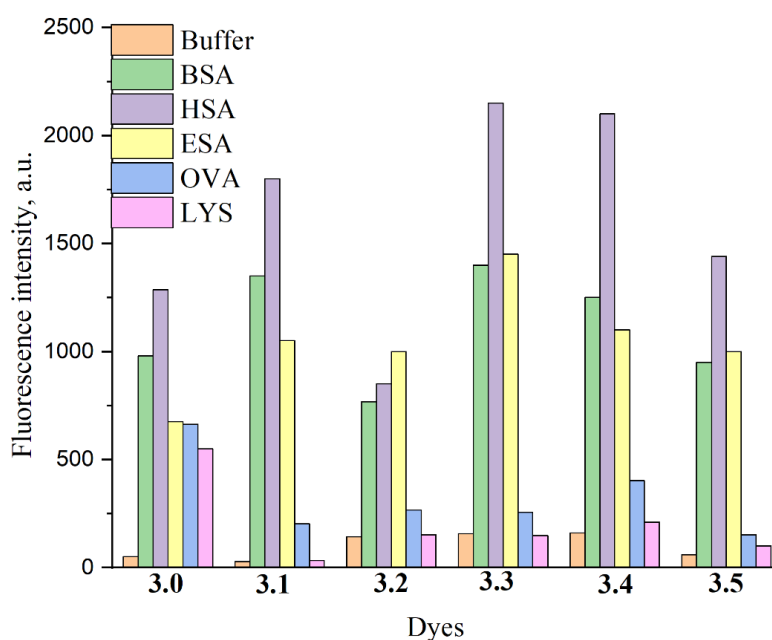


Рис. 3.9 Інтенсивності флуоресценції барвників **3.0 – 3.5** у водному буфері та в присутності білків

Крім того, спектральні характеристики не змінювалися при додаванні мероціанінових барвників до розчинів ДНК чи РНК, що свідчить про відсутність їх селективного зв'язування з нуклеїновими кислотами.

З літературних даних відомо, що мероціанінові барвники були раніше запропоновані як зонди для візуалізації агрегатів β -амілоїдних бляшок *in vivo*.

Вважається, що механізм їхнього зв'язування полягає в інтеркаляції в гідрофобні борозенки агрегованих амілоїдних фібрил. Мероціанінові барвники чутливі до змін в'язкості середовища через роторну поведінку поліметинового ланцюга.

На рис. 3.10 продемонстроване зростання інтенсивності флуоресценції досліджуваних барвників у гліцеролі, метанолі та буфері.

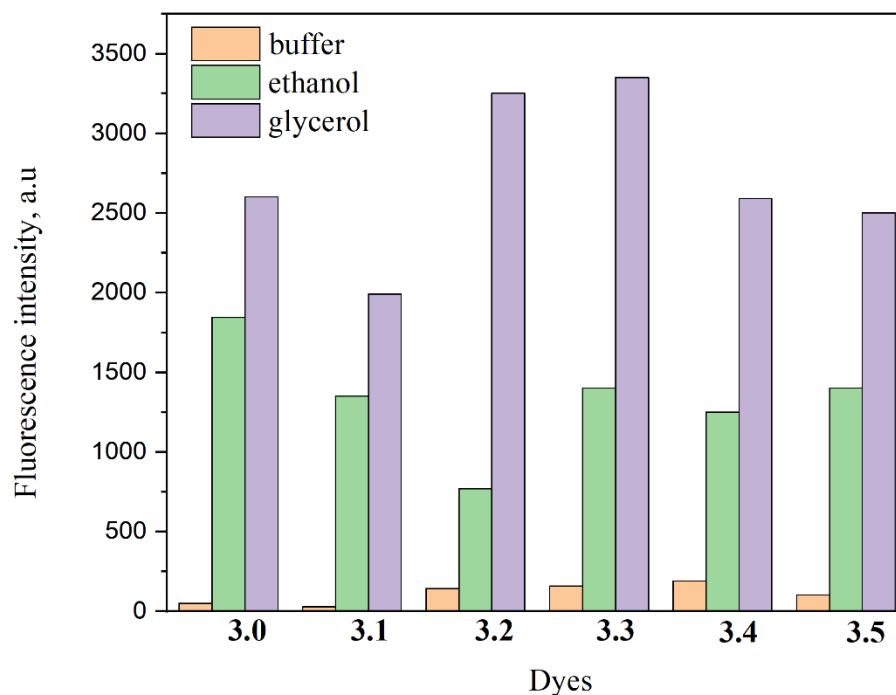


Рис. 3.10 Інтенсивності флуоресценції барвників **3.0 – 3.5** у буфері, метанолі та гліцеролі

Зростання інтенсивності флуоресценції у гліцеролі відбувається в середньому в 20 разів в порівнянні із флуоресценцією барвників у воді. Зміни флуоресценції при зростанні в'язкості середовища найбільш помітні для барвників, що схильні до агрегації у водному середовищі. Зокрема, для барвників **3.0** та **3.1** в наслідок руйнування агрегатів, спостерігається підвищення інтенсивності флуоресценції в 50 та 70 разів, відповідно. Таким чином, мероціаніни проявляють вищу інтенсивність флуоресценції зі збільшенням в'язкості середовища.

Можна припустити, що зв'язування досліджуваних мероціанінових барвників із сироватковими альбумінами відбувається через гідрофобне зв'язування барвника з гідрофобними ділянками поверхні білка. Оскільки сироваткові альбуміни мають схожу поверхневу структуру та виконують подібні транспортні функції, цілком зрозуміло, що ми бачимо зв'язування барвників, що приводить до збільшення інтенсивності флуоресценції за присутності всіх трьох досліджених альбумінів. Фіксація в гідрофобній кишені білка перешкоджає руху і обертанню поліметинового ланцюга молекул барвника. Для барвників із схильністю до агрегації іншим механізмом підвищення флуоресценції може бути руйнування слабофлуоресцентних агрегатів барвника за рахунок взаємодії з альбумінами та фіксації мономерної форми барвника.

На основі експериментальних даних були визначені константи зв'язування з HSA для барвників **3.0**, **3.3**, **3.4** та **3.5** (константи зв'язування, K_b) шляхом вимірювання інтенсивності флуоресценції барвників із фіксованою концентрацією (5 μM) при зростанні концентрації HSA від 0 до 4 мг/мл. Експериментальні дані були апроксимовані за допомогою рівняння (5) із припущенням, що кожна білкова глобула має n сайтів зв'язування барвника з однаковими константам зв'язування K_b . У результаті підгонки виявилось, що прийнятних значень n як параметра апроксимації отримати не вдалося. Тому обробку даних проводили з використанням фіксованих цілих значень кількості молекул флуорофору на глобулу HSA - n . Найкращу відповідність отримано для $n = 4$ для усіх барвників та оцінені константи зв'язування при даному фіксованому значенні n .

Як видно з таблиці 3.3, більші значення констант зв'язування були оцінені для барвників, що мають угруповання в мезо-положенні поліметинового ланцюга, які сприяють додатковим взаємодіям в гідрофобних кишенях альбуміну. Це підтверджує припущення про те, що найбільший вклад у зв'язування білок-барвник вносять саме гідрофобні взаємодії, які зменшують можливість перетворити накопичену енергію в механічне обертання.

Таблиця 3.3

Константи зв'язування барвників **3.3**, **3.4**, **3.5** з HSA

Барвники	$K_b \text{ M}^{-1}$
3.0	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^4$
3.3	$(1.1 \pm 0.3) \times 10^5$
3.4	$(6.2 \pm 0.4) \times 10^5$
3.5	$(4.3 \pm 0.3) \times 10^5$

Також ми припускаємо, що сайти зв'язування можуть містити позитивно заряджені групи аргініну та лізину, які будуть взаємодіяти з негативно зарядженими карбоксильними групами барвника та забезпечувати додаткове зв'язування в кишені.

3.4 Молекулярний докінг барвника 3.4 по всій поверхні молекули сироваткового альбуміну людини

Для того щоб ідентифікувати потенційні сайти зв'язування флуоресцентного барвника **3.4** із сироватковим альбуміном людини, проведено молекулярний докінг по всій поверхні молекули HSA за допомогою веб-сервера CB-DOCK (<http://clab.labshare.cn/cb-dock/php/index.php>).

Сироваткові альбуміни складаються з приблизно 580 амінокислотних залишків, із яких майже 67% знаходяться в α -спіралі. Глобулярна структура сироваткових альбумінів включає шість витків із 17 дисульфідними містками в повторюваній послідовності з 9 петель. Третинна структура сироваткових альбумінів складається з трьох доменів I, II і III аналогічної структури, кожен із яких містить субдомени A і B, що складаються з 4 і 6 α -спіралей, відповідно.

У результаті проведення молекулярного докінгу флуоресцентного зонда **3.4** по всій поверхні молекули сироваткового альбуміну людини ідентифіковано 5 найбільш імовірних кишень зв'язування (рис. 3.11).

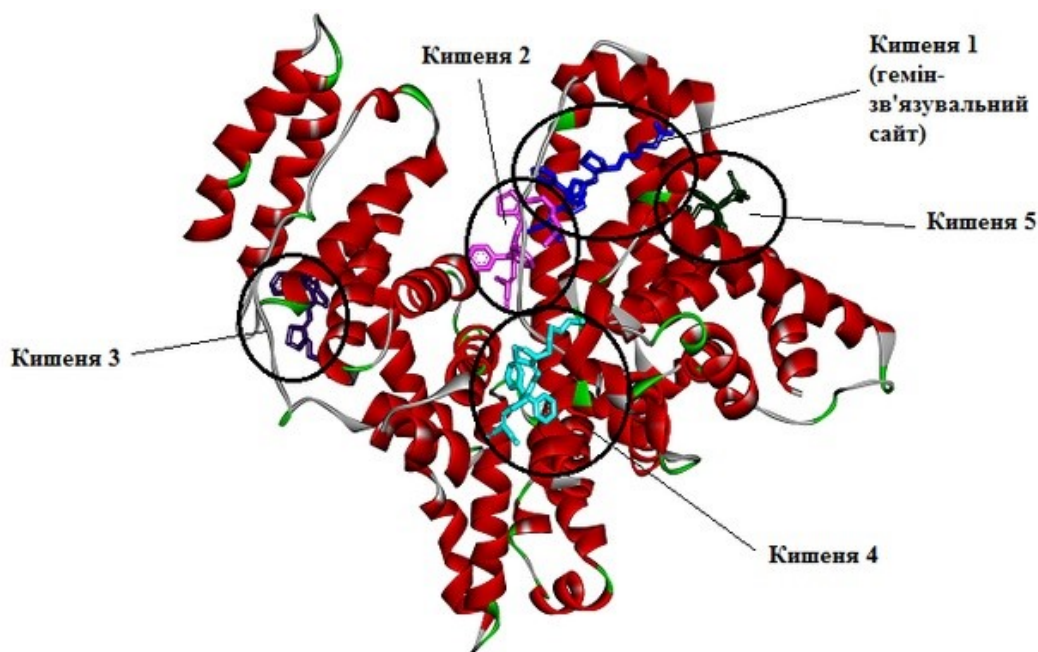


Рис. 3.11 Потенційні кишень зв'язування флуоресцентного барвника **3.4**. на поверхні молекули сироваткового альбуміну людини

Згідно з даними молекулярного докінгу найкраще значення скорингової функції (сума міжмолекулярних електростатичних та Ван-дер-Ваальсових взаємодій) виявлено для кишень 1, що є гемін-зв'язувальним сайтом і становить $-10,2$ ккал/моль. Значення скорингової функції для кишень 2, 3, 4 і 5 становлять відповідно $-7,9$ ккал/моль, $-7,8$ ккал/моль, $-7,7$ ккал/моль та $-6,4$ ккал/моль.

Детально досліджено комплекси флуоресцентного барвника із амінокислотними залишками передбачених кишень зв'язування.

Як видно з рис. 3.12, *a* сполука фіксується в гемін-зв'язувальному сайті (кишень 1) завдяки гідрофобним взаємодіям із амінокислотними залишками Leu182, Tyr138, Ile142, Arg186, Leu115 та Arg117. Як можна бачити з рис. 3.12, *б* молекула флуоресцентного зонду **3.4** в кишень 2 задіяна у формуванні гідрофобних взаємодій із амінокислотними залишками Arg114, Leu112, Pro110, His146, Lys190, а також утворює водневі зв'язки з His146 і Arg145 та π -аніон, π -катион взаємодії з Glu425 і Arg186, відповідно.

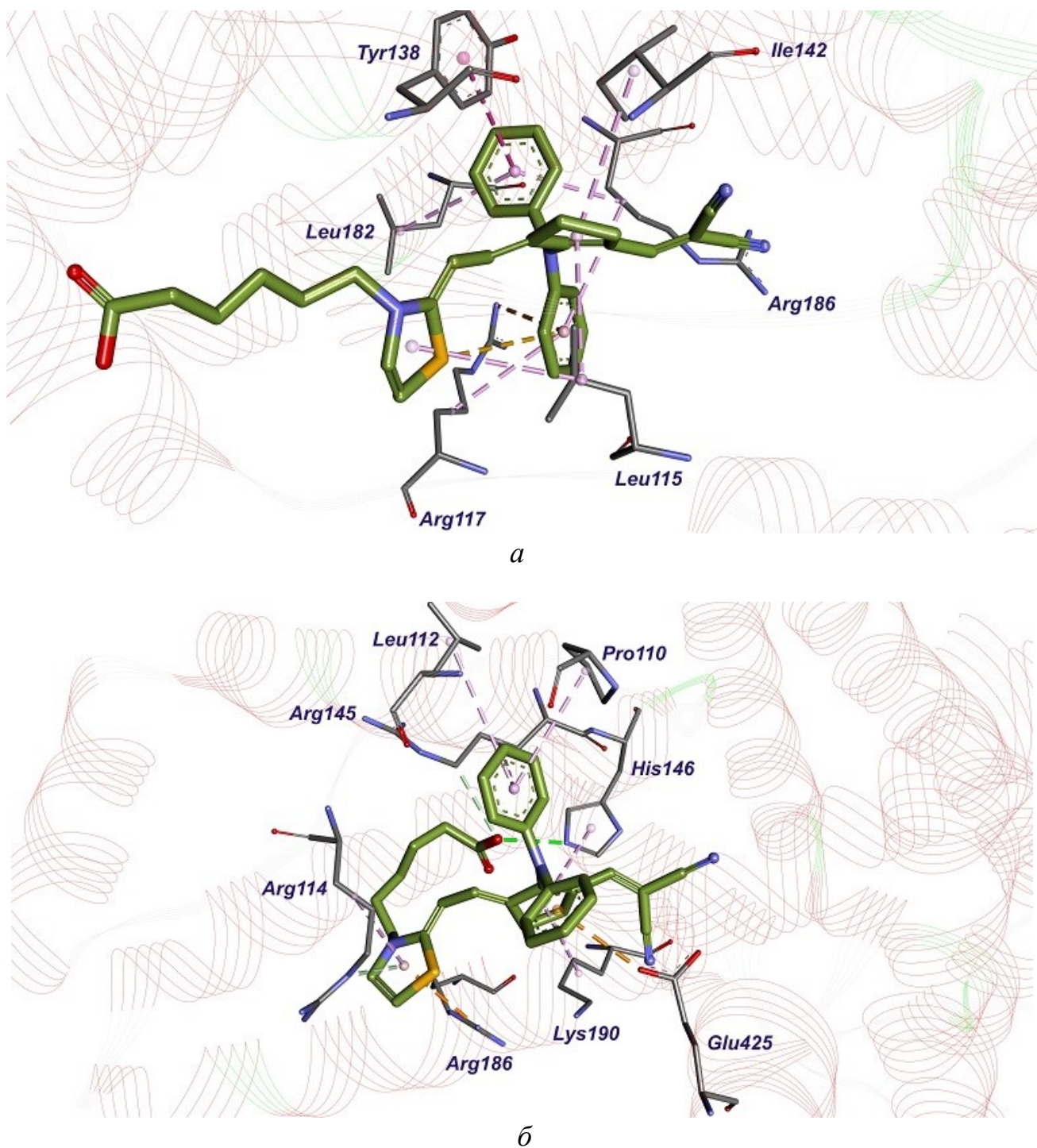
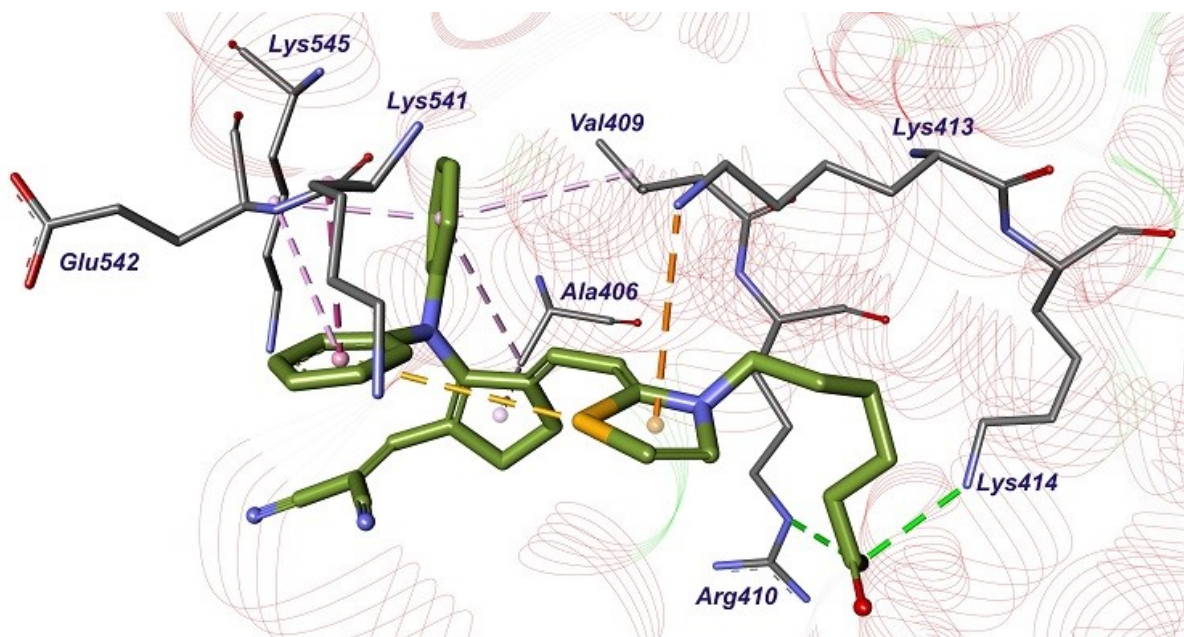
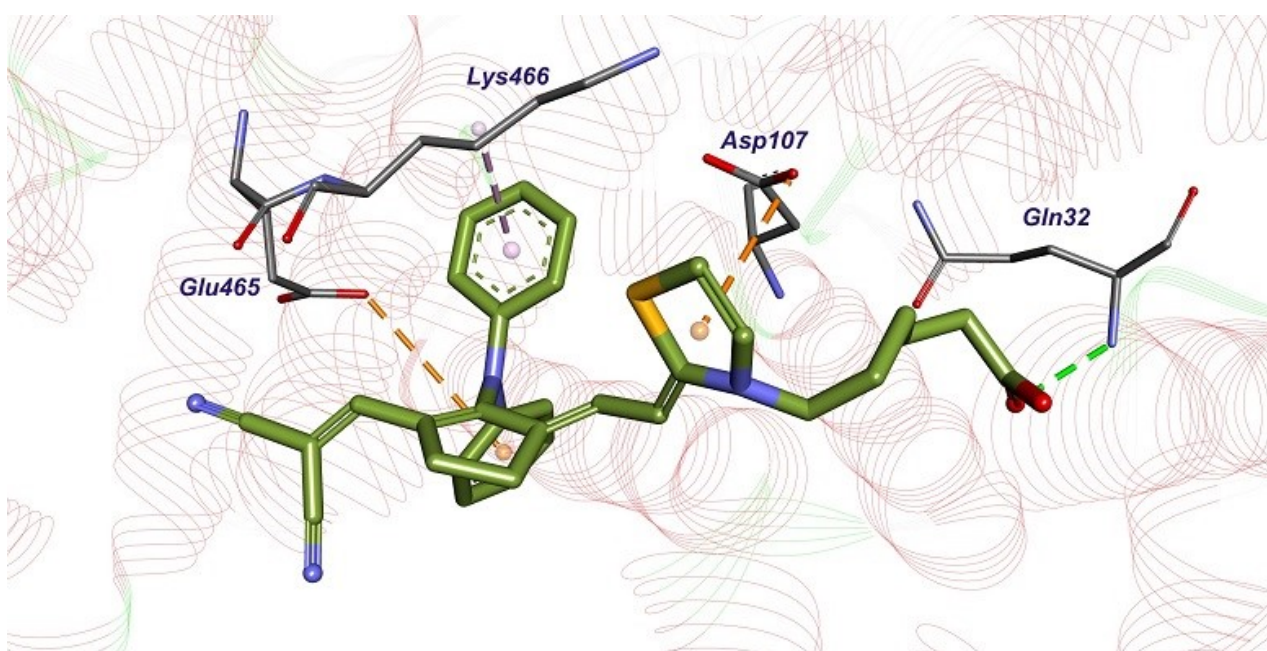


Рис. 3.12 Комплекси флуоресцентного барвника **3.4** із амінокислотними залишками в кишені 1 (*a*) та 2 (*б*)

На рис. 3.13 зображено комплекс флуоресцентного барвника **3.4** з амінокислотними залишками кишені 3 (*a*) та 4 (*б*).



a



б

Рис. 3.13 Комплекси флуоресцентного барвника **3.4** із амінокислотними залишками в кишені 3 (*a*) та 4 (*б*)

Барвник утворює гідрофобні взаємодії з Glu542, Lys545, Lys541, Ala406, Val409, а також π -катион взаємодію з Lys413 та водневі зв'язки з Arg410 і Lys414 в кишені 3 (рис. 3.13, *a*). У кишені 4 барвник **3.4** фіксується за участі π -аніон

взаємодій із Glu465, Asp107, гідрофобного контакту з Lys466 та утворює водневий зв'язок із Gln32 (рис. 3.13, б).

При аналізі комплексу флуоресцентного барвника з амінокислотними залишками кишені 5, на рис. 3.14, помітно, він утворює гідрофобні контакти з Lys162, Lys159, π -катион взаємодію з Lys159, π -аніон взаємодію з Glu17, а також водневі зв'язки з Lys159 та Glu132.

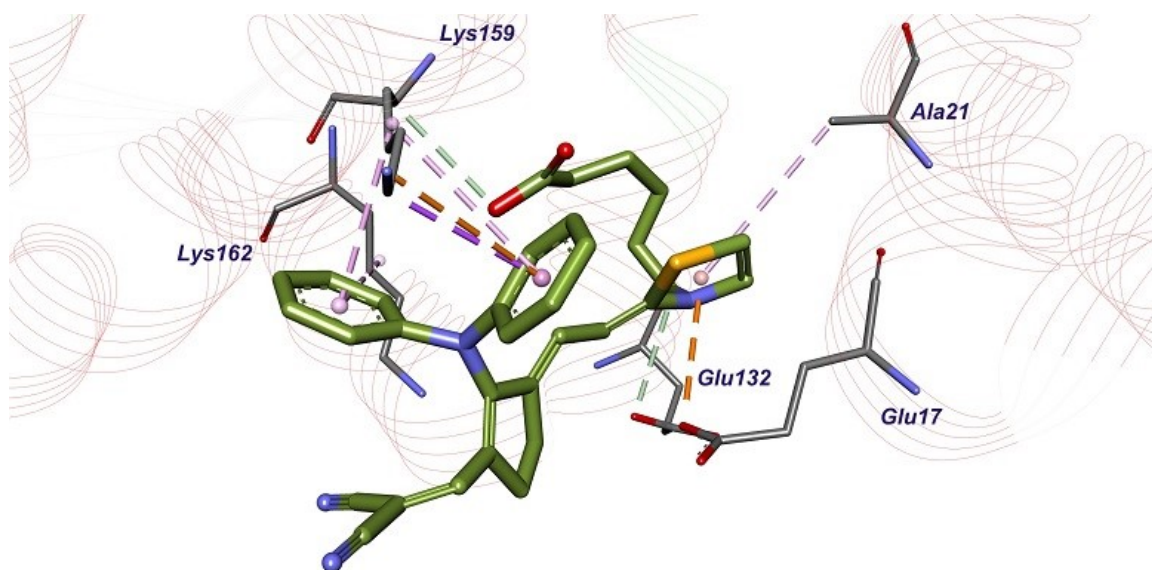


Рис. 3.14 Комплекси флуоресцентного барвника **3.4** із амінокислотними залишками в кишені 5

Гідрофобні взаємодії барвника **3.4** із амінокислотними залишками в кишенях альбуміну представлені фіолетовими пунктирними лініями, водневі зв'язки – зеленими пунктирними лініями, електростатичні – червоними пунктирними лініями, π -катион та π -аніон взаємодії – оранжевими пунктирними лініями.

Комплекс флуоресцентного барвника **3.4** в гемін-зв'язувальному сайті сироваткового альбуміну людини, отриманий за допомогою молекулярного докінгу, використаний для розрахунків молекулярної динаміки протягом 2 нс (рис. 3.15, а, б, в).

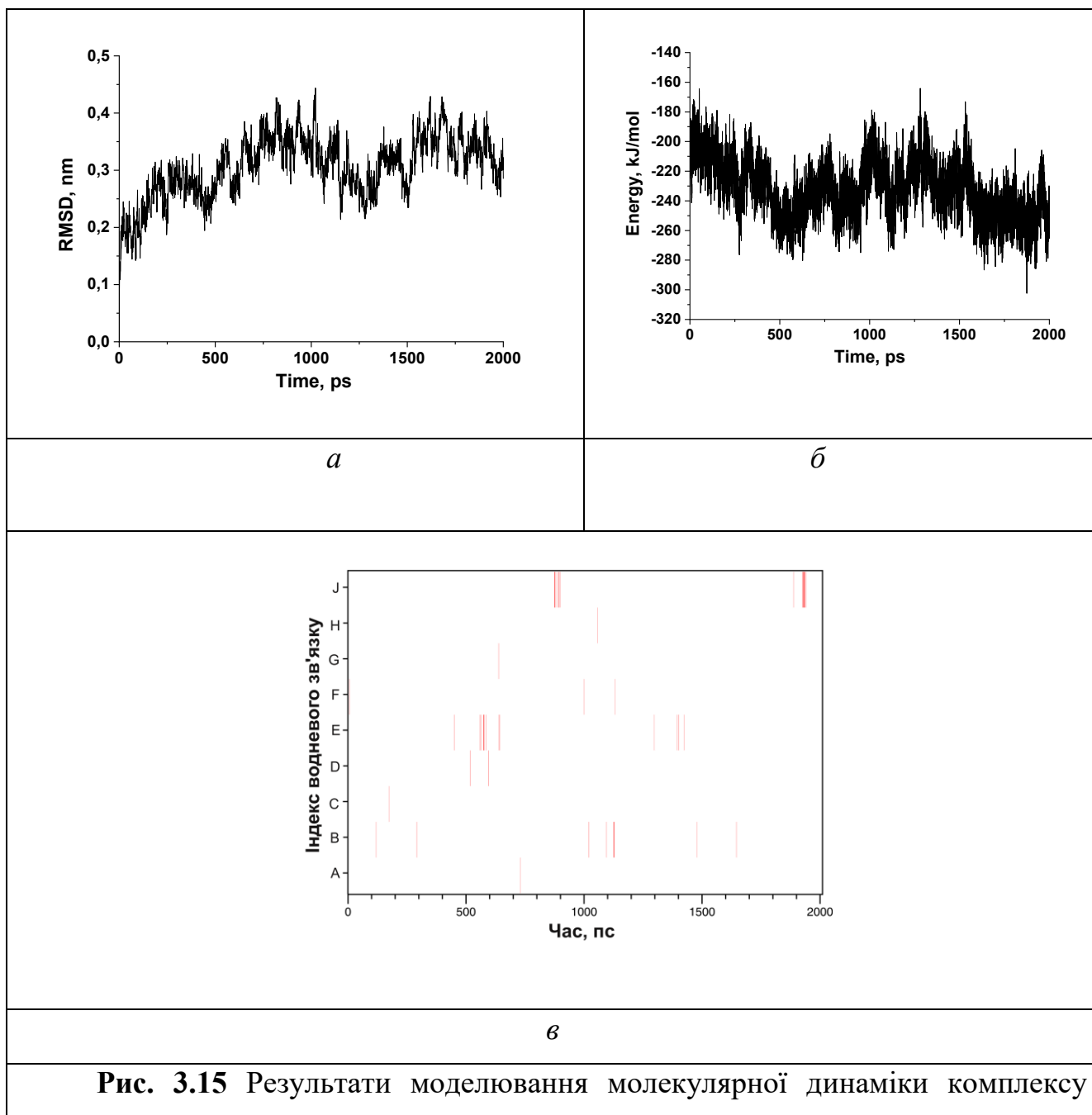


Рис. 3.15 Результати моделювання молекулярної динаміки комплексу сироваткового альбуміну людини із флуоресцентним барвником **3.4** в гемін-зв'язувальному сайті: середньоквадратичне відхилення ліганду від стартової позиції (*a*), значення суми міжмолекулярних електростатичних та Ван дер Ваальсових взаємодій (*б*) та карта водневих зв'язків: А – Lys161_NZ – O2 ліганду, В – Lys161_NZ – O1, С – Arg169_NE – N1, D – His170_NE2 – N1, E – His170_NE2 – N2, F – Arg210_NE – N2, G – Arg210_NH1 – N1, H – Arg210_NH2 – N1, J – Val140_O – O2 (*в*)

За результатами молекулярної динаміки виявилося, що комплекс є стабільним, не схильним до дисоціації, оскільки середньоквадратичне відхилення ліганда від стартової позиції коливається не в значних межах (рис. 3.15, *а*). При моделюванні комплексу протягом 2 нс спостерігається зниження середнього значення енергії, що є сумою міжмолекулярних електростатичних та Ван-дер-Ваальсових взаємодій, із -200 кДж/моль до -250 кДж/моль, що свідчить про стабілізацію комплексу (рис. 3.15, *б*). При аналізі карти водневих зв'язків виявилося, що флуоресцентний зонд **3.4** може короткочасно формувати водневі зв'язки з Lys161 (рис. 3.15, *в*, A, B), Arg169 (рис. 3.15, *в*, C), His170 (рис. 3.15, *в*, D, E), Arg210 (рис. 3.15, *в*, F, G, H), Val140 (рис. 3.15, *в*, J).

Отже, для досліджуваних мероціанінових барвників виявили чутливість до зміни в'язкості середовища, що проявилось у значному зростанні інтенсивності флуоресценції за рахунок утрудненого роторного обертання малонодінітрильного фрагменту барвника, а також руйнуванню нефлуоресцентних сендвічевих агрегатів, що утворюються у водному середовищі. Проте концентрація альбумінів, що використовувалася в ході експериментів, не підвищує в'язкість розчину настільки, щоб цього було достатньо для помітного зростання квантових виходів флуоресценції.

Роль альбуміну, скоріш за все, полягає у перешкоджанні асоціації барвників у водних розчинах [168]. Також, можна припустити, що альбуміни утворюють стійкі комплекси з барвниками, в яких флуорофор жорстко фіксується тільки у вигляді одного ізомеру. У випадку фіксації транс-ізомеру, відбувається різке зростання інтенсивності флуоресценції, тоді як у випадку цис-ізомера, навпаки, відбувається тушіння флуоресценції [169]. Ретельне дослідження взаємодії між альбуміном і барвниками має важливе значення для покращення методів та засобів візуалізації, оскільки зв'язування з білками плазми впливає на кінцеву фармакінетику і, отже, на біорозподіл.

3.5 Дослідження клітинної проникності барвників та їх цитотоксичності

Здатність мероціанінових барвників проникати та фарбувати живі клітини вивчали за допомогою проточної цитометрії, використовуючи лінію A2780. Контроль власної флуоресценції клітин проводився з використанням аліквоти ДМСО (Рис. 3.16, зелений профіль). Результати показали, що барвники **3.3**, **3.4** та **3.5** проникають у клітини. Це супроводжується зростанням інтенсивності флуоресценції у червоному спектральному діапазоні. Ватро зазначити, що барвник **3.1** не вдалося виявити, що можна пояснити як його слабкою флуоресценцією у водному буфері, так і непроникністю через клітинну мембрану. Барвник **3.2** також не візуалізувався, оскільки його максимум поглинання знаходиться за межами збудження червоного лазера даного приладу. Окрім того, необхідно відмітити, що дослід проводився у безсироватковому середовищі для культивування клітин, оскільки за присутності фетальної сироватки флуоресцентний сигнал барвників був низьким.

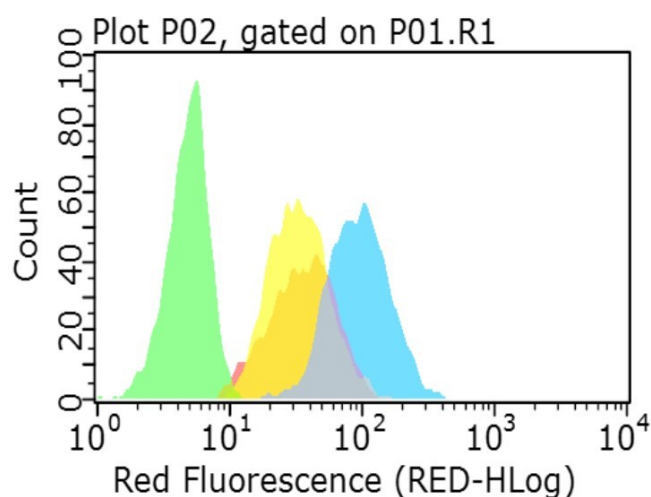


Рис. 3.16 Клітинна лінія A2780 пофарбована мероціаніновими барвниками: клітини оброблені ДМСО - зелений профіль, клітини оброблені **3.3**.- жовтий профіль, клітини оброблені барвником **3.4** – синій профіль та клітини з барвником **3.5**. – червоний профіль. Концентрація барвників 0.5 μM

Дослідження з використанням МТТ реагенту проводили для визначення цитотоксичного ефекту барвників використовуючи клітинну лінію MCF-7 (аденокарцинома молочної залози) (рис. 3.17). Оскільки проникненню барвників до клітини може заважати зв'язування із фетальною сироваткою, дослідження цитотоксичності проводили у безсироватковому середовищі для забезпечення максимальної проникності барвників у клітини. Інкубацію клітин з барвниками здійснювали протягом доби, в діапазоні концентрацій від 0.1 до 10 μM . Далі клітини промивали та додавали МТТ-реагент (20 мкл з концентрацією 5 мг/мл). Життєздатність клітин, інкубованих без обробки барвниками приймали за 100%. Для обох досліджуваних барвників не виявлено токсичного ефекту на клітини навіть при найвищих концентраціях.

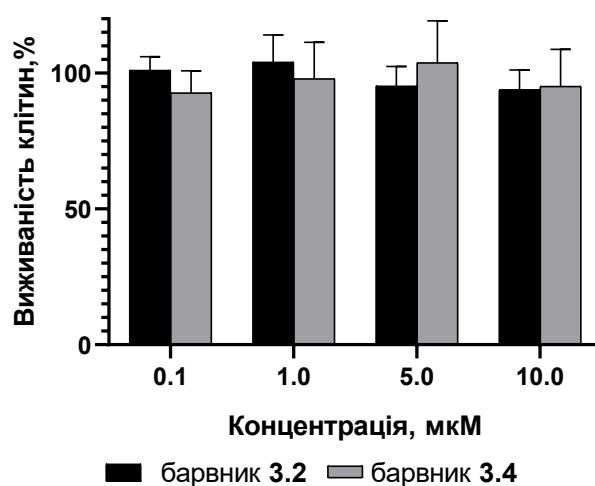


Рис. 3.17 Виживаність клітин лінії MCF-7 після інкубації 24 год з барвниками 3.3 та 3.4

Отже, барвники 3.3 та 3.4 проникають у клітини A2780, про що говорить зростання червоного флуоресцентного сигналу в проточному цитофлуориметрі, а також, за результатами МТТ-тесту, вони не проявляють токсичності по відношенню до клітин MCF-7 після 24-годинної інкубації в досліджуваному діапазоні концентрацій.

3.6 Флуоресцентна мікроскопія барвників 3.3 та 3.4 для фарбування клітин

Для фарбування живих клітин A2780 (карциноми яєчників), обрані два барвники 3.3 та 3.4, оскільки вони мали високу власну флуоресценцію. Клітини A2780 спершу інкубувалися 20 хвилин із барвниками 3.3 чи 3.4, концентрація яких складала 1 μM , далі додатково інкубувалися із мітохондріальним барвником - родаміном-123 та ядерним барвником Hoechst33342. Далі клітини двічі промивали буферним розчином PBS та додавали свіжу порцію HBSS (2 мл).

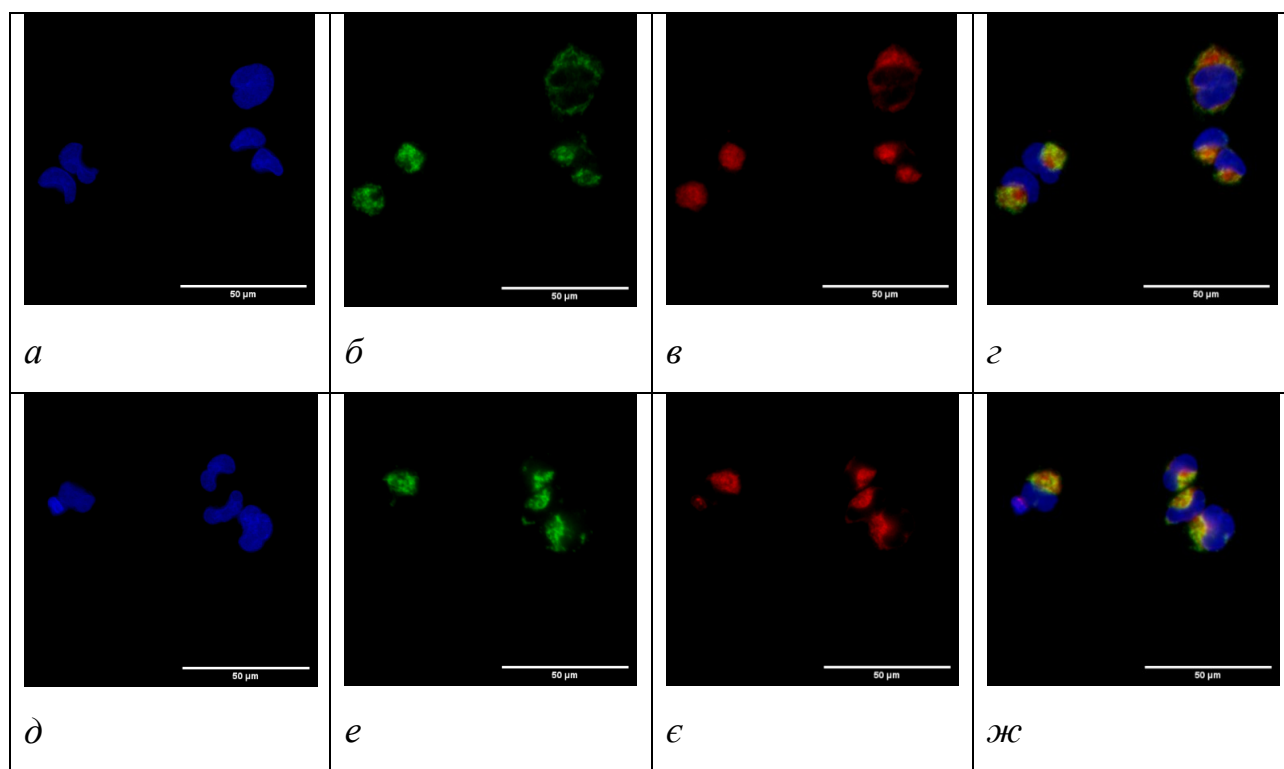


Рис. 3.18 Флуоресцентне зображення клітин A2780. Клітини забарвлені Hoechst 33342 (*a, д*), Rhodamine 123 (*б, е*), барвниками 3.3 (*в*) та 3.4 (*є*) та об'єднане зображення барвників з родаміном-123 та Hoechst 33342 (*г, ж*) Концентрація барвників - 1 μM

Флуоресцентні зображення зроблені за допомогою фільтрів: ex 625-655/em 665-715 nm (насичено-червоний) для виявлення досліджуваних барвників, ex

335-383/nm 420-470 nm (синій) для виявлення Hoechst3342, 450-490/nm та 500-550 nm (синій) для виявлення родамину-123 (рис. 3.18).

Як видно з рис. 3.18, барвники забарвлюють клітину, при цьому вони не є специфічними до ядра. Аналіз колокалізації на клітинах оброблених барвником **3.3** виявив більш низьке значення коефіцієнта кореляції Пірсона, що мав середнє значення $0,78 \pm 0,10$, тоді як для барвника **3.4** коефіцієнт кореляції Пірсона склав $0,85 \pm 0,05$. Ці результати вказують на те, що досліджувані барвники лише частково колокалізуються зі стандартним барвником для візуалізації мітохондрій.

Отже, спираючись на представлені результати, можна зробити висновок, що структура мезо-замісника в поліметиновому ланцюзі впливає не лише на спектральні властивості барвників, а також на їх здатність до нековалентної взаємодії із альбумінами. При порівнянні барвників із фенільними та дифеніламіновими групами виявлено, що зростання ліпофільності барвників спершу приводить до зростання констант зв'язування, але для найбільш ліпофільного барвника **3.5** значення константи зв'язування знижується. Можна припустити, що підвищення ліпофільності сприяє утворенню більш стійких асоціатів у водному середовищі, які не встигають зруйнуватися за присутності альбуміну в умовах експерименту.

Введення атому Хлору в барвник **3.1** приводить до батохромному зсуву максимумів поглинання та флуоресценції. Проте характерним для даного барвника стала поява яскраво вираженого нефлуоресцентного максимуму у водному середовищі, що відповідає утворенню Н-агрегатів. Вплив середовища на спектральні властивості флорофорів можна використовувати для різних хіміко-біологічних задач, проте тенденція до утворення стійких агрегатів у буфері барвника **3.1** не дозволяє використовувати його як реагент для біовізуалізації клітин.

Окрім впливу мезо-заміщення в поліметиновому ланцюзі, визначений вплив структури кінцевого гетероатому. Зокрема барвники **3.2** та **3.4** із

тіазолідиновим фрагментом продемонстрували найменшу схильність до утворення агрегатів у водному середовищі. Однак перевагою бензотіазолового фрагменту барвників **3.0**, **3.1**, **3.3** та **3.5** є зміщення їх максимумів поглинання в червону спектральну область.

Отже, серед представленого ряду мероціанінів найбільш перспективними виявилися барвники **3.3** та **3.4**, що мали гарну розчинність у водному буфері та високу власну флуоресценцію. Їх було досліджено як реагенти для візуалізації клітин A2750 за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Обидва барвники гарно проникали в клітину, частково колокалізувалися із мітохондріями, а також фарбували інші органиelli цитоплазми. Представлені барвники можуть використовуватися як потенційні реагенти для візуалізації клітин, а також як пришивочні зонди для вивчення біорозподілу невеликих молекул.

За результатами досліджень опубліковані наступні наукові праці:

Syniugina A., Chernii S., Losytskyy M., Syniugin A., Slominskii Y., Balanda A., Özkan G., Mokhir A., Kovalska V., Yarmoluk, S. “The synthesis and study of novel merocyanine probes for protein detection and cells visualization” *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 2021, 7, 100046; DOI:10.1016/j.jpap.2021.100046.

РОЗДІЛ 4

СКВАРАЇНОВІ БАРВНИКИ

До внутрішньоіонних барвників, окрім нейтральних, відносять також бетаїнові (цвіттер-йонні) барвники, в яких органічний катіон і аніон з'єднані між собою системою кон'югованих зв'язків, а їх позитивні та негативні заряди розподілені по атомах хромофору. Наявність різнойменних зарядів і можливість їх локалізації в різних частинах молекули обумовлює появу постійного дипольного моменту, але в цілому бетаїнові молекули є електронейтральними та існують без протийону. Типовими представниками бетаїнів є барвники на основі сквараїнової кислоти – сквараїнові (скварилієві) барвники. Представники цього класу знаходять широке застосування в біологічних та медичних дослідженнях, оскільки мають високі коефіцієнти молярної екстинкції та квантові виходи флуоресценції, фотостійкість та здатність взаємодіяти з біомакромолекулами. Окрім того, сквараїни також характеризуються здатністю до генерації активних форм Оксигену (АФО) під час опромінення світлом і активно досліджуються як фотосенсибілізатори у фотодинамічній терапії [173]. Інтенсивно розробляються методи модифікації хімічної структури сквараїнів для збільшення генерації $^1\text{O}_2$ і АФО. Зазначається, що завдяки плоскій та гідрофобній будові серйозною проблемою при використанні сквараїнових барвників є їх агрегація, що погіршує спектрально-люмінесцентні і фотодинамічні властивості. Розуміння агрегаційної поведінки барвників у розчині має важливе значення для оптимізації цих властивостей.

У процесі виконання дисертаційної роботи синтезовані та досліджені симетричні сквараїнові барвники з індоленіновими та бензіндоленіновими гетероциклами.

Індоленінові скварайнові барвники містили різні за ліпофільністю N,N'-замісники в гетероциклі (рис. 4.1). Зокрема, барвник **4.1** має бутилестерні групи, барвник **4.2** – четвертинні солі амонію, а барвник **4.3** – карбоксильні групи на кінцях N,N'-алкільних замісників, відповідно.

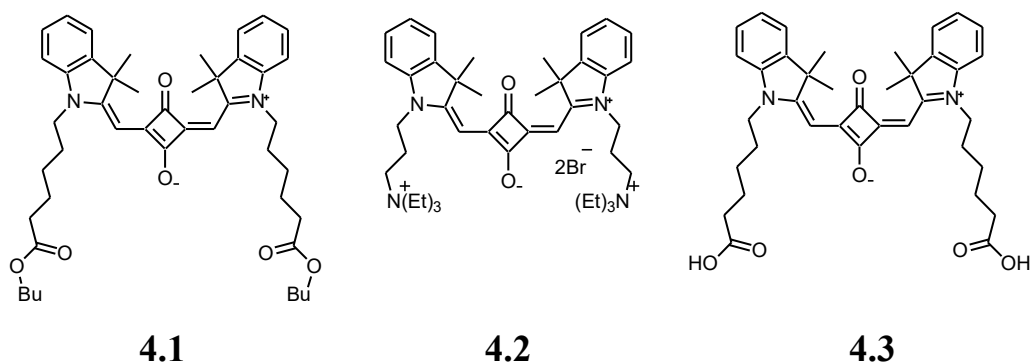


Рис. 4.1 Хімічні структури індоленінових скварайнів **4.1** – **4.3**

4.1 Синтез індоленінових скварайнів

Синтез симетричних індоленінових скварайнових барвників проілюстровано на рис. 4.2. Спершу комерційно доступний індоленін (**1**) алкілували 6-бромгексановою кислотою чи 3-бром-N,N-триетилпропан-1-аміній бромідом, щоб отримати відповідні четвертинні солі **2** і **3**. Далі проводили конденсацію між відповідними N-заміщеними солями індолю та скварайновою кислотою з отриманням барвників **4.1** та **4.2**. Барвник **4.3** синтезували гідролізом бутилового естеру **4.1** шляхом кип'ятіння у хлоридній кислоті.

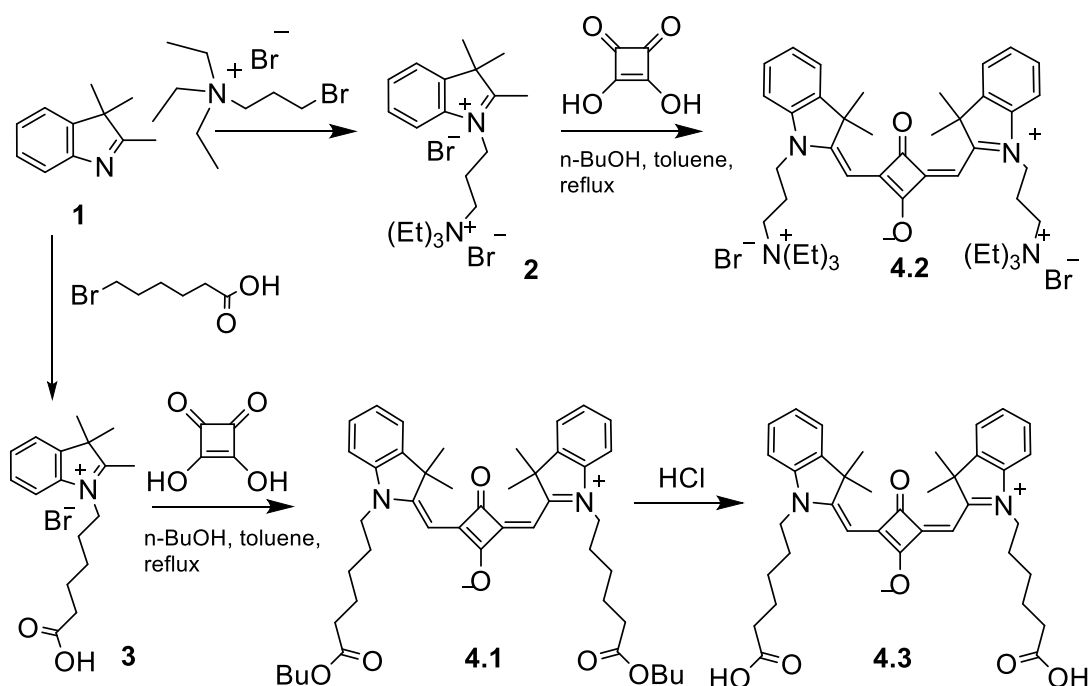


Рис. 4.2 Схема синтезу сквараїнових барвників 4.1 – 4.3

4.2 Спектрально-флуоресцентні властивості індоленінових сквараїнів

Спектральні властивості даного ряду барвників в спирті та водному буфері наведені у таблиці 4.1. У метанолі максимуми поглинання барвників знаходяться в області 631 - 633 нм. Барвники характеризуються високими значеннями молярних коефіцієнтів екстинкції ($2,5 - 3,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Для сквараїнового барвника 4.1 значення молярного коефіцієнта екстинкції суттєво зменшується у водному буфері, що може вказувати на його агрегацію у водному середовищі. Тоді як для барвника 4.2 значення молярних коефіцієнтів поглинання у воді зростають (таблиця 4.1).

Електронні спектри поглинання мають типову для органічних барвників універсальну форму смуги – інтенсивну, вузьку, асиметричну з коливальним максимумом на короткохвильовому спаді (рис. 4.3). Криві поглинання та випромінювання флуоресценції для барвників 4.2 та 4.3 у буферному розчині ідентичні кривим в метанолі (рис. 4.4, а), тоді як спектр поглинання барвника 4.1

у буфері змінюється: замість однієї різкої смуги з'являється широка смуга з двома максимумами при 603 та 639 нм (рис. 4.4, б).

Таблиця 4.1

Спектральні характеристики барвників **4.1** – **4.3** в метанолі та водному буфері (λ_{abs} – максимум поглинання, λ_{em} – максимум випромінювання, ε – молярний коефіцієнт екстинкції)

Барвники	метанол			буфер		
	λ_{abs} , nm	λ_{em} , nm	ε , $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	λ_{abs} , nm	λ_{em} , nm	ε , $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
4.1	631	648	3,1	603/639	645	0,8
4.2	633	645	2,5	625	640	3,4
4.3	631	645	3	624	642	2,1

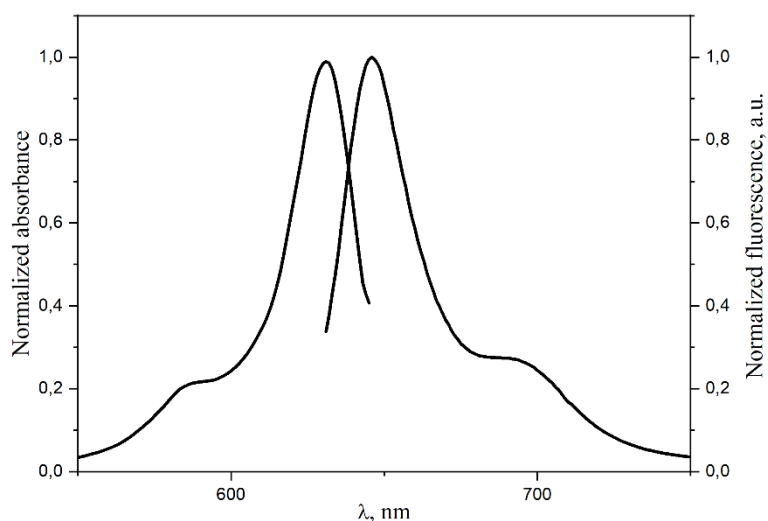


Рис. 4.3 Нормалізовані спектри поглинання (зліва) та флуоресценції (справа) в метанолі на прикладі барвника **4.1**

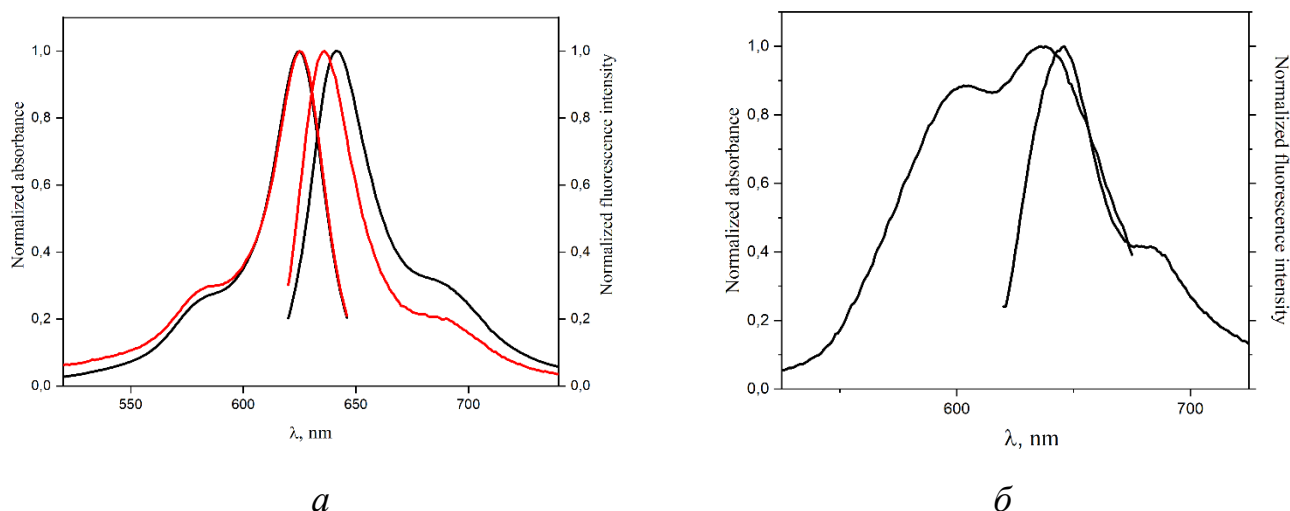


Рис. 4.4 Нормалізовані спектри поглинання та флуоресценції у буферному розчині барвників **4.2** (чорна лінія) **4.3** (червона лінія) (*a*) та барвника **4.1**. (*б*)

Крива флуоресценції при цьому залишається вузькою, що свідчить про флуоресценцію мономерних одиниць в розчині. Інтенсивність флуоресценції у водному середовищі зменшується для усіх барвників.

4.3 Спектральні властивості індоленінових сквараїнів в присутності білків

Спектральна поведінка барвників **4.1** – **4.3** змінюється в присутності бичачого сироваткового альбуміну. При додаванні до розчину альбуміну барвника **4.3** відбувається зростання його квантового виходу флуоресценції, батохромне зміщення максимумів поглинання та флуоресценції на 16 та 13 нм, відповідно (таблиця 4.2).

При додаванні барвника **4.1** до розчину BSA максимум поглинання в короткохвильовій області, що утворюється в результаті агрегації барвника в буферному розчині, зменшується і відбувається зростання довгохвильового максимуму, що говорить про руйнування агрегатів та перехід молекул барвника у мономерний стан (рис. 4.5). В результаті утворення нефлуоресцентних

агрегатів барвник **4.1** має слабку емісію у водному буфері, проте інтенсивність та квантовий вихід флуоресценції зростають за присутності альбуміну.

Таблиця 4.2

Спектральні характеристики барвників **4.1** – **4.3** в буферному розчині та в присутності альбуміну (λ_{abs} – максимум поглинання, λ_{em} – максимум випромінювання, QY – квантовий вихід флуоресценції)

Барвники	буфер			BSA		
	λ_{abs} , nm	λ_{em} , nm	QY	λ_{abs} , nm	λ_{em} , nm	QY
4.1	603/639	645	---	639	646	0.12
4.2	625	640	0.04	625	642	0.06
4.3	624	642	0.03	640	655	0.29

Найбільш яскравим виявився барвник **4.2**. Проте присутність альбуміну практично не вплинула на його спектральні властивості. Зокрема, положення та інтенсивність його максимумів поглинання та флуоресценції не змінюються, а зростання квантового виходу флуоресценції незначне.

На основі отриманих значень інтенсивностей флуоресценції барвників при зростанні концентрації BSA (при сталій концентрації барвників 5 μM), оцінені константи зв'язування флуорофорів із бичачим альбуміном. Значення констант зв'язування (Таблиця 4.3) розраховані при фіксованому $n = 1$. Невелика відмінність констант зв'язування **4.3** та **4.1** говорить про схожий механізм зв'язування. В той же час для барвника **4.2** значення K_b виявилось суттєво меншим.

Отже, в результаті взаємодії барвника **4.1** із бичачим альбуміном, спостерігається зміна спектрів поглинання та зростання інтенсивності

флуоресценції за рахунок руйнування агрегатів барвника та його перехід в мономолекулярну форму.

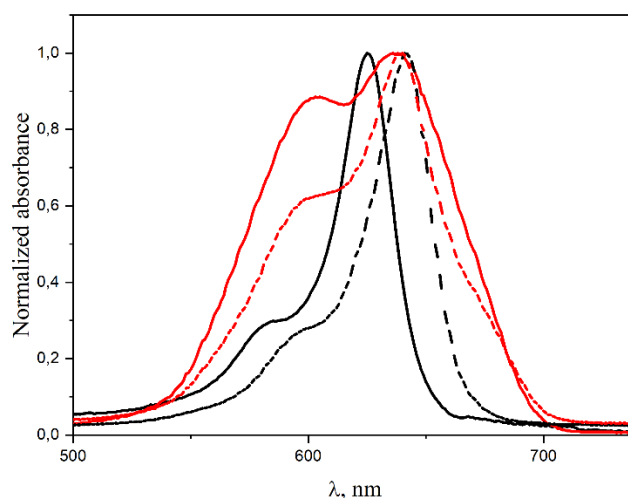


Рис. 4.5 Зміни форми спектрів поглинання в буферному розчині (суцільна лінія) та за присутності BSA (пунктирна лінія) для барвників **4.1** (червона лінія) та **4.3** (чорна лінія)

Жорстка фіксація молекул в гідрофобних кишнях альбуміну приводить до зростання квантового виходу барвника практично в 12 разів і його комплекс з BSA є найміцнішим, про що говорить найвище значення константи зв'язування. Зростання квантового виходу барвника **4.3** при взаємодії з альбуміном відбувається в 10 разів.

Таблиця 4.3

Константи зв'язування барвників **4.1** – **4.3** з BSA

Барвники	K_b, M^{-1}
4.1	$(5,3 \pm 1,4) \cdot 10^5$
4.2	$(6,7 \pm 1,3) \cdot 10^3$
4.3	$(3,4 \pm 0,4) \cdot 10^5$

Невелика відмінність між значеннями констант зв'язування барвників **4.1** та **4.3** говорить про схожий механізм зв'язування. В той же час ми припускаємо,

що позитивно заряджені N,N'-бічні замісники барвника **4.2** утворюють на поверхні альбуміну електростатичні взаємодії і не проникають всередину білкової глобули, або виштовхуються із її гідрофобних кишень, про що свідчить найменше значення константи зв'язування із BSA.

4.4 Флуоресцентна мікроскопія барвників **4.1** – **4.3** для фарбування ракових клітин

На клітинній лінії A2780 за допомогою флуоресцентної мікроскопії досліджена проникність барвників в клітину (концентрація барвників становила 1 μM). При однакових налаштуваннях мікроскопа сигнал барвника **4.1** був зареєстрований в клітинах, сигнал барвника **4.3** спостерігався лише при зміні налаштувань, а барвник **4.2** в клітині не візуалізувався. Для вивчення внутрішньоклітинної локалізації барвника **4.1**, в клітини вводився також стандартний барвник Hoechst, що зв'язується з ядерною ДНК та зелений флуоресцентний мітохондріально-специфічний барвник MitoTracker Green (рис. 4.6).

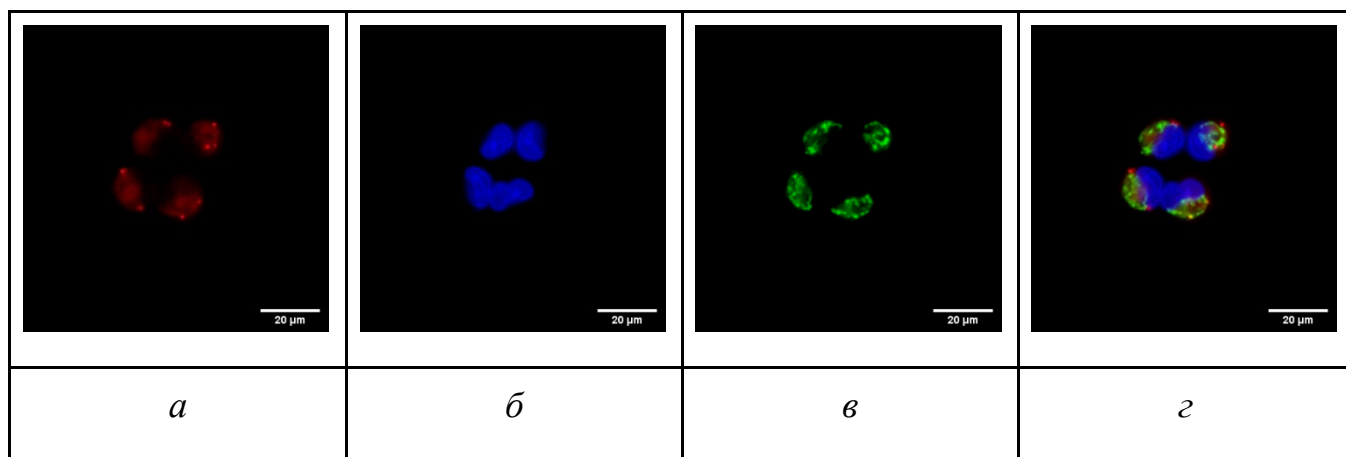


Рис. 4.6 Флуоресцентне зображення клітин A2780. Клітини забарвлені барвником **4.1** (*a*), Hoechst 33342 (*б*), MitoTracker Green (*в*), та об'єднане зображення (*г*). Концентрація барвників - 1 μM

Як видно з рис. 4.6 барвник **4.1** локалізується у цитоплазмі і не проникає в ядро – спільної локалізації з барвником ядерної ДНК не спостерігається, також він не виявив спільної локалізації з барвником MitoTracker Green.

За допомогою конфокальної мікроскопії досліджена проникність сквараїнів до клітин MCF-7 за концентрації барвників 5 μM (рис. 4.7).

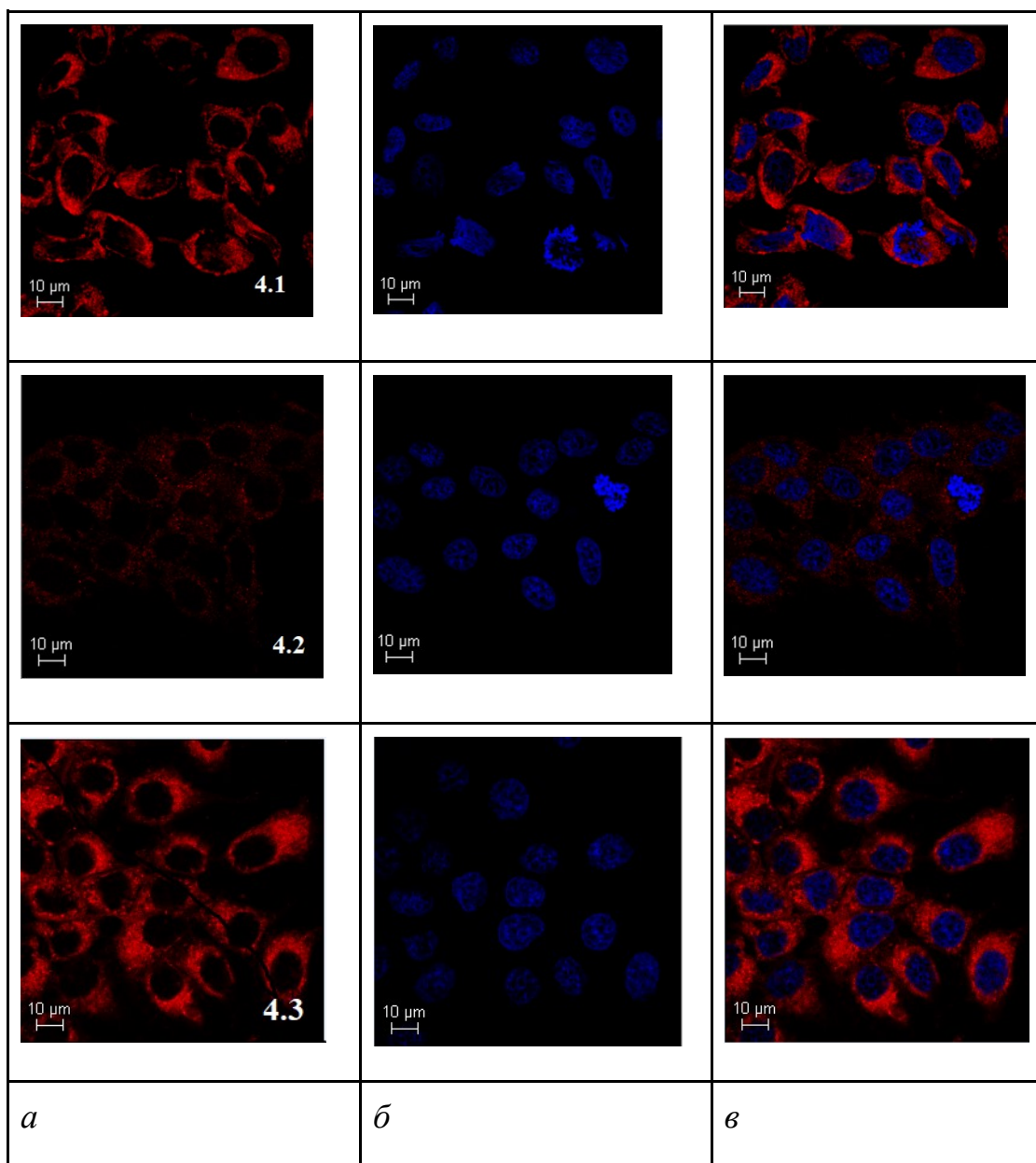


Рис. 4.7 Конфокальне зображення клітин MCF-7. Клітини забарвлені барвниками 4.1, 4.2 та 4.3 (*a*), клітини з барвником Hoechst 33342 (*б*) та об'єднане зображення (*в*). Концентрація барвників - 5 μM

Барвники **4.1** та **4.3** проникають до клітини, локалізуються в цитоплазмі та не проникають в ядро. Однак, сигнал барвника **4.2**, що спостерігався в клітинах,

залишався слабким навіть за концентрації 5 μM . Можливо це пов'язано із об'ємними N,N'-бічними групами барвника **4.2**, що стерично утруднюють проникнення молекули через мембрану клітин. Також, через сольову форму барвника і, відповідно, гарну розчинність у воді, можливе його вимивання під час промивки клітин протягом експерименту.

4.5 Спектрально-флуоресцентні властивості бензіндоленінових скварайнів

У роботі дослідили низку бензоіндоленінових скварилієвих барвників з гідрофобними (**4.4** – **4.6**) та гідрофільним (**4.7**, **4.8**) N,N'-замісниками при гетероатомі (рис. 4.8).

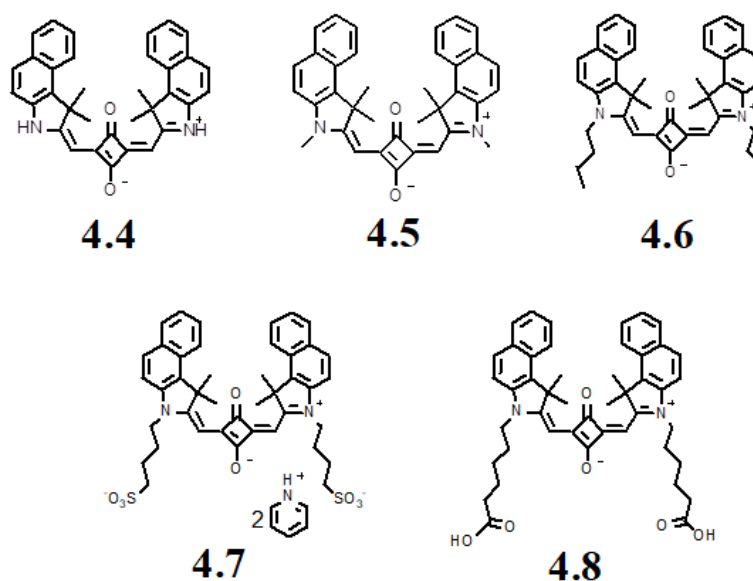


Рис. 4.8 Хімічні структури бензіндоленінових скварайнів **4.4** – **4.8**

Вибір бензоіндоленінового гетероциклу обумовлений тим, що барвники на його основі мають низьку токсичність, зокрема широкоживаний у медицині indocyanine green (ICG), задовільно розчинні у фізіологічному розчині і мають високі квантові виходи флуоресценції.

Введення ароматичного кільця в гетероцикл флуорофору очікувано приводить до батохромного зміщення максимуму поглинання бензіндольних барвників порівняно з індоленіновими сквараїнами. Наприклад, максимум поглинання бензіндольного барвника **4.8** із карбоксильними групами в N,N'-алкільному заміснику батохромно зміщується на 23 нм в порівнянні з його індоленіновим аналогом - барвником **4.3**. Усі обрані барвники в метанолі поглинають в області 660 – 680 нм, молярні коефіцієнти екстинкції барвників **4.4** – **4.6** знаходяться в діапазоні $(0,41 - 0,87) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Наявність гідрофільних сульфо- і карбоксильних груп в N,N'-алкільних замісниках приводить до зростання молярних коефіцієнтів екстинкції і становлять для барвників **4.7** та **4.8** $1,87 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ та $2,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, відповідно.

На рис. 4.9 наведено спектри поглинання досліджуваних барвників у метанолі (а) та буфері (б).

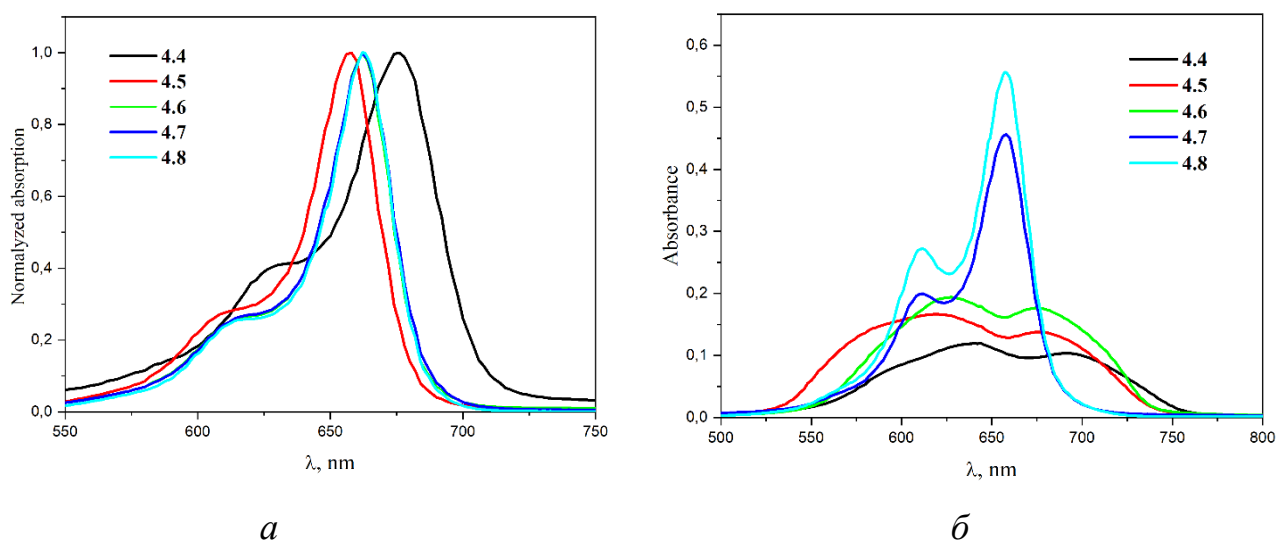


Рис. 4.9 Спектри поглинання досліджуваних флуорофорів у метанолі (нормовані спектри, а) та у водному буфері із рН 7,9 (б)

Спектри досліджуваних барвників у метанолі мають схожі форми кривих поглинання із інтенсивним максимумом і слабким короткохвильовим плечем, що характерно для мономерної форми (рис. 4.9, а). Спектр барвника **4.4** найбільш помітно відрізняється як за формою так і за розташуванням максимуму

поглинання. Скоріш за все це пов'язано із можливістю утворення внутрішньомолекулярних водневих зв'язків між атомами Гідрогену та Оксигену.

У буферному розчині (рис. 4.9, б) криві спектрів поглинання барвників **4.4**, **4.5** та **4.6** зазнають змін, які є характерними для сполук із гідрофобними замісниками. А саме, замість однієї різкої смуги з'являються дві широкі смуги, що зміщені на 30-40 нм у короткохвильову та довгохвильову область в порівнянні із максимумом поглинання в метанолі. В той же час для флуорофорів, що містять N,N'-алкілсульфонатні (**4.7**) чи N,N'-алкілкарбоксильні (**4.8**) групи, форми спектрів поглинання в буфері подібні до таких в метанолі, за винятком появи більш вираженого короткохвильового мінорного максимуму при 612 нм для барвника **4.7** та 611 нм для барвника **4.8**. Отже, агрегація даних барвників у буфері є менш інтенсивною, через наявність подвійних негативних зарядів карбоксильних та сульфонатних груп, які викликають кулонівське відштовхування молекул, що є руйнівним для агрегації флуорофорів.

Важливим для біологічного використання є дослідження розчинності у водному середовищі та виявлення внеску агрегації барвників у їх спектральні характеристики. Усі флуорофори з гідрофобними замісниками (**4.4**, **4.5** та **4.6**) проявили схожу концентраційно-залежну поведінку у водному розчині. На рис. 4.10 показана залежна від концентрації агрегація на прикладі флуорофору **4.5**.

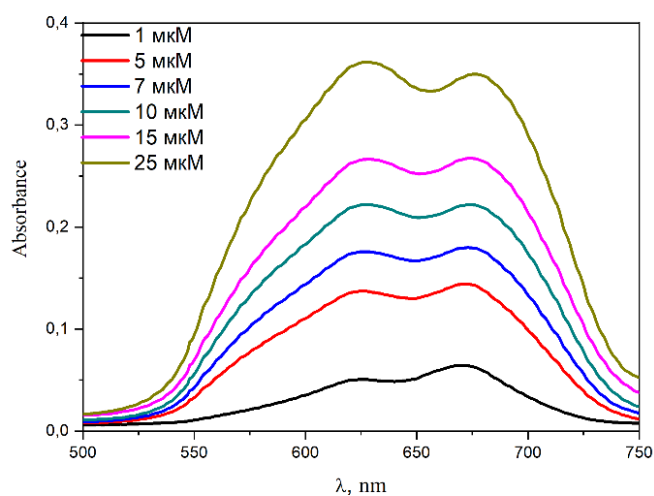


Рис. 4.10 Залежна від концентрації агрегація барвника **4.5** (1–25 μM) та відповідні зміни спектру поглинання

Збільшення концентрації від 1 μM до 25 μM при 20°C спричинює перехід між мономерним (λ_{max} при 670 нм) і агрегованим станом (λ_{max} при 624 нм). При нижчих концентраціях, починаючи з 1 μM , мономерна форма домінує у спектрі поглинання. При концентрації 7 μM оптична густина мономерного та агрегованого максимумів барвника знаходяться в рівновазі. Це може вказувати на термодинамічну рівновагу між мономерним і агрегатним станами. Від 10 μM у спектрі домінує агрегована форма.

4.6 Спектрально-флуоресцентні властивості бензіндоленінових скварайнів в присутності глобулярних білків

При порівнянні флуоресцентних властивостей у буферному середовищі представленого ряду барвників були виявлені низькі значення інтенсивності флуоресцентного випромінювання скварайнів **4.4**, **4.5** і **4.6**, що зумовлено утворенням нефлуоресцентних агрегатів у водному розчині (таблиця.4.4). Тоді як інтенсивність флуоресценції барвників **4.7** та **4.8**, які перебувають переважно у формі мономеру, значно вища. Максимуми збудження флуоресценції досліджуваних барвників знаходяться в діапазоні 662-673 нм, а максимуми випромінювання знаходяться в області 675 - 690 нм, з невеликими Стоксовим зсувом (12-17 нм).

Оскільки представлені скварайнові барвники поглинають в ближньому інфрачервоному спектральному діапазоні, вони можуть застосовуватися як потенційні фотосенсибілізатори для фотодинамічної терапії, а також як оптичні агенти для біовізуалізації. Одним із механізмів доставки фотосенсибілізаторів в ракову клітину є їх нековалентна взаємодія із альбумінами крові. Такий комплекс білок-барвник може накопичуватися в пухлині в наслідок ефекту полегшеного проникнення за рахунок пасивної дифузії (ЕПР) через характерні для пухлин капілярні пори збільшеного розміру та підвищеного метаболізму ракових клітин. Тому важливим є аналіз взаємодії барвників із білками різної будови.

Усі досліджувані барвники показали підвищення інтенсивності флуоресценції в присутності сироваткових альбумінів (таблиця 4.4). Найбільше зростання спостерігалось для барвника із метильними замісниками при гетероатомі - **4.5** (588, 169 і 460 разів для BSA, HSA і ESA, відповідно).

Таблиця 4.4

Спектральні властивості барвників у буфері та за присутності сироваткових альбумінів. (λ_{ex} – максимум збудження флуоресценції, λ_{em} - максимум випромінення флуоресценції, I – інтенсивність флуоресценції)

Барвники	буфер			BSA				HSA				ESA			
	λ_{ex} , nm	λ_{em} , nm	I_0 , a.u.	λ_{ex} , nm	λ_{em} , nm	I_{BSA} , a.u.	I_{BSA}/I_0	λ_{ex} , nm	λ_{em} , nm	I_{HSA} , a.u.	I_{HSA}/I_0	λ_{ex} , nm	λ_{em} , nm	I_{ESA} , a.u.	I_{ESA}/I_0
4.4	665	678	4,6	684	698	64	13,9	671	675	105	22,8	681	686	338	73,5
4.5	673	690	2,7	666	671	1600	588	668	674	461	169	667	673	1250	460
4.6	668	682	18,8	670	680	162	8,6	672	680	125	6,6	672	678	367	19,5
4.7	662	675	675	682	692	5250	10,5	678	688	4700	9,4	682	688	3850	7,7
4.8	661	672	672	682	690	5600	8,2	680	687	5000	7,3	683	687	5200	7,6

Сполуки **4.4** та **4.6** продемонстрували специфічність до ESA (73,5 і 19,5 разів, відповідно). Цікаво відзначити, що незважаючи на близьку структуру, BSA, HSA та ESA, барвники **4.4**, **4.5** та **4.6** по-різному реагують на присутність досліджуваних сироваткових альбумінів. Барвники **4.7** та **4.8** продемонстрували практично однакове зростання інтенсивності флуоресценції у присутності BSA, HSA та ESA, проте це зростання виявилось нижчим, ніж для перших трьох сполук. Це можна пояснити значно вищою власною флуоресценцією даних барвників.

Усі представлені бензіндоленінові сквараїни проявили помітно нижчу інтенсивність флуоресценції в присутності OVA, який структурно відрізняється від сироваткових альбумінів (таблиця 4.5). Винятком є барвник **4.5**, для якого було виявлено 102-кратне збільшення випромінювання флуоресценції в комплексах з OVA. Для інших флуорофорів зростання інтенсивності флуоресценції в присутності OVA не перевищувало 29,6 разів. Флуоресцентна відповідь досліджуваних барвників на лізоцим також сильно відрізнялася: підвищення інтенсивності флуоресценції спостерігалось в 67 разів у випадку барвника **4.5**, але в 2,4 рази для інших трьох сполук.

Таблиця 4.5

Спектральні властивості флуорофорів у буфері та за присутності глобулярних білків (λ_{ex} – максимум збудження флуоресценції, λ_{em} – максимум випромінювання флуоресценції, I – інтенсивність флуоресценції)

Барвники	LYS				BLG				OVA			
	λ_{ex} , nm	λ_{em} , nm	I_{LYS} , a.u.	I_{LYS}/I_0	λ_{ex} , nm	λ_{em} , nm	I_{BLG} , a.u.	I_{BLG}/I_0	λ_{ex} , nm	λ_{em} , nm	I_{OVA} , a.u.	I_{OVA}/I_0
4.4	693	705	11,2	2,4	683	698	15,7	3,4	675	678	123	26,7
4.5	660	671	181	67	669	677	15	5,5	673	676	277	102
4.6	673	678	20,5	1,1	675	689	18,6	0,99	674	680	557	29,6
4.7	662	674	675	1,3	662	674	812	1,6	677	681	1700	3,4
4.8	661	673	760	1,1	676	681	1500	2,2	676	682	2000	2,9
4.4	693	705	11,2	2,4	683	698	15,7	3,4	675	678	123	26,7

Для всіх представлених сквараїнів присутність BLG призводила лише до незначного підвищення інтенсивності флуоресценції (до 5,5 разів). Нарешті, для усіх досліджуваних сполук не виявлений спектральний відгук на присутність ДНК чи РНК, що свідчить про можливість їх застосування як ФС для ФДТ, оскільки взаємодія ФС із ДНК може призводити до появи онкогенних мутацій.

Для найбільш чутливого та специфічного до сироваткових альбумінів барвника **4.5** ретельно досліджений вплив його взаємодії з альбуміном. Для цього виміряні спектри поглинання (рис. 4.11, а) та флуоресценції (рис. 4.11, б) за присутності BSA в концентраціях від 0 до 30 μM . Зі збільшенням концентрації

BSA спостерігається перерозподіл між максимумами поглинання агрегатної форми барвника (при 618 нм) і його мономерної форми (при 676 нм). Таким чином, спостерігаємо зростання піку мономерної форми барвника зі збільшенням концентрації білка, а пік агрегованої форми (618 нм) набуває форми плеча основного піку (676 нм).

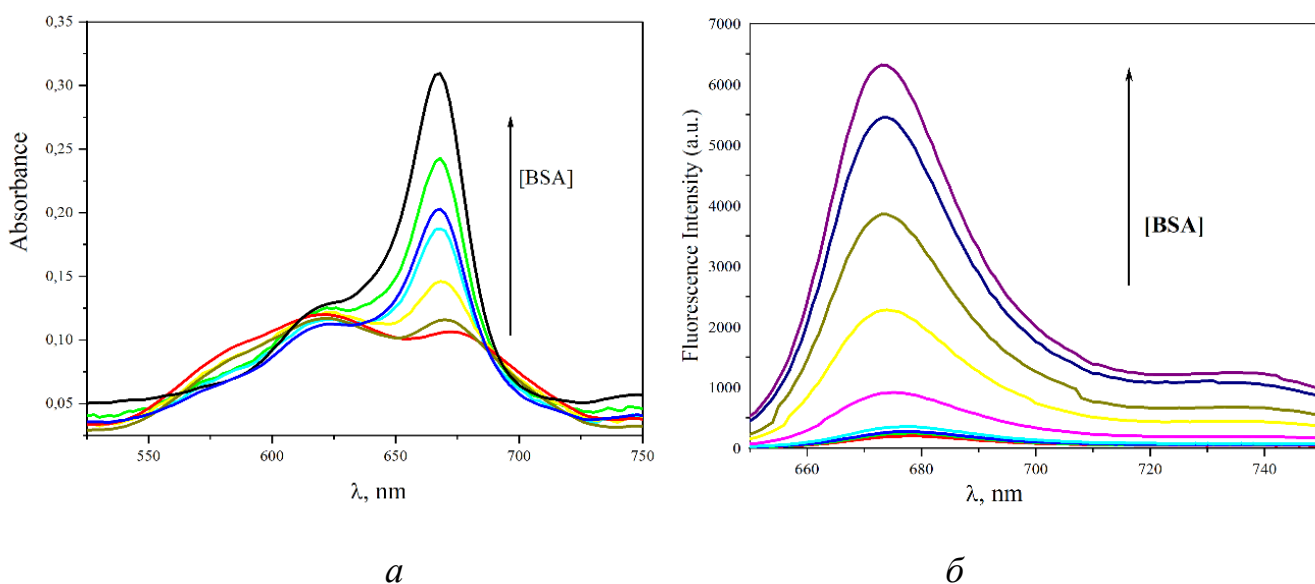


Рис. 4.11. Зміни спектрів поглинання (а) та спектрів флуоресценції (б) ($\lambda_{\text{ex}} = 630$ нм) барвника **4.5** (5 μM) із додаванням BSA (від 0 до 30 μM)

Паралельно спостерігається зростання інтенсивності флуоресценції скварайну **4.5** зі збільшенням концентрації BSA в максимумі поглинання при 668 нм, що відповідає мономерній формі барвника. В результаті нековалентної взаємодії із BSA відбувається руйнування нефлуоресцентних агрегатів барвника, а подальше зростання інтенсивності флуоресценції мономерного флуорофору найімовірніше пов'язано із обмеженим обертанням молекули барвника, що фіксується на білковій глобулі. Це корелює із агрегаційною поведінкою, залежною від концентрації вільного флуорофору **4.5** (рис. 4.10).

4.7 Оцінка констант зв'язування барвників з бичачим сироватковим альбуміном

Константи зв'язування з BSA оцінені для барвників **4.5** та **4.7**, оскільки вони проявили найвищу спорідненість до даного альбуміну. Обрані барвники мають однаковий хромофор, проте відрізняються N,N'-алкільними замісниками, що призводить до різниці в розмірі та заряді (**4.5** є нейтральним, тоді як **4.7** має подвійний негативний заряд). Барвники виявили різний спектральний відгук на присутність BSA (для сполуки **4.5** I_{BSA}/I_0 становить 588, тоді як для сполуки **4.7** – 10,5). Проте це не обов'язково означає слабше зв'язування **4.7** з альбуміном, а зумовлене скоріше вищим значенням вільної флуоресценції I_0 , оскільки флуоресцентний зонд **4.7** є переважно мономерним у водному розчині, тоді як **4.5** сильно агрегує (як обговорювалося вище).

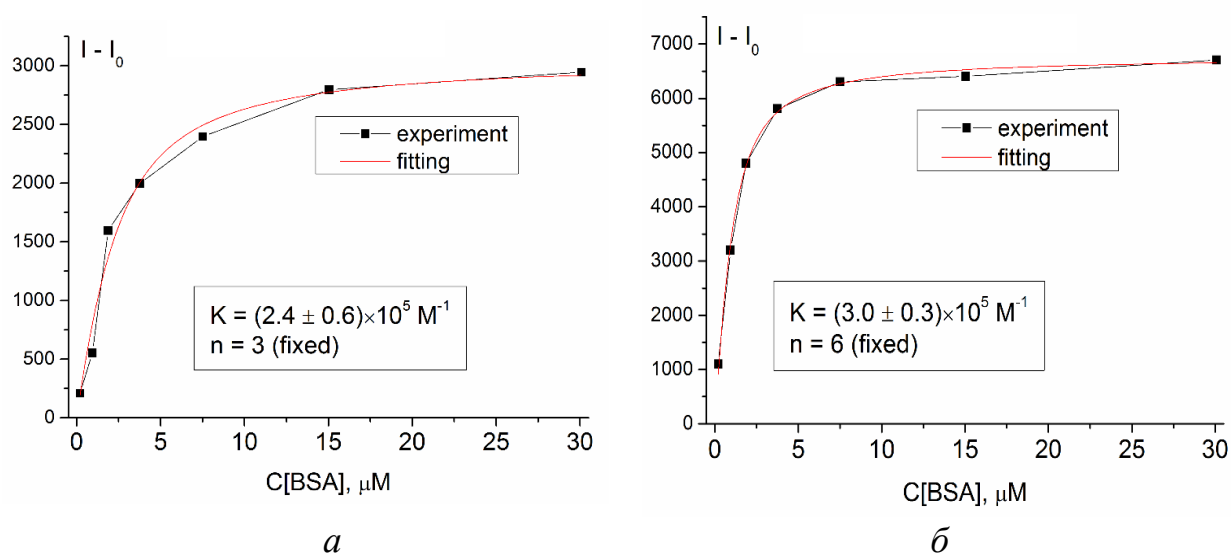


Рис. 4.12 Залежність $I - I_0$ від концентрації BSA та її апроксимація рівнянням (5) для флуорофорів **4.5** (а) та **4.7** (б). I та I_0 – інтенсивності флуоресценції флуорофору у присутності BSA та вільного барвника, відповідно. Апроксимація була виконана для фіксованих значень $n = 3$ для **4.5** та $n = 6$ для **4.7**

Для оцінювання констант зв'язування барвників **4.5** і **4.7** з BSA обробку даних проводили з використанням фіксованих цілих значень кількості молекул барвника на глобулу BSA - n . Найкращу відповідність отримано для $n = 3$ у

випадку **4.5** та $n = 6$ для **4.7**. Для цих значень n , константа зв'язування була оцінена як $(2,4 \pm 0,6) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ для **4.5**. та $(3,0 \pm 0,3) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ для **4.7** (рис. 4.12).

Виходячи з відносних значень K_b , можна припустити, що механізм зв'язування флуорофору із BSA полягає у взаємодії хромофору барвника із білковою глобулою без помітної участі N,N'-алкільних замісників у зв'язуванні. При цьому не слід забувати, що для кожного барвника передбачалося зв'язування з різними місцями глобули з однаковою константою зв'язування. Між тим, цілком можливо, що у випадку кожного окремого сквараїна зв'язування барвник - білок характеризується різними значеннями K_b відносно кожного окремого сайту зв'язування.

4.8 Молекулярний докінг барвника 4.5 по всій поверхні молекули бичачого сироваткового альбуміну

У результаті проведення молекулярного докінгу флуоресцентних барвників **4.5** та **4.7** по всій поверхні молекули бичачого сироваткового альбуміну ідентифіковано 5 найбільш імовірних кишень зв'язування, які зображено на рис. 4.13. Слід відмітити, що ці кишені виявилися спільними для обох сквараїнів.

Згідно з результатами молекулярного докінгу найкраще значення скорингової функції було встановлено для гемін-зв'язувального сайту (кишені 1), що становить $-11,2$ ккал/моль для барвника **4.5** та $-10,7$ ккал/моль для барвника **4.7**. Значення скорингової функції для кишень 2, 3, 4 і 5 барвника **4.5** становлять відповідно $-10,4$ ккал/моль, $-10,2$ ккал/моль, $-9,0$ ккал/моль та $-8,4$ ккал/моль та для кишень 2, 3, 4 і 5 барвника **4.7** становлять відповідно $-9,3$ ккал/моль, $-8,2$ ккал/моль, $-7,8$ ккал/моль та $-7,3$ ккал/моль.

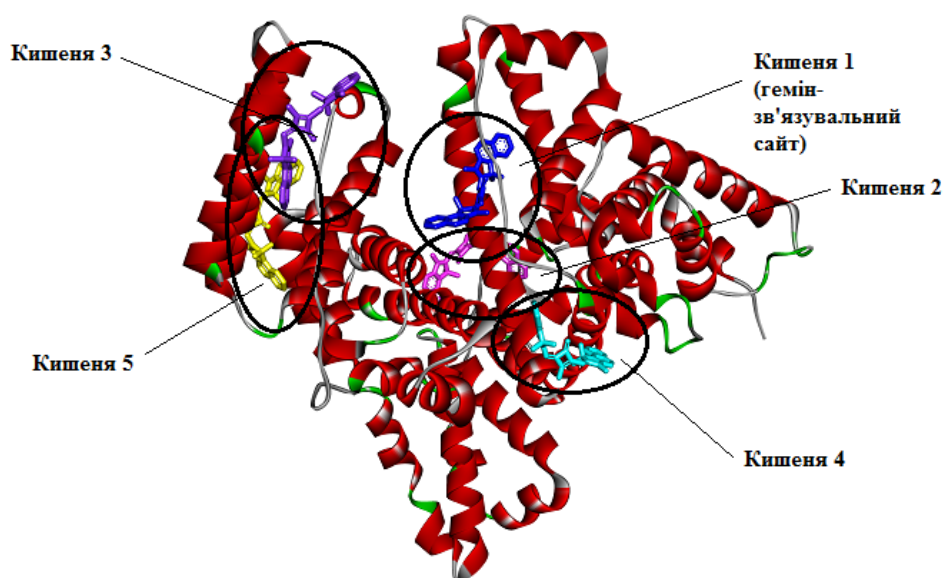
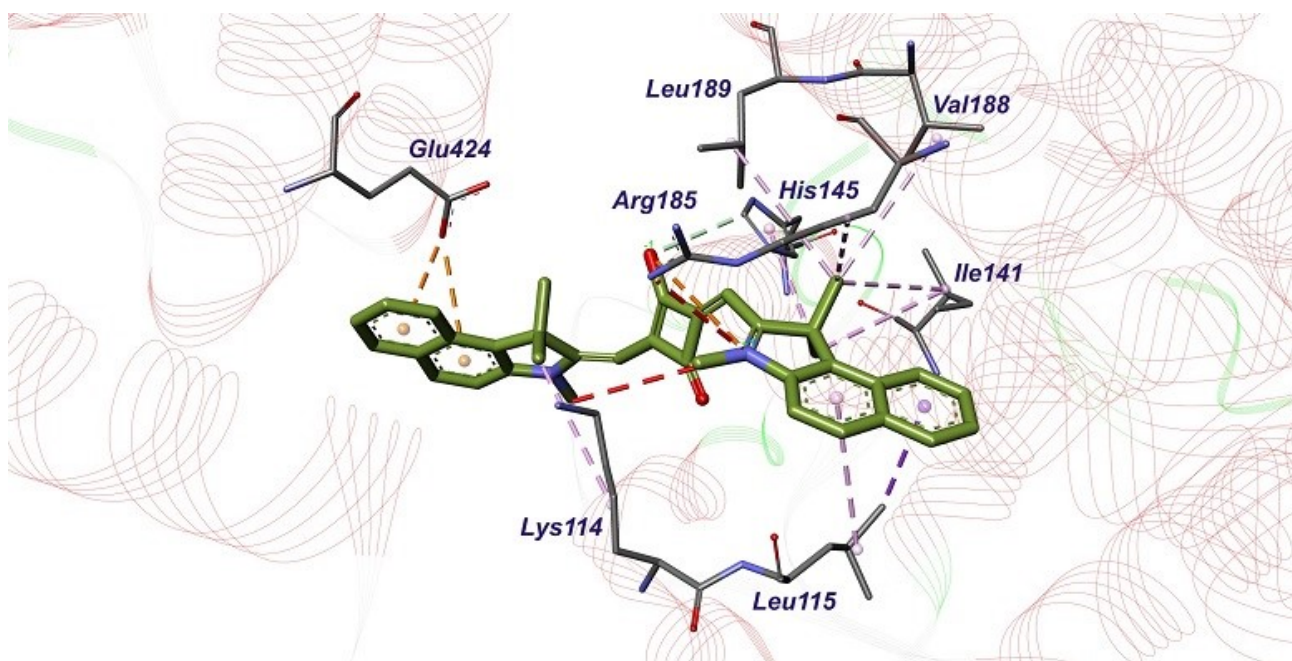


Рис. 4.13 Потенційні кишені зв'язування флуоресцентного барвника **4.5** на поверхні молекули бичачого сироваткового альбуміну

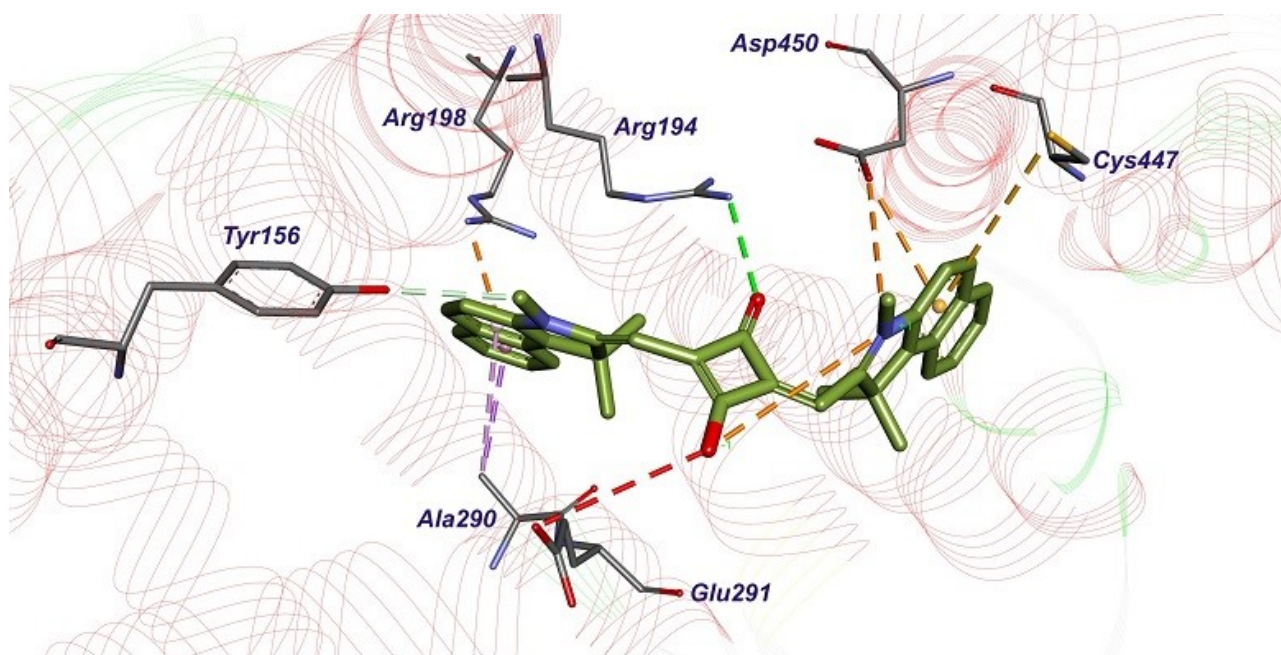
Детально досліджено комплекси флуоресцентного барвника **4.5** із амінокислотними залишками передбачених кишень зв'язування. Гідрофобні взаємодії представлені фіолетовими пунктирними лініями, водневі зв'язки – зеленими пунктирними лініями, електростатичні – червоними пунктирними лініями, π -катіон та π -аніон взаємодії – оранжевими пунктирними лініями.

На рис. 4.14 представлена взаємодія сквараїну **4.5** із амінокислотами в кишнях альбуміну 1 (*а*) та 2 (*б*). При дослідженні комплексу флуоресцентного барвника **4.5** із амінокислотними залишками гемін-зв'язувального сайту (кишеня 1) виявилось, що барвник утворює гідрофобні контакти із Lys114, Leu115, Ile141, Arg185, Val188, Leu189, π -аніон взаємодії з Glu424, електростатичні взаємодії з Lys114, Arg185 та формує водневий зв'язок із His145 (рис. 4.14, *а*).

Як можна бачити з рис. 4.14, *б* молекула **4.5** в кишені 2 задіяна у формуванні гідрофобних взаємодій із Ala290, електростатичних взаємодій із Glu291, Asp450, а також утворює π -катіон взаємодію з Arg198, π -сульфур взаємодію з Cys447 та водневі зв'язки з Tyr156 і Arg194.



а



б

Рис. 4.14 Комплекси флуоресцентного барвника **4.5** із амінокислотними залишками в кишені 1 (а) та кишені 2 (б)

Як видно з рис. 4.15, барвник **4.5** фіксується в кишені 3 за участі гідروفобних взаємодій із амінокислотними залишками Val408, Ala405, Leu397, Tyr400, Lys524, Val551, Met547, Lys544, а також π -аніон взаємодій із Glu540.

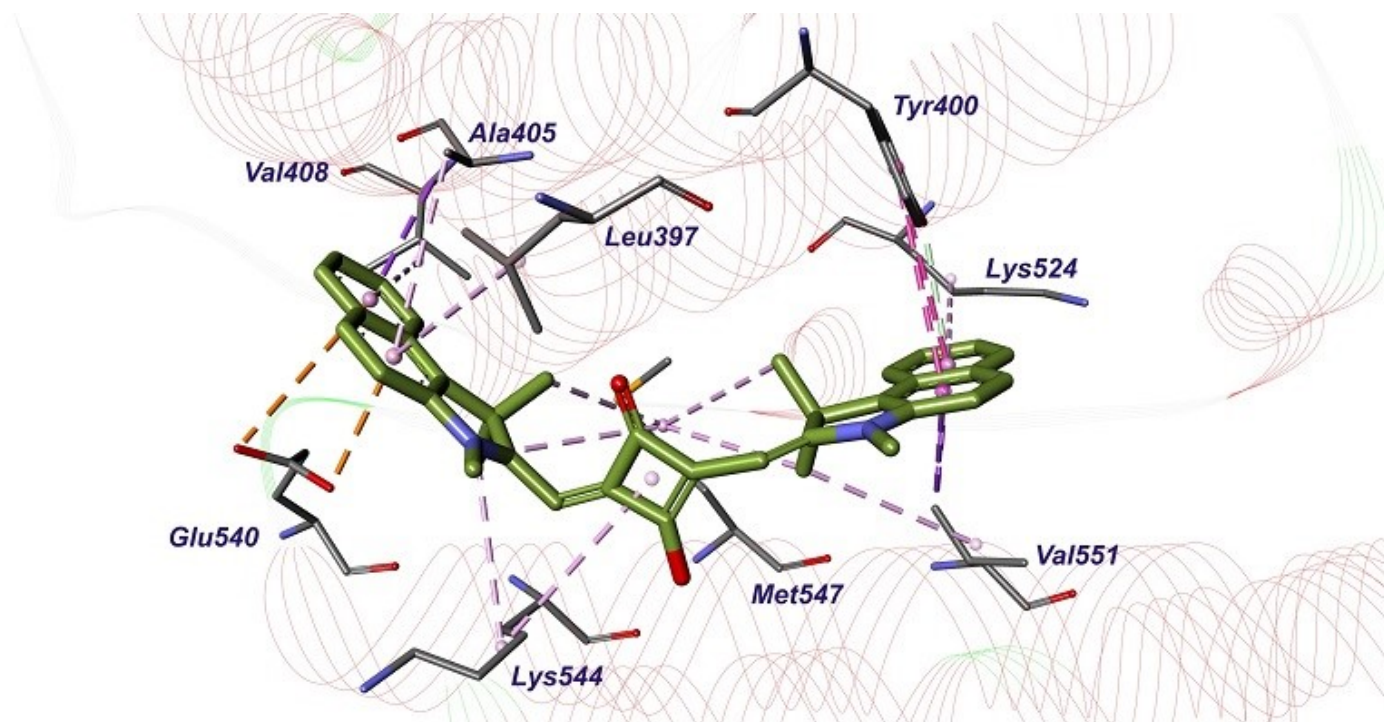


Рис. 4.15 Комплекси флуоресцентного барвника **4.5** із амінокислотними залишками в кишені 3

На рис. 4.16 представлена взаємодія сквараїну **4.5** із амінокислотами в кишенях альбуміну 4 (*a*) та 5 (*б*). У кишені 4 досліджуваний юарвник утворює гідрофобні контакти з His246, Lys465 та електростатичні взаємодії з Lys204 і Glu464 (Рис. 4.16, *a*).

При аналізі комплексу сквараїну **4.5** з амінокислотними залишками кишені 5 (рис. 4.16, *б*) виявилось, що барвник утворює гідрофобні контакти з Ala510, His509, Phe567, Ala568, Gly571, Pro572, Val575 та водневі зв'язки з Ala568, Phe567 та Thr507.

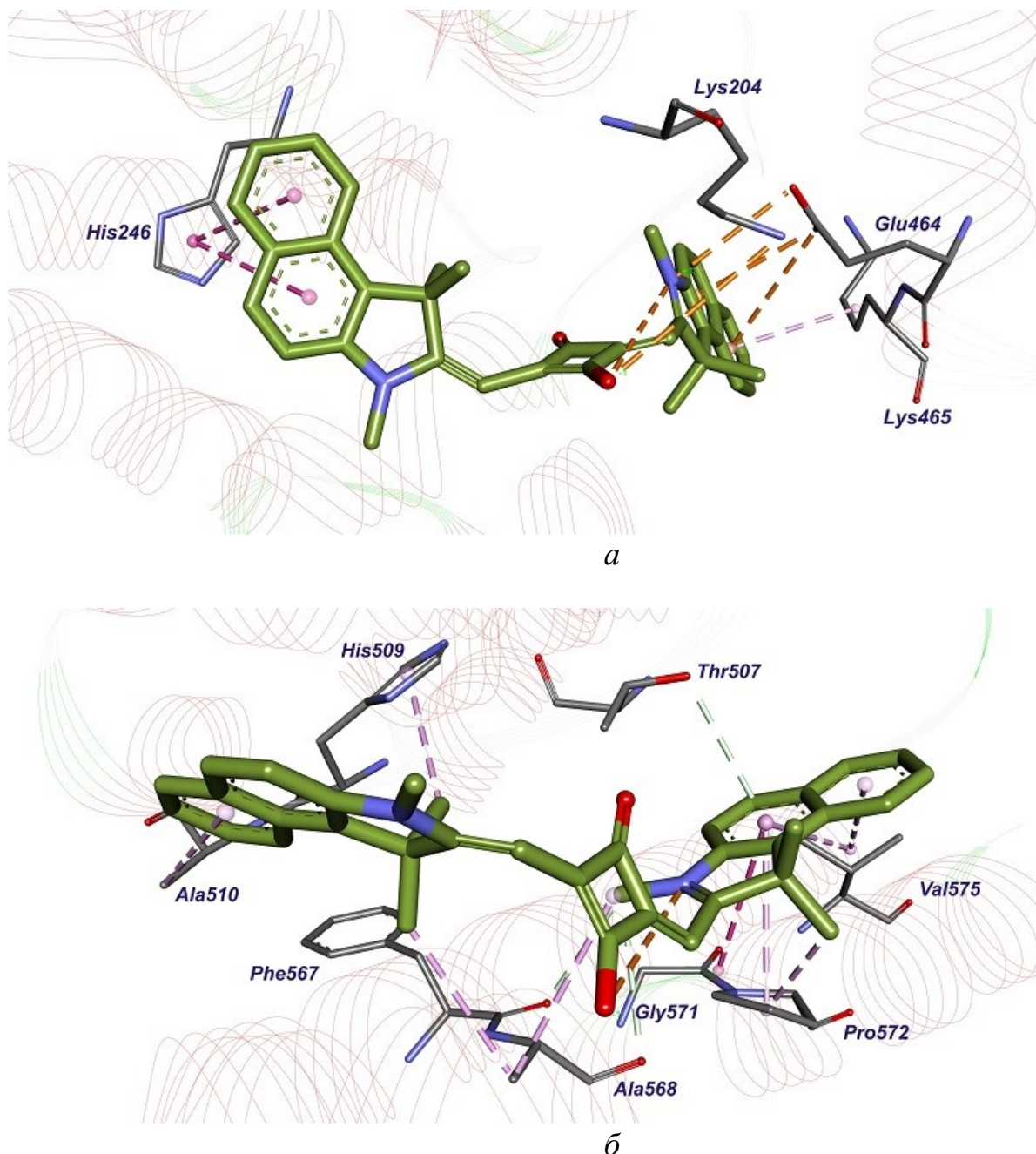
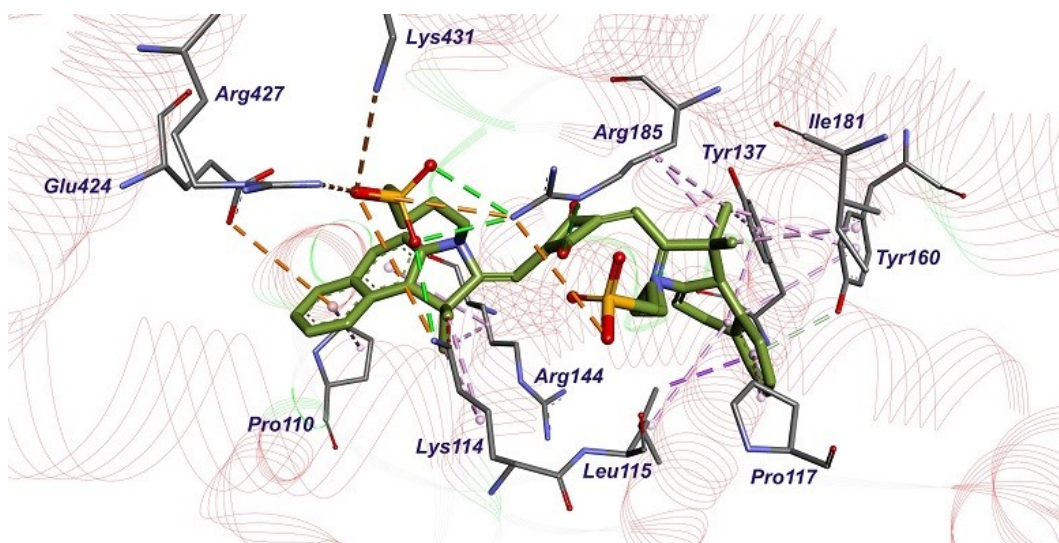


Рис. 4.16 Комплекси флуоресцентного барвника **4.5** із амінокислотними залишками в кишені 4 (*a*) та кишені 5 (*б*)

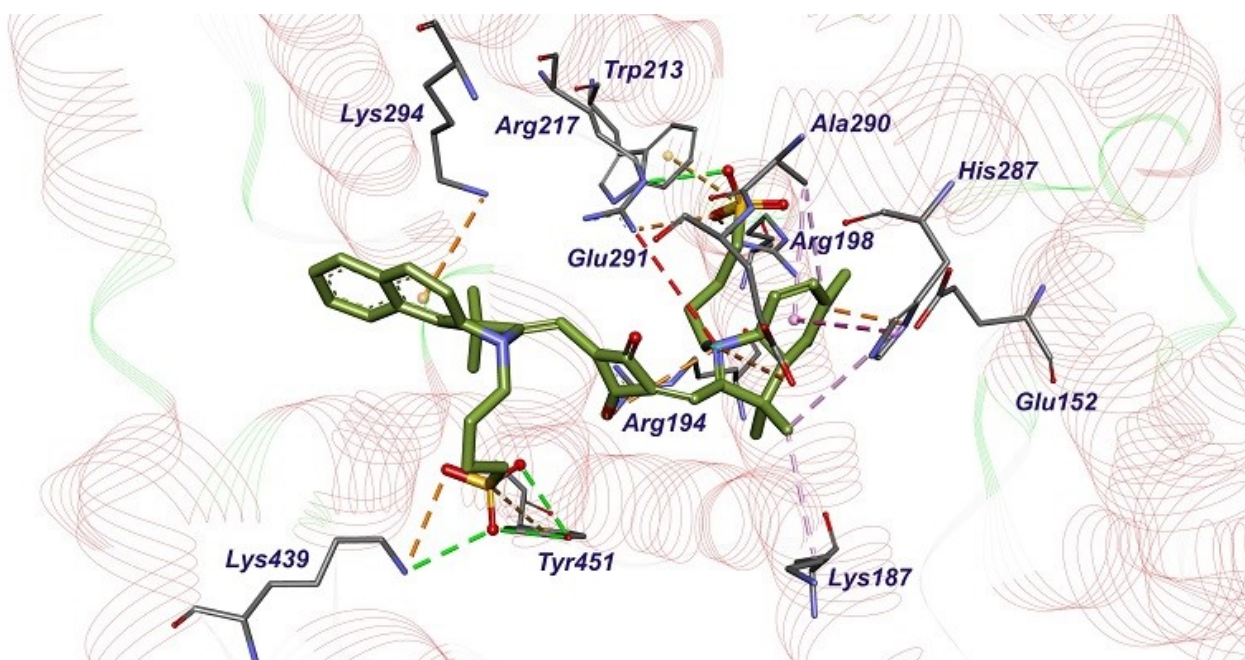
При вивченні комплексів барвника **4.7** встановлено, що він фіксується в гемін-зв'язувальному сайті (кишеня 1) завдяки гідروفобним контактам із амінокислотними залишками Ala193, Ile455, Leu189, Lys114, π -аніон взаємодії з Glu424, π -катіон взаємодії з Lys114, а також утворює водневі зв'язки з Ser192, Arg458, Ser428 та π -сульфур зв'язок із His145 (рис. 4.17, *a*).

У кишені 2 барвник **4.7** фіксується за участі гідروفобних взаємодій із Pro446, Ala290, π -аніон взаємодії з Glu443, π -катіон взаємодії з Arg217, а також

утворює водневі зв'язки з Lys439, Arg435, Thr190 та π -сульфур зв'язок із Tyr451 (рис. 4.17, б).



a

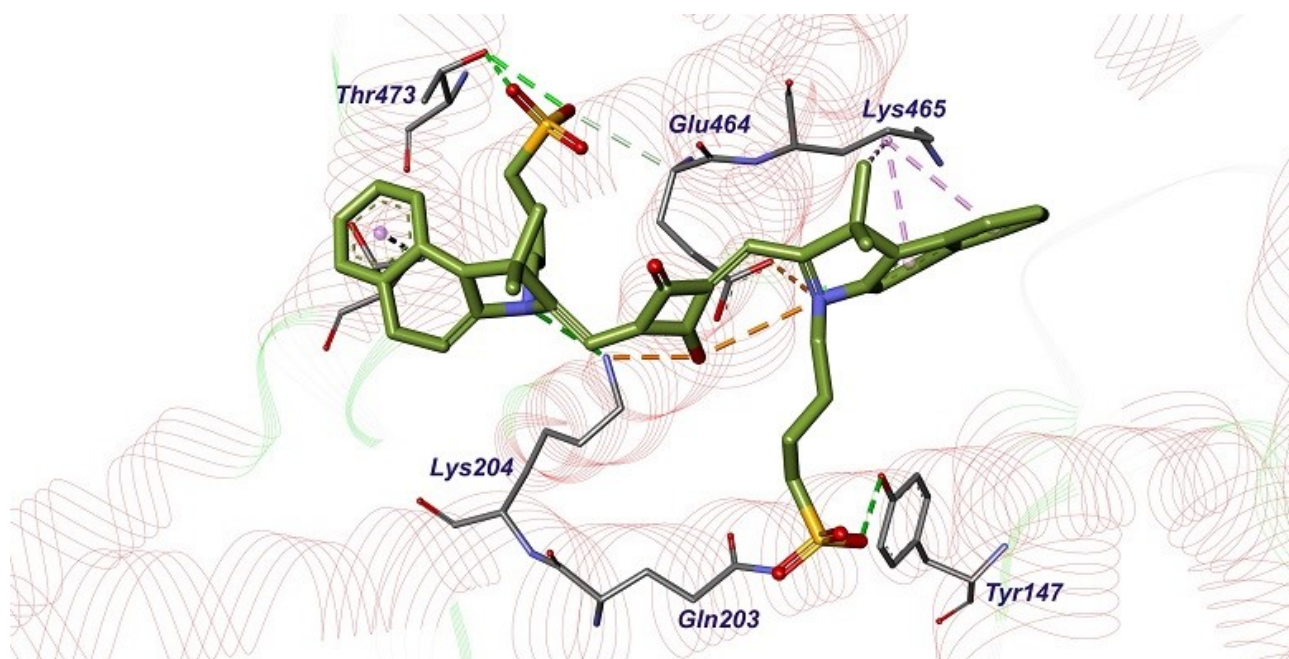


б

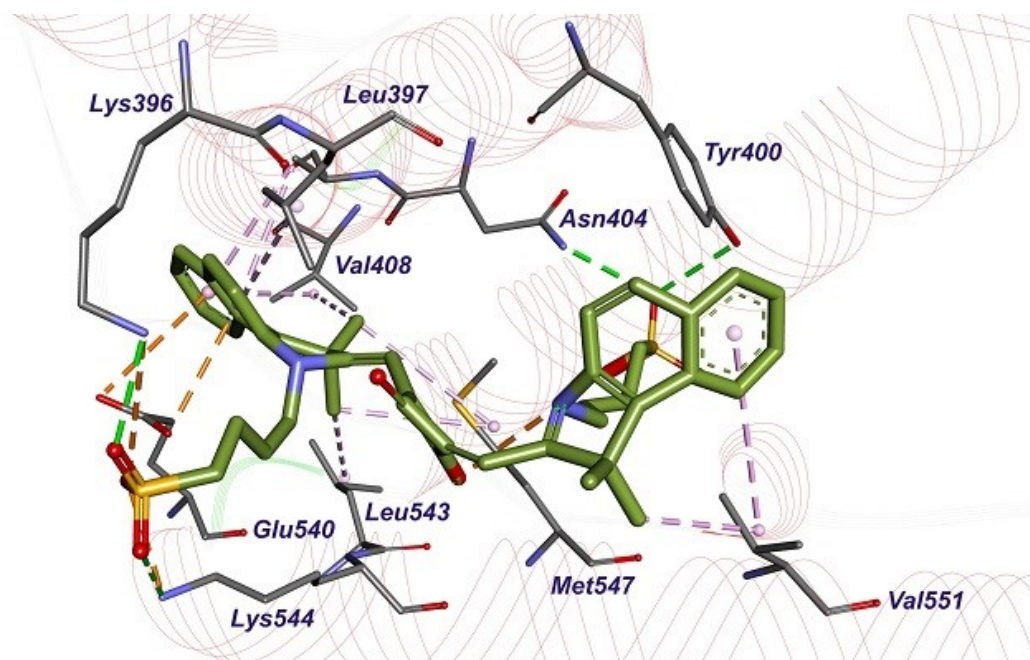
Рис. 4.17 Комплекси флуоресцентного барвника **4.7** із амінокислотними залишками в кишені 1 (*a*) та 2 (*б*)

Аналіз комплексів барвника **4.7** із амінокислотними залишками в кишенях 3 та 4 представлені на рис. 4.18 *a* та *б*, відповідно. При аналізі комплексу флуоресцентного барвника **4.7** з амінокислотними залишками кишені 3, виявилося, що він утворює гідрофобні контакти з Lys544, Glu548, Met547,

Val551, Lys524, Tyr400, електростатичні взаємодії з Lys524, π -катіон взаємодії з Lys396 і Lys544 (рис. 4.18, а).



а



б

Рис. 4.18 Комплекси флуоресцентного барвника **4.7** із амінокислотними залишками в кишені 3 (а) та 4 (б)

Тоді як в кишені 4 барвник **4.7** задіяний у формуванні гідрофобних контактів з Lys465, водневих зв'язків з Arg196, Tyr147, Lys204, Gln203, Ser104 та електростатичних взаємодій із Arg196 і Lys204 (рис. 4.18, б).

При аналізі комплексу флуоресцентного барвника **4.7** із амінокислотними залишками в кишені 5, виявилося, що барвник фіксується за участі гідروفобних взаємодій із Val575, His509, електростатичної взаємодії з Lys504, а також утворює водневі зв'язки із Thr507, Ala568 та π -сульфур зв'язок з His509 (рис. 4.19).

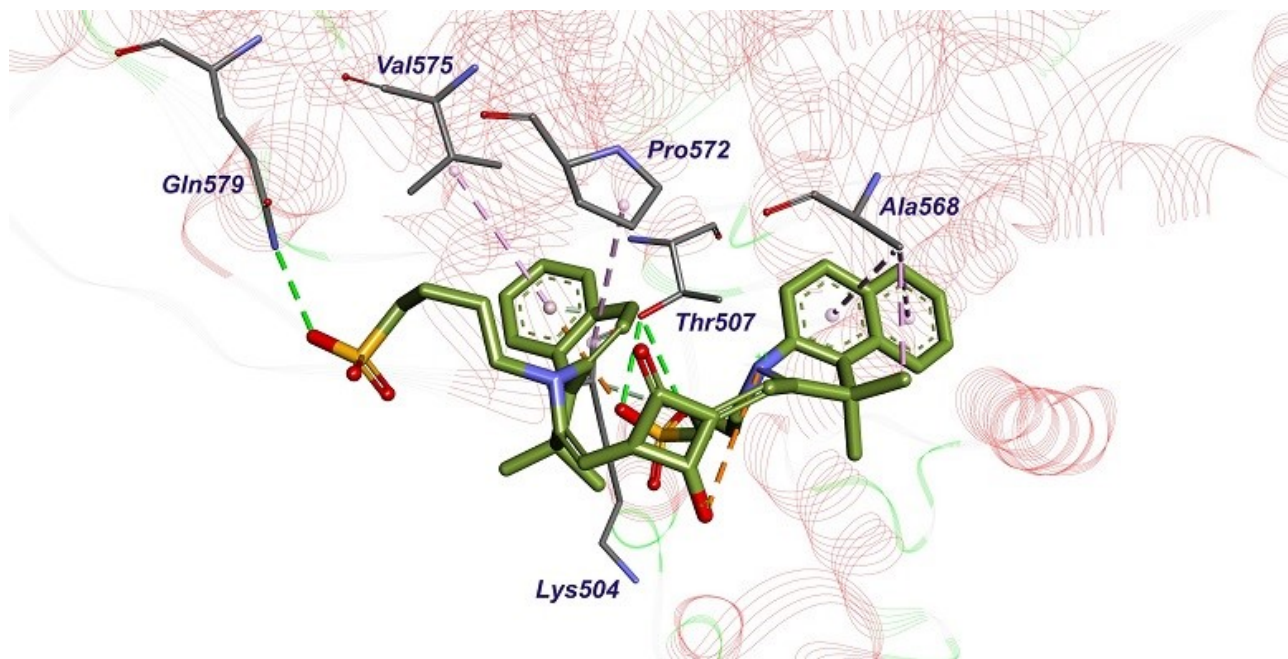


Рис. 4.19 Комплекси флуоресцентного барвника **4.7** із амінокислотними залишками в кишені 5

Для усіх вище наведених рисунків взаємодії барвника **4.7** із потенційними кишнями зв'язування BSA гідروفобні взаємодії представлені фіолетовими пунктирними лініями, водневі зв'язки – зеленими пунктирними лініями, електростатичні, π -катіон та π -аніон взаємодії – оранжевими пунктирними лініями, π -сульфур зв'язки – жовтими пунктирними лініями

Отже, за результатами молекулярного докінгу по поверхні альбуміну ідентифіковано 5 найбільш імовірних кишень зв'язування, що є спільними для обох флуоресцентних зондів та вказують на переважно гідروفобну взаємодію барвників із сайтами зв'язування BSA. Це підтверджується приблизно однаковими значеннями константи зв'язування K_b . Можна припустити, що

механізм зв'язування барвників із BSA полягає у взаємодії хромофору барвника із білковою глобулою без помітної участі N,N'-замісників **4.7** у зв'язуванні.

4.9 Дослідження проникності барвників в клітини та їх розподіл методом флуоресцентної мікроскопії

Оскільки барвник **4.7** проявив найменшу схильність до агрегації у водному буфері, вивчена його здатність проникати через клітинну мембрану та придатність для візуалізації живих клітин. Для проведення експерименту використовували клітинну лінію A2780, а також стандартні барвники - Hoechst, що зв'язується з ядерною ДНК, і зелений флуоресцентний мітохондріальний барвник MitoTracker Green для вивчення колокалізації (рис. 4.20).

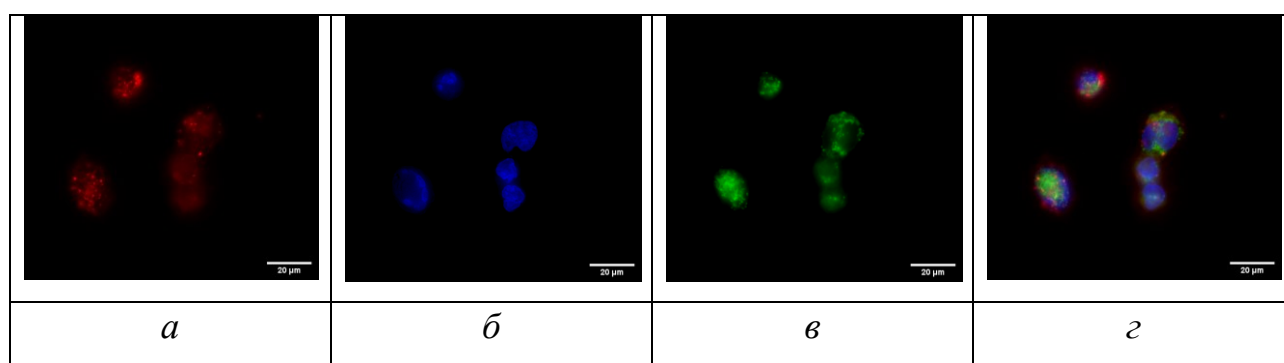


Рис. 4.20 Візуалізація живих клітин A2780 флуорофором **4.7** (*a*) у концентрації 1 μM , барвниками Hoechst (*б*) і MitoTracker Green (*в*), та об'єднані зображення (*г*). Шкала – 20 мкм

Показано, що барвник проникає через клітинну мембрану, як і у випадку попередніх барвників - не накопичується в ядрі, а також не виявляє колокалізації із MitoTracker Green (коефіцієнт кореляції Пірсона для **4.7**/MitoTracker Green склав $0,63 \pm 0,01$). Хоча специфічність зв'язування барвника **4.7** не виявлена, патерн візуалізації у цитоплазмі дозволяє припустити, що барвник зв'язується з лізосомами.

4.10 Дослідження фотодинамічної активності бензіндоленінових барвників

Фотодинамічна терапія є ефективним методом лікування онкологічних захворювань завдяки дії ФС в тканинах пухлини. За рахунок опромінення світлом з довжиною хвилі, що близька до максимуму поглинання ФС, відбуваються ряд фотохімічних процесів з утворенням активних частинок (синглетний Оксиген, радикали фотосенсибілізатора, супероксид аніон), які, в свою чергу, призводять до загибелі ракових клітин за механізмами апоптозу чи некрозу [180]. Для дослідження здатності до генерації синглетного Оксигену та інших АФО барвниками, був обраний 1,3-дифенілізобензофуран (DPBF) [175]. При взаємодії з $^1\text{O}_2$ у DPBF утворюється ендопероксидний фрагмент у циклі, який перериває спряження і здатен, навіть, розірвати зв'язок (рис. 4.21).

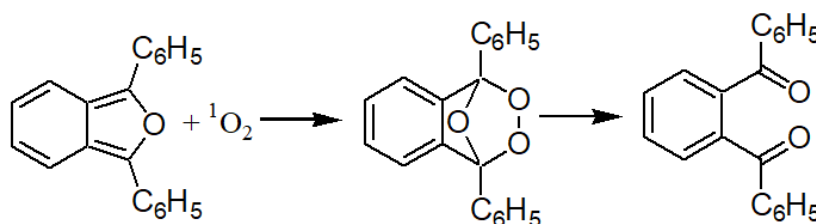


Рис. 4.21 Схема взаємодії DPBF із синглетним Оксигеном

Це призводить до знебарвлення DPBF, яке супроводжується падінням оптичної густини у його максимумі (415 нм).

Оскільки DPBF є малорозчинним у воді, виміри проводилися у водно-етанольному середовищі (50/50 %) при опроміненні довжиною хвилі $\lambda = 660$ нм у смугу поглинання бензіндоленінових барвників та за межами поглинання DPBF. Для дослідження були обрані барвники з гідрофільними групами **4.7** та **4.8**, а також барвник **4.5** (рис. 4.22).

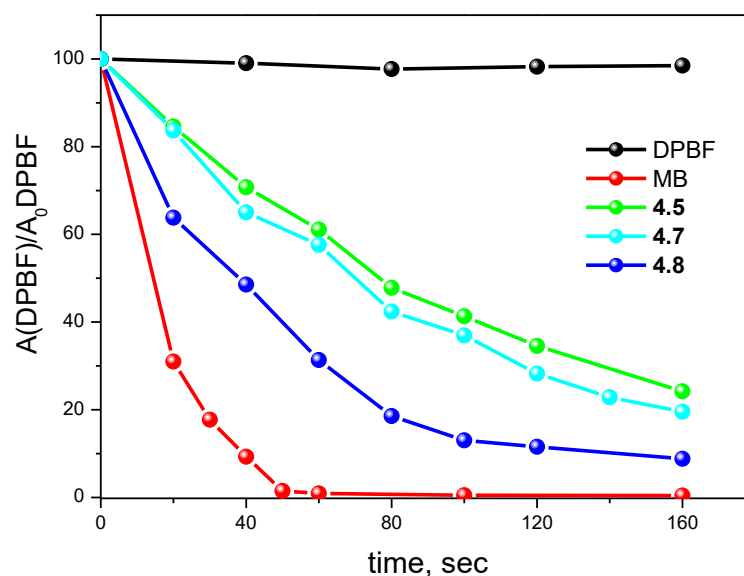


Рис. 4.22 Швидкість розкладання DPBF у присутності барвників **4.5**, **4.7**, **4.8** та MB в залежності від часу опромінення. $A(\text{DPBF})$ – максимум поглинання DPBF після опромінення в момент часу t , $A_0(\text{DPBF})$ – максимум поглинання DPBF до промінення

Слід зазначити, що оскільки максимумами поглинання індоленінових барвників **4.1** – **4.3** лежать за межами дії лазера, оцінити їх фотодинамічну активність у нашому випадку було не можливо.

Присутність барвників впливала на максимум поглинання DPBF після опромінення, сприяючи зниженню його інтенсивності. Як стандарт був обраний метиленовий синій (MB), оскільки відома його здатність до генерації синглетного Оксигену з високими квантовими виходами [176]. Як видно з рис. 4.22, найшвидша фотодеградація DPBF спостерігається для барвника **4.8**, що містить карбоксильні групи. Тоді як барвники **4.5** та **4.7** демонструють приблизно однакову здатність до генерації активних форм Оксигену.

Оскільки барвник **4.5** є гідрофобним та схильним до агрегації у водних розчинах, можна очікувати, що збільшення вмісту води в дослідженнях із пасткою синглетного Оксигену призведе до погіршення його фотодинамічних властивостей. Для цього проведено вимірювання швидкості фотознебарвлення DPBF при опроміненні барвників у середовищі з різним співвідношенням розчинників (рис. 4.23, а, б).

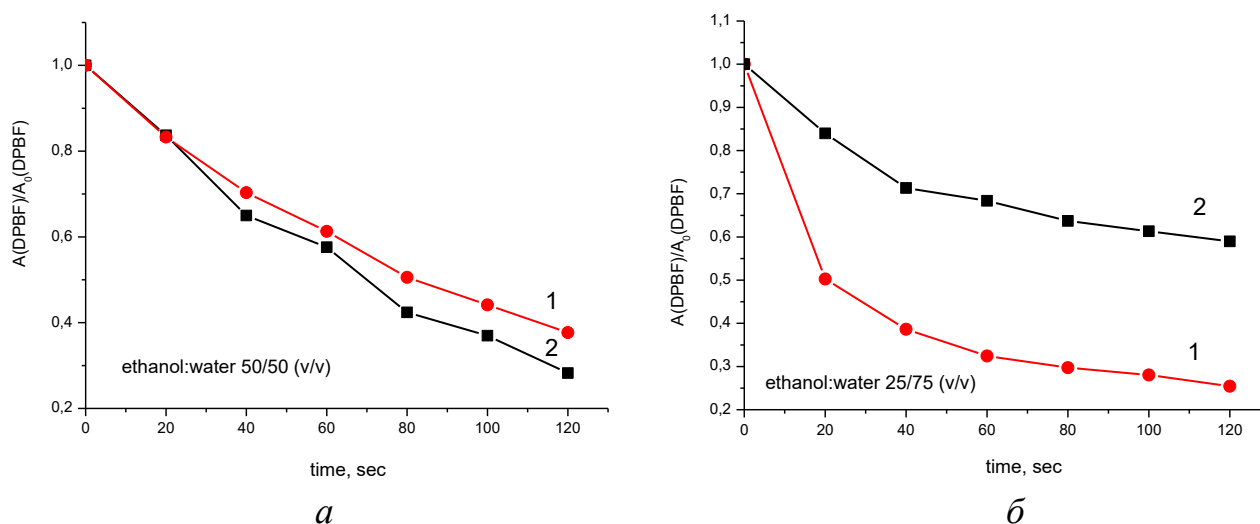


Рис. 4.23 Швидкість розкладання DPBF у присутності барвників **4.5** (крива 1) і **4.7** (крива 2) у водно-етанольному розчині: 50% води (а) та 75% води (б) в залежності від часу опромінення. $A(\text{DPBF})$ – максимум поглинання DPBF після опромінення в момент часу t , $A_0(\text{DPBF})$ – максимум поглинання DPBF до промінення

Несподіваним виявилось, що зростання вмісту води до 75% привело до значно більшого знебарвлення DPBF в присутності барвника **4.5** порівняно зі скварайном **4.7**. У першого воно відбулося на 50% вже після 20 секунд опромінення (рис. 4.23, б).

Для дослідження спектральних проявів агрегації спектри поглинання і флуоресценції скварайнів **4.5** і **4.7** були проаналізовані в сумішах з водою етанолу і ДМСО у різному співвідношенні при постійній концентрації барвника. Виявилось, що при збільшенні вмісту води як у етанолі, так і в суміші з ДМСО відбувається сильна деформація спектрів поглинання скварайну **4.5** (рис. 4.24, а).

Різко падає інтенсивність довгохвильового максимуму і з'являється нова короткохвильова смуга. Зі збільшенням вмісту води вона поступово гіпсохромно зміщується, а її інтенсивність зростає. При цьому відбувається закономірне гасіння флуоресценції (рис. 4.24, б).

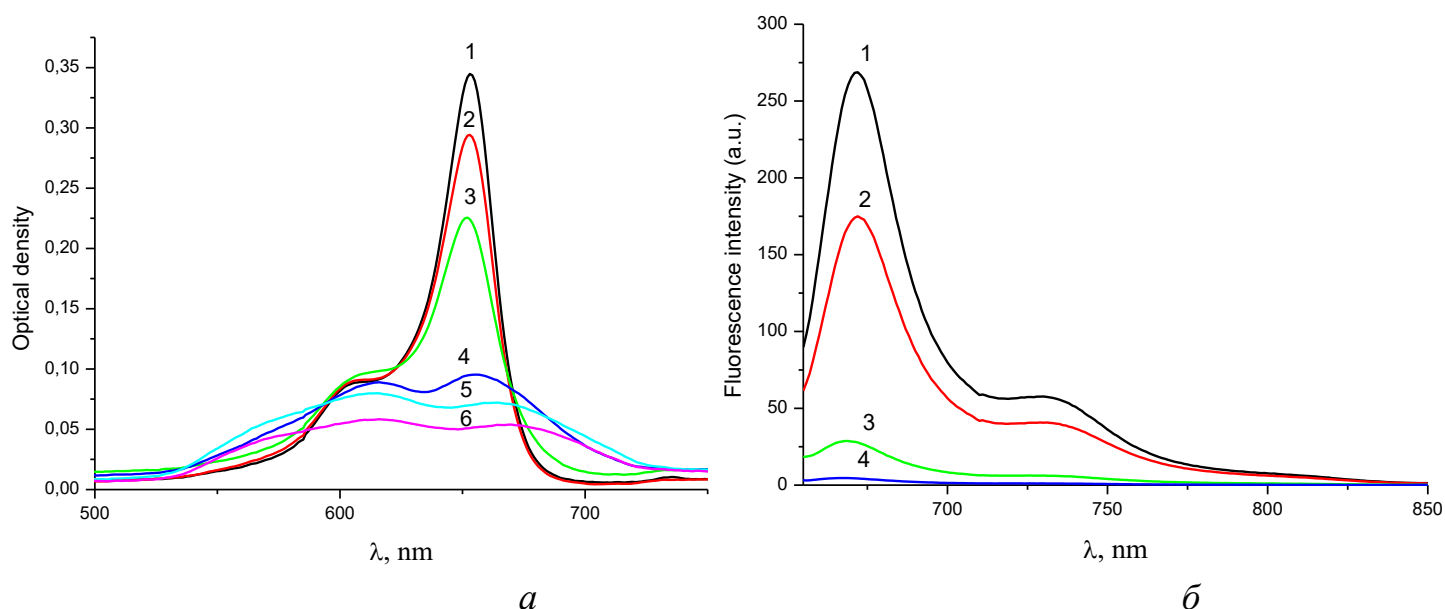


Рис. 4.24 Спектри поглинання (а) та флуоресценції (б) барвника **4.5** у етанольному розчині з різним вмістом води (%): 0 (1), 10 (2), 30 (3), 50 (4), 70 (5) та 100 (6); концентрація барвника 5 μM

Нові смуги флуоресценції не виникають. Аналогічні спектрально-флуоресцентні ефекти відбуваються за збільшення концентрації барвника при постійному співвідношенні суміші вищезазначених розчинників.

Це свідчить про те, що у сумішах з водою етанолу і ДМСО зі збільшенням вмісту води відбувається агрегація сквараїну **4.5.У** барвника **4.7**, у якого гідрофобний бічний замісник замінений на гідрофільну сульфобутильну групу, в аналогічних умовах зміни в спектрах поглинання відбуваються значно слабше. Спектри зберігають універсальний контур смуг поглинання при значно більшому вмісті води у сумішах розчинників, ніж у барвника **4.5** (рис. 4.25, а, б).

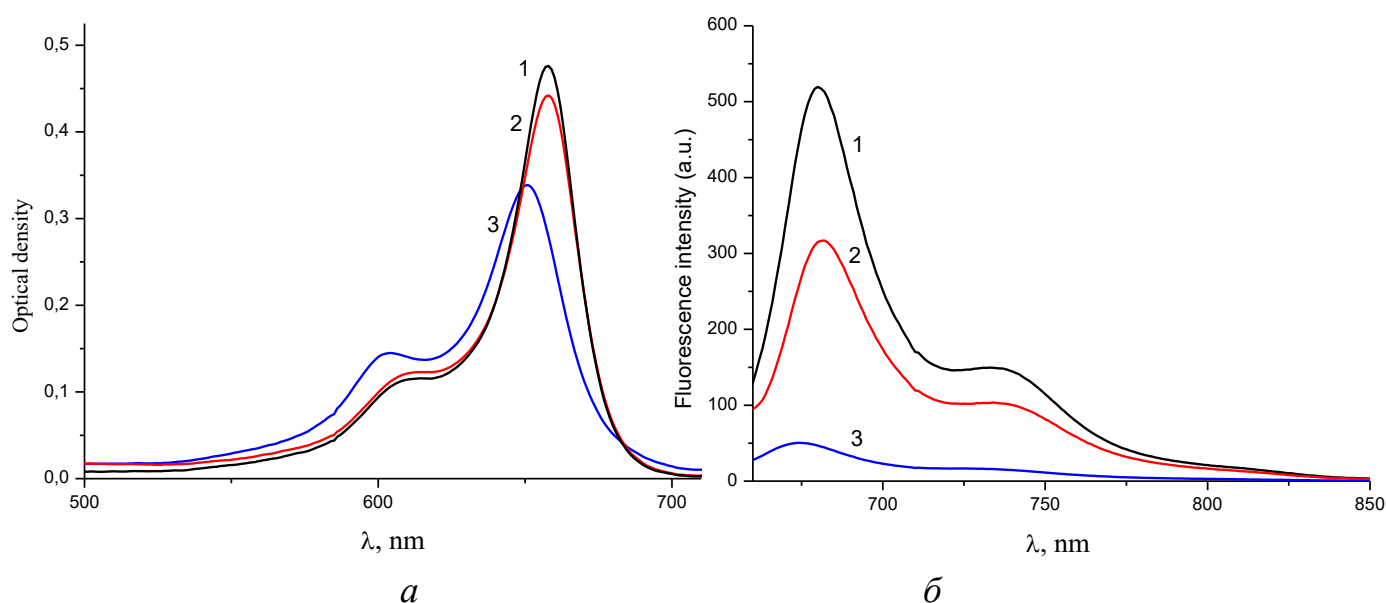


Рис. 4.25 Спектри поглинання (*а*) та флуоресценції (*б*) барвника **4.7** у етанольному розчині з різним вмістом води (%): 0 (1), 50 (2), та 100 (3); концентрація барвника 5 μM

Лише при високому (більше 50%) вмісті води у нього з'являється невеликий короткохвильовий максимум при 612 нм. Це вказує на те, що сквараїн **4.7** агрегує значно слабше порівняно з барвником **4.5**. Вірогідно, це є наслідком більшої розчинності першого, ніж останнього у водному розчині. В результаті молекули сквараїна **4.7** менше виштовхуються зі структури води порівняно з барвником **4.5**, внаслідок чого, як відомо, агрегують слабше [167].

Донорно-акцепторна природа сквараїнів створює умови для сильного міжмолекулярного електростатичного тяжіння різнойменних зарядів, що приводить до утворення димерів і складніших агрегатів навіть у дуже розбавлених розчинах [177]. Огляд літератури показав, що існує принаймі три можливих взаємних розташувань донорно-акцепторних молекул при утворенні агрегатів у водному середовищі (рис. 4.26). При орієнтації молекул сквараїна, як у структурі I, взаємодія між ними має бути максимальною, оскільки протилежно заряджені фрагменти D та A різних молекул знаходяться один проти одного на обох кінцях молекули.

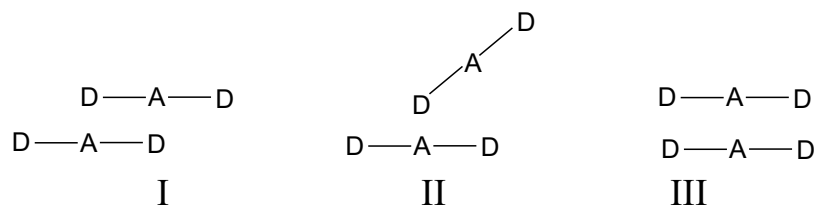


Рис. 4.26 Можливе розташування донорно-акцепторних молекул барвника при утворенні агрегатів

У такій структурі реалізується кут між двома хромофорами, близький до 180° . Характерною її ознакою є поява нової довгохвильової смуги поглинання і флуоресценції по відношенні до відповідних смуг мономерної молекули [178]. Їх відсутність виключає можливість реалізації агрегату типу I у нашому випадку. Структура II має бути менш вигідною, оскільки взаємодія фрагментів мономерів D і A здійснюється лише з одного боку. При гострому куті між хромофорами виникають дві смуги поглинання, але інтенсивність довгохвильової набагато вище [167]. Цей випадок у нас також не реалізується. У сендвічевої структури III однойменно заряджені фрагменти розташовані один проти одного. Кулонівські сили відштовхування дестабілізують такий агрегат. Однак при паралельному розташуванні хромофорів спостерігаються максимальні дисперсійні взаємодії між ними. Тому існує можливість утворення таких агрегатів. У нашому випадку додаткове посилення дисперсійних взаємодій в сендвічевій структурі здійснюється за рахунок бензанелювання індоленінового ядра, що розширює π -систему спряження.

Однозначним доказом домінування у нашому випадку структури III при збільшенні вмісту води у сумішах розчинників є: виникнення нової короткохвильової смуги поглинання (гіпсохромно зсунутої приблизно на 30 – 40 нм); зростання її інтенсивності (навіть перевищує інтенсивність основної смуги); падіння інтенсивності довгохвильової смуги; гасіння флуоресценції мономерної смуги до її повного зникнення при вмісті води біля 80% [179].

Отже, спираючись на дослідження природи агрегації барвників, однозначним доказом домінування у нашому випадку структури ІІІ при збільшенні вмісту води у сумішах розчинників є: виникнення нової короткохвильової смуги поглинання (гіпсохромно зсунутої приблизно на 30 – 40 нм); зростання її інтенсивності (навіть перевищує інтенсивність основної смуги); падіння інтенсивності довгохвильової смуги; гасіння флуоресценції мономерної смуги до її повного зникнення при вмісті води біля 80 %.

Агрегація барвників супроводжується зменшенням енергетичної щільності між S^1 і Т станами порівняно з мономерним барвником. Це приводить до зростання ймовірності інтеркомбінаційної конверсії. У асоціатів сендвічової будови ІІІ вона додатково зростає, внаслідок того, що конкуруючий флуоресцентний перехід $S^1 \rightarrow S^0$ у них заборонений [179]. В результаті, активований триплетний стан агрегату ІІІ здатен по механізму Т-Т переносу енергії сенсibilізувати утворення синглетного Оксигену (рис. 4.27) [181].

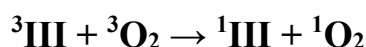


Рис. 4.27 Схема утворення синглетного Оксигену

4.11 Дослідження цитотоксичності бензіндоленінових барвників

Оскільки досліджувані барвники проявили себе як потенційні фотосенсибілізатори, їх здатність пригнічувати ріст клітин MCF-7 досліджена за допомогою МТТ тесту. Спостерігалася виживаність клітин після 24-годинної інкубації з барвниками в діапазоні концентрацій 0,1 – 10 μM в паралельних дослідах: в присутності барвників (темнова токсичність) та в присутності барвників після опромінення лазером із довжиною хвилі 660 нм (світлова токсичність). Оскільки виявлено, що досліджувані барвники зв'язуються з альбумінами, дослідження виживаності клітин під дією фотосенсибілізаторів проведені в безсироватковому середовищі і в середовищі із 5% BSA. Опроміненням червоним світлом клітин, що містили аліквоти ДМСО не

вплинули на виживаність клітин. Як показано на рис. 4.28, барвник **4.5** продемонстрував низьку темнову токсичність, його життєздатність клітин залишалася вище 85% у представленому діапазоні концентрацій. Водночас, після лазерного опромінення виживаність клітин знижувалася майже на 40 % за концентрації 0,1 μM та майже на 90 % за концентрації 10 μM у безсироватковому середовищі. В присутності 5% BSA в середовищі для росту клітин токсична дія барвника у концентрації 0,1 μM зменшилася під дією лазера. Однак вже за концентрації 1 μM виживаність клітин складала менше 40% і близько 10% при концентрації 10 μM .

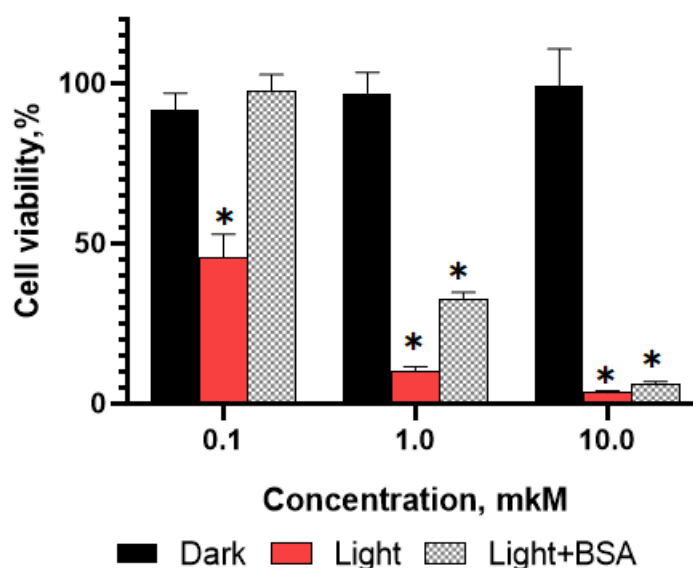


Рис. 4.28 Цитотоксичність барвника **4.5** в залежності від концентрації без та з дією лазера (1 хв) у відсутності і за присутності BSA (* $p < 0.05$ порівняно із темною токсичністю відповідної концентрації барвника)

Аналогічно барвнику **4.5**, 24-годинна темнова інкубація барвників **4.7** та **4.8** із клітинами MCF-7 не вплинула на ріст клітин. Тоді як опромінення червоним світлом клітин із зазначеними барвниками, знизило виживаність клітин більш ніж на 50% за концентрації 1 μM у випадку барвника **4.8** та на 60% у випадку барвника **4.7**. Для обох барвників за концентрації 10 μM виживаність клітин складала менше 5%. Тоді як за присутності BSA в середовищі росту

клітин токсична дія при опроміненні червоним світлом не виявлена навіть за концентрації 10 μM для обох барвників (рис. 4.29, а, б).

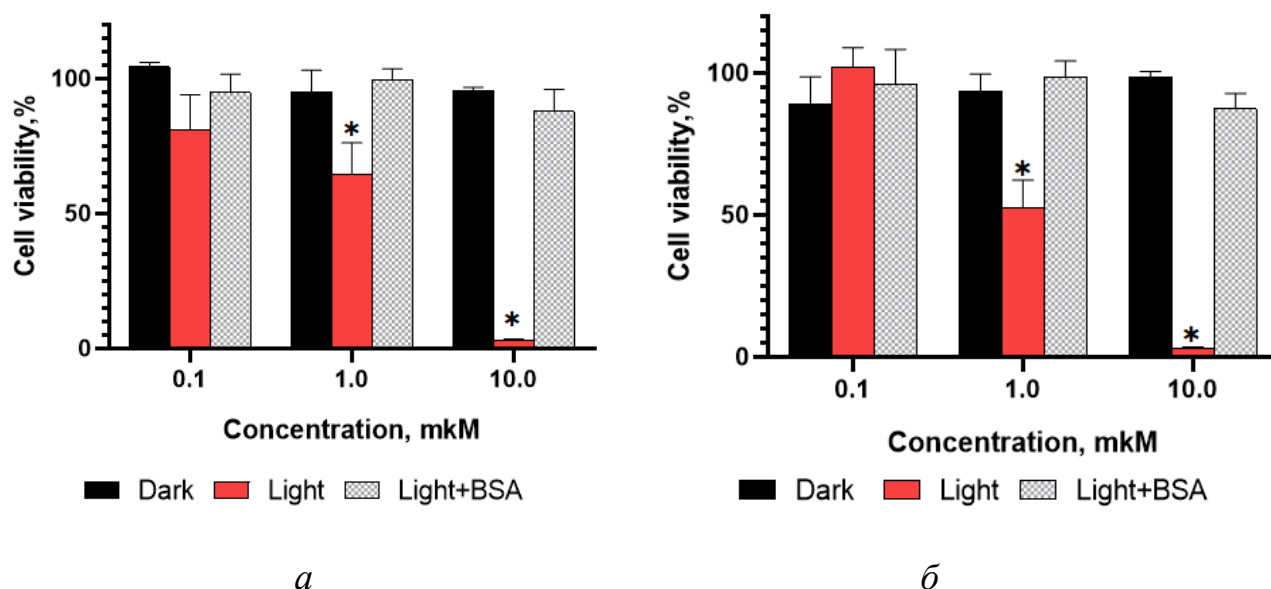


Рис. 4.29 Цититоксичність барвників 4.7 (а) та 4.8 (б) в залежності від концентрації без та після дії лазера (1 хв) у відсутності та за присутності BSA (* $p < 0.05$ порівняно із темною токсичністю відповідної концентрації барвників)

Окрім МТТ тесту, проводилось дослідження світлової цитотоксичності барвника 4.5 за допомогою конфокальної мікроскопії (рис. 4.30). Для цього клітини MCF-7 поміщали в культуральні планшети з 12 лунками із стерильними скляними покривними скельцями та інкубували протягом 48 годин при 37 °C у присутності 5% CO₂. Після досягнення 80% конфлюентності середовище для росту клітин видаляли і клітини тричі промивали PBS. Далі клітини інкубували з досліджуваними барвниками в концентрації 5 μM у PBS буфері протягом 1 години при 37° C у присутності 5% CO₂. Після цього частину скелець опромінювали лазером протягом 1 хвилини. Далі усі лунки зі скельцями промивали PBS буфером, додавали середовище для росту і залишали на добу. На наступний день клітини готували до дослідження за методикою конфокальної візуалізації фіксованих клітин.

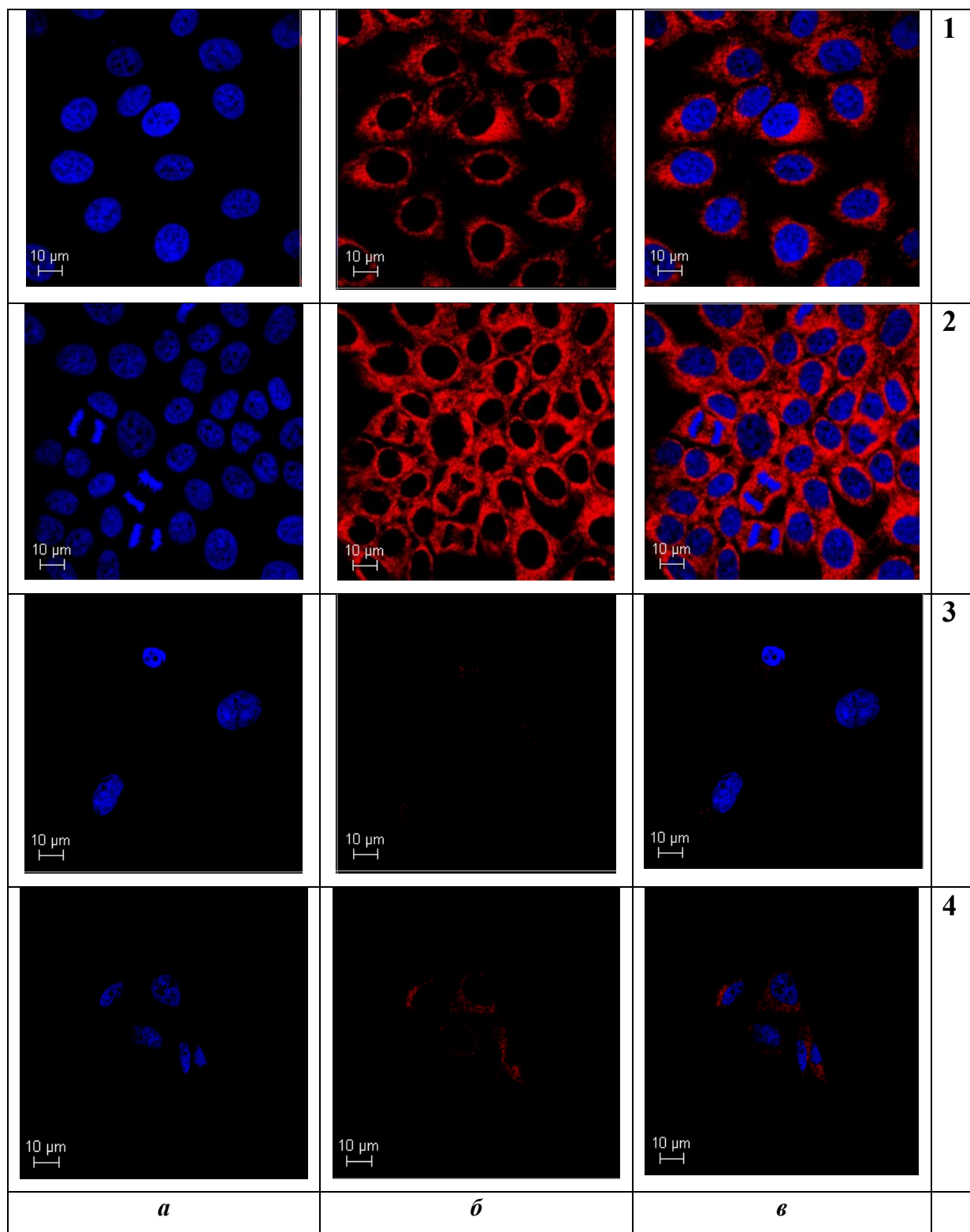


Рис. 4.30 Конфокальне зображення клітин MCF-7. Клітини з барвником Hoechst 33342 (*a*), барвником 4.5 (*б*), та об'єднане зображення (*в*) Ряд 1 та 2 без дії лазера, ряд 3 та 4 після опромінення протягом 1 хв

Як видно з рис. 4.30 в опромінених лазером зразках загальне число клітин зменшується (рис. 4.30, ряд 3 та 4) в порівнянні з неопроміненими клітинами в присутності барвника (рис. 4.30, ряд 1 та 2), що також підтверджує цитотоксичний ефект досліджуваного флуорофору **4.5** під дією світла. Потрібно зазначити, що опромінення червоним світлом не вплинуло на життєздатність клітин, що не містили барвник.

Відомо, що альбуміни крові виконують ряд функцій в організмі людини, серед яких захист організму від оксидативного стресу. Ми припускаємо, що відсутність терапевтичного ефекту барвників **4.7** і **4.8** в присутності альбуміну відбувається через те, що їх негативно заряджені бічні групи утворюють нековалентні взаємодії з позитивно зарядженими групами BSA. Дифузія Оксигену при зв'язуванні молекули з білком ускладнюється. В результаті зменшується вироблення синглетного Оксигену чи відбувається взаємодія альбуміну з вільними радикалами. Також у вільному стані молекули барвника можуть бути близькими до клітинних структур, що призводить до їх руйнування за типом I. Тоді як білкова оболонка стерично обмежує механізм переносу електронів, що призводить до гасіння збуджених молекул субодиницями альбуміну. Барвник **4.5** не дає таких стійких комплексів, проте, оскільки при зв'язуванні з альбуміном відбувається процес руйнування агрегатів барвника, його токсичний вплив при опроміненні червоним світлом в присутності альбуміну знижується, але залишається достатньо високим для руйнівної дії клітин.

Отже, даний розділ присвячений вивченню внутрішньоіонних сквараїнових хромофорів з як нейтральними N,N'-замісниками, так і з зарядженими. Встановлено, що барвник **4.2** проявляє найслабше зв'язування із BSA, не візуалізується в клітині, а отже не може бути використаним для флуоресцентної візуалізації клітин.

Барвники із N,N'-алкілсульфонатними (**4.7**) чи N,N'-алкілкарбоксільними (**4.3** та **4.8**) групами зв'язувалися із альбуміном із високими константами

зв'язування, проникали через мембрану клітин A2780 та MCF-7 та візуалізувалися в них. Дані барвники можуть використовуватися як потенційні реагенти для візуалізації клітин. Барвники із N,N'-алкільними гідрофобними бічними замісниками проявили тенденцію до агрегації у водному буфері, проте агрегати руйнувалися в присутності сироваткових альбумінів. Для барвника **4.5** в присутності BSA спостерігалось найбільше зростання інтенсивності флуоресценції, більш ніж в 500 разів. Для вивчення агрегації барвника **4.5** були проаналізовані його спектри поглинання і флуоресценції в сумішах: вода-етанол та вода-ДМСО у різному співвідношенні при постійній концентрації барвника. Очевидно, агрегат має сендвічеву будову із розташуванням однойменних зарядів один навпроти одного. Утворення агрегату спричинює підвищення цитотоксичних властивостей барвника **4.5** при опроміненні червоним світлом навіть у присутності альбуміну. Отже, агрегація сквараїнів, яка, як правило, небажана у медико-біологічних експериментах, може відігравати корисну роль для сенсibilізації синглетного Оксигену. Це необхідно враховувати при використанні сквараїнових барвників у фотодинамічній терапії.

За результатами досліджень опубліковані наступні наукові праці:

1. Syniugina A., Chernii S., Losytsky M., Ozkan H.G., Slominskii Yu, Syniugin A., Pekhnyo V., Mokhir A., Yarmoluk S. "N-alkyl functionalized squaraine dyes as fluorescent probes for the detection of serum albumins". *Biopolymers and Cell*, 2022; 38(2):103-116 (Open Access, Q4) DOI 10.7124/bc.000A75.
2. Syniugina A., Malanchuk O., Chernii S., Bdzhola A., Horbatok K., Syniugin A., Yarmoluk S. "The squaraine derivatives as potential photosensitizers in photodynamic therapy of cancer". *Biopolymers and Cell*, 2023; 39(1):3-13, DOI 10.7124/bc.000A81.
3. Синюгіна А.Т., Іщенко О.О. «Вплив агрегації бензоіндоскваїнів на генерацію синглетного Оксигену». *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2023. № 4. С. 60-67. doi.org/10.15407/dopovidi2023.04.060.

РОЗДІЛ 5

КОН'ЮГАТИ НА ОСНОВІ МЕРОЦІАНІНОВОГО І СКВАРАЇНОВОГО БАРВНИКІВ

D-глюкоза є одним з найпоширеніших моносахаридів у природі. Похідне глюкози – глюкозамін виробляється шляхом біосинтезу гексоз. Відомо, що транспорт як глюкози так і глюкозаміну здійснюється транспортними білками GLUT2 [170]. Оскільки злоякісні пухлини мають відмінний від нормальних клітин метаболізм, встановлено, що для їх функціонування потрібна збільшена кількість глюкози. Внаслідок цього в пухлинній тканині в надлишку експресуються транспортери глюкози, які часто використовуються як мішені для націлювання зондів із кон'югованим глюкозаміном [171, 172]. Отже, флуоресцентні кон'югати на основі глюкозаміну застосовують та досліджують як зонди для візуалізації пухлин, оскільки кон'югати мають здатність до накопичення в пухлинах [173].

5.1 Синтез кон'югату 3.4-GlcN

Мероціаніновий барвник **3.4** має лінкер з карбоксильною групою, який був використаний для синтезу його кон'югату з D-глюкозаміном (GlcN). Були порівняні спектральні характеристики отриманого кон'югату та вихідного барвника. Синтез **3.4-GlcN** проводили з використанням хлоргідрату 1-етил-3-(диметиламінопропил)карбодіїміду (EDCI) та гідроксибензотріазолу (HOBt) у диметилформаміді (рис. 5.1).

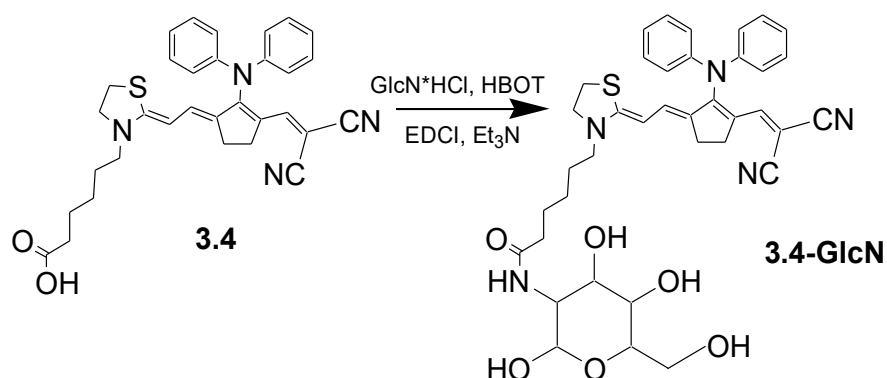


Рис. 5.1 Схема синтезу кон'югату **3.4-GlcN**

5.2 Спектральні властивості кон'югату **3.4-GlcN**

Спектральні характеристики синтезованого кон'югату **3.4-GlcN** досліджували в метанолі, водному буфері і в присутності HSA (рис. 5.2). У метанолі максимум поглинання знаходиться при 653 нм і практично співпадає з максимумом поглинання вихідного барвника **3.4**. проте із меншим значенням молярного коефіцієнту екстинкції ($\epsilon_{3.4\text{-GlcN}} = 0,87 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{3.4} = 1,84 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). У буфері спостерігається уширення спектральної кривої, а також незначне (5 нм) зміщення максимуму поглинання в синю область в порівнянні із максимумом поглинання в буфері барвника **3.4**. Отже, на відміну від барвника **3.4**, розчинність кон'югату зменшується скоріш за все внаслідок міжмолекулярної взаємодії глюкозамідних фрагментів. В присутності HSA відбувається зміщення максимуму поглинання в червону область ($\lambda_{\text{abs}} = 662 \text{ нм}$), форма кривої поглинання подібна до його кривої отриманої в метанолі. Відбувається також зростання квантових виходів флуоресценції (0,18 в присутності альбуміну проти 0,01 у воді).

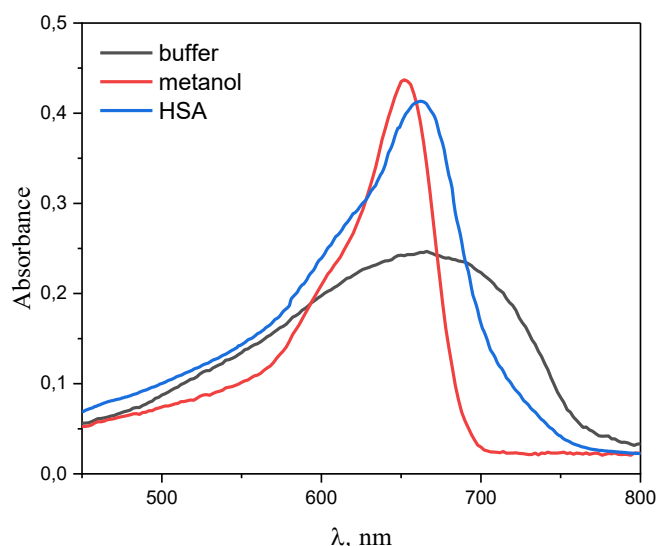


Рис. 5.2 Спектри поглинання **3.4-GlcN** у буфері, метанолі та в присутності HSA. $C = 5 \mu\text{M}$

5.3 Синтез кон'югату **4.3-GlcN**

Барвник **4.3** має високі квантові виходи флуоресценції та молярні коефіцієнти екстинкції, що є важливим для його використання як ковалентної флуоресцентної мітки. Був синтезований його кон'югат із глюкозаміном за схемою, що представлена на рис. 5.3. Синтез **4.3-GlcN** проводили з використанням хлоргідрату 1-етил-3-(диметиламінопропил)карбодіїміду (EDCI) та гідроксибензотріазолу (HOBT) у диметилформаміді. Наявність двох лінкерів з карбоксильною групою дозволила збільшити число молекул глюкозаміну на одиницю барвника до двох. З літератури відомо, що дійсно, поглинання пухлинними клітинами зонду на основі ціанінового барвника з двома залишками глюкозаміну було значно вищим, ніж поглинання несиметричного аналогу з однією молекулою глюкозаміну [174].

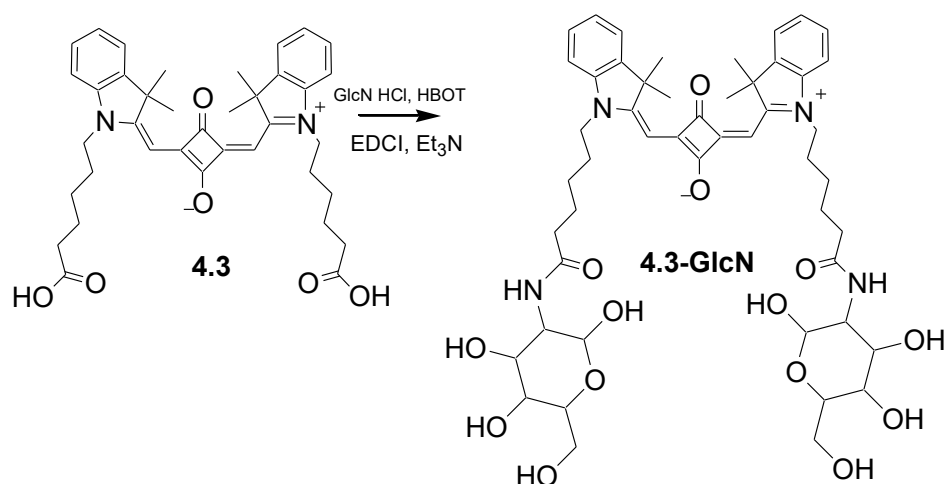


Рис. 5.3 Схема синтезу кон'югату **4.3-GlcN**

5.4 Дослідження спектральних властивостей кон'югату глюкозаміну із барвником **4.3**

Як видно з таблиці 5.1, молярні коефіцієнти екстинкції кон'югату **4.3-GlcN** зростають порівняно з вільним барвником **4.3** як в метанолі, так і у водному буфері.

Таблиця 5.1

Спектральні характеристики барвників в метанолі та буфері (λ_{abs} – максимум поглинання, λ_{em} – максимум випромінювання, ϵ – коефіцієнт молярної екстинкції, QY – квантовий вихід флуоресценції)

	метанол			буфер			
	λ_{abs} , nm	λ_{em} , nm	ϵ , 10^5 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	λ_{abs} , nm	λ_{em} , nm	ϵ , 10^5 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	QY
4.3	631	645	3	624	641	2.1	0.03
4.3-GlcN	634	647	3.7	625	642	3.4	0.05

Можливо це пов'язано з тим, що об'ємні симетричні глюкозамідні групи сквараїнового кон'югату утруднюють обертання навколо подвійних зв'язків за рахунок утворення внутрішньомолекулярних водневих зв'язків. Тоді як у випадку мероціанінових барвників, з однією молекулою глюкозаміну, погіршення спектральних властивостей можна пояснити міжмолекулярними водневими зв'язками глюкозамідних фрагментів із утворенням агрегатів, що гасять флуоресценцію.

5.3 Дослідження проникності кон'югатів до клітин MCF-7

Проникність кон'югатів **3.4-GlcN** та **4.3-GlcN** до клітин MCF-7 була досліджена за допомогою конфокальної мікроскопії. Інкубацію кон'югатів із концентрацією 5 μM проводили з клітинами протягом 30 хв, потім додатково інкубували із барвником Hoechst 33342 з наступним промиванням та фіксуванням у забуференому формаліні. Поряд з тим була проведена інкубація клітин із вихідними мероціаніновим **3.4** та сквараїновим **4.3** барвниками. Враховуючи попередні результати спектральні досліджень, ми очікували отримати вищу інтенсивність флуоресцентного сигналу для сквараїнового кон'югату. Проте результат проведеної мікроскопії клітин показав, що за однакових умов інтенсивність сигналу в клітинах кон'югату **4.3-GlcN** (рис. 5.4, б) виявилася слабшою за сигнал вихідного вільного барвника **4.3** (рис. 5.4, а). Тоді як інтенсивність флуоресценції кон'югату мероціанінового барвника не зменшувалась порівняно із вільним барвником (рис. 5.4, г).

Отже, кон'югат мероціанінового барвника продемонстрував гарну інтенсивність флуоресценції в ракових клітинах MCF-7, незважаючи на гіршу розчинність у воді та менші значення квантового виходу флуоресценції у водному середовищі порівняно з вільним барвником.

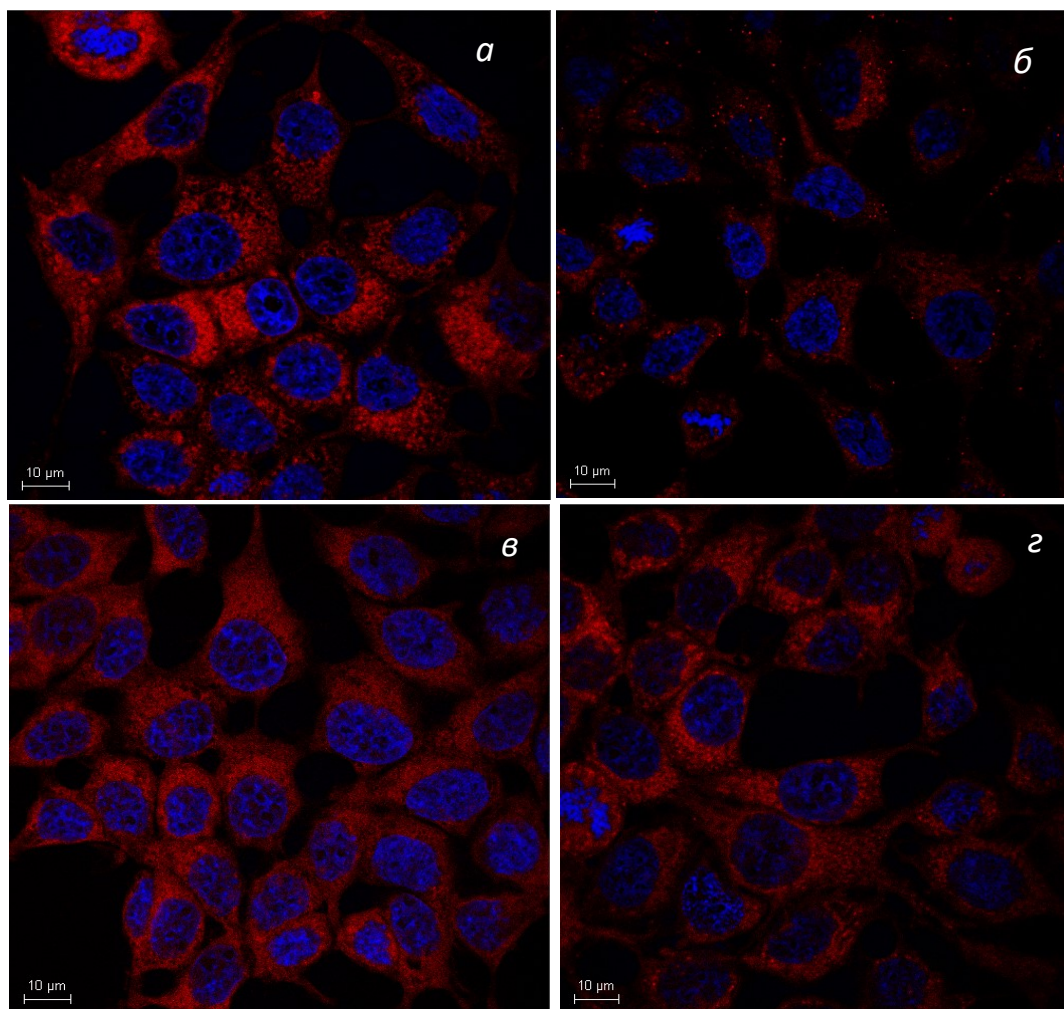


Рис. 5.4 Порівняння отриманих флуоресцентною мікроскопією зображень клітин MCF-7 в присутності скварайнового барвника **4.3** (червоне забарвлення, *а*) та кон'югата **4.3-GlcN** (червоне забарвлення, *б*), мероціанінового барвника **3.4** (червоне забарвлення, *в*) та **3.4-GlcN** (червоне забарвлення, *г*), а також барвника Hoechst 33342 (синє забарвлення, *а, б, в, г*)

Недостатня проникність кон'югату **4.3-GlcN** в клітини порівняно з вільним барвником може бути пов'язана як із стеричними ускладненнями через великий об'єм кон'югату, так і зі швидким вимиванням кон'югованого барвника при проведенні експерименту.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі проведено пошук нових внутрішньоіонних барвників та вивчено вплив їхньої будови на зв'язування з глобулярними білками, внутрішньоклітинний розподіл та здатність до генерації синглетного Оксигену. За результатами роботи зроблені наступні висновки:

1. Синтезовано п'ять нових мероціанінових барвників, що поглинають в області понад 600 нм. Показано, що введення мезо-фрагменту в поліметиновий ланцюг збільшує фотостійкість та сприяє батохромному зміщенню максимумів поглинання на 30 – 60 нм порівняно із мезо-незаміщеним барвником.

2. Встановлено, що введення дифеніламіно-групи в мезо-замісник поліметинового ланцюга барвника **3.4** підвищує константу зв'язування з людським альбуміном в 30 разів порівняно із мезо-незаміщеним барвником **3.0**.

3. Досліджена взаємодія сквараїнових барвників із глобулярними білками спектрально-флуоресцентними методами. Показано, що нековалентне зв'язування барвника **4.5** із бичачим сироватковим альбуміном спричинює зростання інтенсивності флуоресценції майже в 500 разів, тоді як у випадку інших сквараїнів спостерігалось зростання лише у 8-14 разів.

4. За допомогою МТТ-аналізу встановлено, що мероціанінові барвники **3.2** та **3.4**, а також сквараїнові барвники **4.5**, **4.7** та **4.8** не є токсичними по відношенню до клітинної лінії MCF-7.

5. З використанням флуоресцентної мікроскопії показано, що флуоресцентні барвники **3.2**, **3.4** та **4.7** проникають через мембрану живих клітин A2780 та неселективно розподіляються в цитоплазмі клітин.

6. Вивчені фотодинамічні властивості бензіндольних сквараїнових барвників із бічними гідрофільними та гідрофобними замісниками з використанням пастки синглетного Оксигену та на клітинній лінії MCF-7 після опромінення червоним світлом. Встановлено, що зростання генерації активних форм Оксигену при опроміненні барвника **4.5** відбувається за рахунок утворення його агрегатів у водному середовищі.

7. Показано, що барвники **4.7** та **4.8** в комплексі з BSA зменшують свою цитотоксичність по відношенню до клітин MCF-7, тоді як барвник **4.5** проявляв цитотоксичність при опроміненні навіть за присутності альбуміну.

8. Вперше досліджені кон'югати із глюкозаміном **3.4-GlcN** та **4.3-GlcN** на основі мєраціанінового та сквараїнового барвників. Показано, що симетричний сквараїновий кон'югат не візуалізується в клітинах, тоді як несиметричний мероціаніновий кон'югат проникає в клітини MCF-7 та візуалізує їх.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Wang, S., Li, B., & Zhang, F. (2020). Molecular Fluorophores for Deep-Tissue Bioimaging. *ACS central science*, 6(8),1302–1316. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00544>
2. Wu, J.; Shi, Z.; Zhu, L.; Li, J.; Han, X.; Xu, M.; Hao, S.; Fan, Y.; Shao, T.; Bai, H.; et al. (2022). The Design and Bioimaging Applications of NIR Fluorescent Organic Dyes with High Brightness. *Advanced Optical. Materials*, 10(8), 2102514. <https://doi.org/10.1002/adom.202102514>
3. Escobedo, J. O., Rusin, O., Lim, S., & Strongin, R. M. (2010). NIR dyes for bioimaging applications. *Current opinion in chemical biology*, 14(1), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.10.022>
4. Zeng, S, Liu, X, Kafuti, Y, Kim, H, Wang, J, Peng, X, Li, H, & J Yoon, J. (2023) Fluorescent dyes based on rhodamine derivatives for bioimaging and therapeutics: recent progress, challenges, and prospects. *Chemical Society Reviews*, 52 (16), 5607-5651. doi.org/10.1039/D2CS00799A
5. Martelli, C., Lo Dico, A., Diceglie, C., Lucignani, G., & Ottobriani, L. (2016). Optical imaging probes in oncology. *Oncotarget*, 7(30), 48753–48787. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9066>
6. Webster, S., Padilha, L. A., Hu, H., Przhonska, O. V., Hagan, D. J., Van Stryland, E. W., ... Kachkovski, A. D. (2008). Structure and linear spectroscopic properties of near IR polymethine dyes. *Journal of Luminescence*, 128(12), 1927–1936. [doi:10.1016/j.jlumin.2008.06.002](https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2008.06.002).
7. Markova, L. I., Terpetschnig, E. A., & Patsenker, L. D. (2013). Comparison of a series of hydrophilic squaraine and cyanine dyes for use as biological labels. *Dyes and Pigments*, 99(3), 561–570. [doi:10.1016/j.dyepig.2013.06.022](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.06.022)
8. Tolmachev A.I., Slominskii Yu. L., Ishchenko A.A. et al. (1998). New Cyanine Dyes Absorbing in the NIR Region. *Kluwer Academic Publishers*, 52, 385 - 415. https://doi.org/10.1007/978-94-011-5102-3_19.

9. Ishchenko A.A., Derevyanko N.A., V.M. Zubarovskii V. M., Tolmachev A.I. (1985). Influence of length of the polymethine chain on width of absorption bands of symmetric cyanine dyes. *Theor. Exp. Chem*, 20(4), 415 - 422. <https://doi.org/10.1007/BF00516576>.
10. Przhonska, O. V., Hu, H., Webster, S., Bricks, J. L., Viniychuk, A. A., Kachkovski, A. D., & Slominsky, Y. L. (2013). Electronic transitions in a series of 2-azaazulene polymethine dyes with different π -conjugation lengths. *Chemical Physics*, 411, 17–25. doi:10.1016/j.chemphys.2012.11.017.
11. Ndaleh D, Smith C, Yaddehige M, Shaik A K, Watkins D, Hammer N, Delcamp J.(2021). Shortwave Infrared Absorptive and Emissive Pentamethine-Bridged Indolizine Cyanine Dyes. *The Journal of Organic Chemistry*, 86(21), 15376-15386.
12. Yi, X., Yan, F., Wang, F., Qin, W., Wu, G., Yang, X., Shao, C., Chung, L. W., & Yuan, J. (2015). IR-780 dye for near-infrared fluorescence imaging in prostate cancer. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 21, 511–517. <https://doi.org/10.12659/MSM.892437>
13. Yang, X., Shi, C., Tong, R., Qian, W., Zhau, H. E., Wang, R., Zhu, G., Cheng, J., Yang, V. W., Cheng, T., Henary, M., Strekowski, L., & Chung, L. W. (2010). Near IR heptamethine cyanine dye-mediated cancer imaging. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16(10), 2833–2844. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0059>
14. Yang, X., Shao, C., Wang, R., Chu, Y., Hu, P., Master, V., Osunkoya, A. O., Kim, H. L., Zhau, H. E., & Chung, W. K. (2013). Optical imaging of kidney cancer with novel near-infrared heptamethine carbocyanine fluorescent dyes. *The Journal of urology*, 189(2), 702. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.09.056>
15. Rüdiger M. Exner, Dr. Fernando Cortezon-Tamarit, Prof. Sofia I. Pascu. (2021) Explorations into the Effect of meso-Substituents in Tricarbocyanine Dyes: A Path to Diverse Biomolecular Probes and Materials. *Angewandte Chemie*, 60 (12), 6230-6241. doi.org/10.1002/anie.202008075
16. Exner, R. M., Cortezon-Tamarit, F., Ge, H., Pourzand, C., & Pascu, S. I. (2022). Unraveling the Chemistry of *meso*-Cl Tricarbocyanine Dyes in Conjugation Reactions

for the Creation of Peptide Bonds. *ACS bio & med chem Au*, 2(6), 642–654.
<https://doi.org/10.1021/acsbiomedchemau.2c00053>

17. Yuan, J. (2015). IR-780 Dye for Near-Infrared Fluorescence Imaging in Prostate Cancer. *Medical Science Monitor*, 21, 511–517. doi: 10.12659/MSM.892437.

18. Feng Z., Yu X., Jiang M. et al. (2019) Excretable IR-820 for in vivo NIR-II fluorescence cerebrovascular imaging and photothermal therapy of subcutaneous tumor. *Theranostics*, 9(19), 5706 – 5719. doi:10.7150/thno.31332

19. Bhattarai, P., & Dai, Z. (2017). Cyanine based Nanoprobes for Cancer Theranostics. *Advanced Healthcare Materials*, 6(14), 1700262. doi:10.1002/adhm.201700262.

20. Li, B., Lu, L., Zhao, M., Lei, Z., & Zhang, F. (2018). An Efficient 1064 nm NIR-II Excitation Fluorescent Molecular Dye for Deep-Tissue High-Resolution Dynamic Bioimaging. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 57(25), 7483–7487. <https://doi.org/10.1002/anie.201801226>

21. Luciano, M., Crooke, S., Nourian, S, Dingle, I, Nani, RR, Kline, G, Patel, NL, Robinson CM, Difilippantonio S, Kalen JD, Finn MG, Schnermann MJ. (2019). A Nonaggregating Heptamethine Cyanine for Building Brighter Labeled Biomolecules. *ACS Chem Biol*, 14(5), 934-940. doi: 10.1021/acschembio.9b00122.

22. Krieg, M., & Bilitz, J. M. (1996). Structurally modified trimethine thiocarbocyanine dyes. Effect of N-alkyl substituents on antineoplastic behavior. *Biochemical pharmacology*, 51(11), 1461–1467. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(96\)00087-1](https://doi.org/10.1016/0006-2952(96)00087-1).

23. Duan, L., Wang, L., Zhang, C., Yu, L., Guo, F., Sun, Z., Xu, Y., & Yan, F. (2019). Role of near-infrared heptamethine cyanine dye IR-783 in diagnosis of cervical cancer and its mechanism. *International journal of clinical and experimental pathology*, 12(6), 2353–2362.

24. Raveendran, A., Surendran, S. P., Ser, J., Alam, K., Cho, H., & Jeong, Y. Y. (2021). Heptamethine Cyanine Dye MHI-148-Mediated Drug Delivery System to Enhance the Anticancer Efficiency of Paclitaxel. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 7169-7180. <https://doi.org/10.2147/IJN.S325322>

25. Yadav, Y., Levitz, A., Dharma, S., Aneja, R., & Henary, M. (2017). Effects of heterocyclic N -alkyl chain length on cancer cell uptake of near infrared heptamethine cyanine dyes. *Dyes and Pigments*, 145, 307–314. doi:10.1016/j.dyepig.2017.06.016.
26. Reeßing, F., Bispo, M., López-Álvarez, M., van Oosten, M., Feringa, B. L., van Dijl, J. M., & Szymański, W. (2020). A Facile and Reproducible Synthesis of Near-Infrared Fluorescent Conjugates with Small Targeting Molecules for Microbial Infection Imaging. *ACS omega*, 5(35), 22071–22080. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02094>
27. Sleiman, M. H., & Ladame, S. (2014). Synthesis of squaraine dyes under mild conditions: applications for labelling and sensing of biomolecules. *Chemical Communications*, 50(40), 5288. doi:10.1039/c3cc47894g
28. Sato, K., Gorka, A. P., Nagaya, T., Michie, M. S., Nani, R. R., Nakamura, Y., Coble, V. L., Vasalatiy, O. V., Swenson, R. E., Choyke, P. L., Schnermann, M. J., & Kobayashi, H. (2016). Role of Fluorophore Charge on the In Vivo Optical Imaging Properties of Near-Infrared Cyanine Dye/Monoclonal Antibody Conjugates. *Bioconjugate chemistry*, 27(2), 404–413. doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00492.
29. Takakura, H., Sato, H., Nakajima, K., Suzuki, M., & Ogawa, M. (2021). In Vitro and In Vivo Cell Uptake of a Cell-Penetrating Peptide Conjugated with Fluorescent Dyes Having Different Chemical Properties. *Cancers*, 13(9), 2245. <https://doi.org/10.3390/cancers13092245>.
30. Zhang, Y., Lv, T., Zhang, H., Xie, X., Li, Z., Chen, H., & Gao, Y. (2017). Folate and Heptamethine Cyanine Modified Chitosan-Based Nanotheranostics for Tumor Targeted Near-Infrared Fluorescence Imaging and Photodynamic Therapy. *Biomacromolecules*, 18(7), 2146–2160. doi:10.1021/acs.biomac.7b00466
31. Shimi, M., Sankar, V., Rahim, M. K. A., Nitha, P. R., Das, S., Radhakrishnan, K. V., & Raghu, K. G. (2017). Novel glycoconjugated squaraine dyes for selective optical imaging of cancer cells. *Chemical Communications*, 53(39), 5433–5436. doi:10.1039/c6cc10282d

32. Ia. B. Kuziv, O. V. Novosylina, I. Ya. Dubey. (2020) Fluorescent conjugates of D-glucosamine with 3-thiazolylcoumarins:synthesis, characterization and potential use as cell imaging agents. *Biopolymers and Cell*, 36(5), P 358–370
doi:<http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A39>
33. Ono, K., Takigawa, S., & Yamada, K. (2020). L-Glucose: Another Path to Cancer Cells. *Cancers*, 12(4), 850. <https://doi.org/10.3390/cancers12040850>.
34. Schreiber, C. L., Zhai, C., Dempsey, J. M., McGarraugh, H. H., Matthews, B. P., Christmann, C. R., & Smith, B. D. (2020). Paired Agent Fluorescence Imaging of Cancer in a Living Mouse Using Preassembled Squaraine Molecular Probes with Emission Wavelengths of 690 and 830 nm. *Bioconjugate chemistry*, 31(2), 214–223. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00750>.
35. Bourgeois, P., Veys, I., Noterman, D., De Neubourg, F., Chintinne, M., Vankerckhove, S., & Nogaret, J. M. (2021). Near-Infrared Fluorescence Imaging of Breast Cancer and Axillary Lymph Nodes After Intravenous Injection of Free Indocyanine Green. *Frontiers in oncology*, 11, 602906. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.602906>.
36. Keating, J., Tchou, J., Okusanya, O., Fisher, C., Batiste, R., Jiang, J., ... Singhal, S. (2016). Identification of breast cancer margins using intraoperative near-infrared imaging. *Journal of Surgical Oncology*, 113(5), 508–514. doi:10.1002/jso.24167.
37. Ntziachristos, V., Yodh, A. G., Schnall, M., & Chance, B. (2000). Concurrent MRI and diffuse optical tomography of breast after indocyanine green enhancement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(6), 2767–2772. <https://doi.org/10.1073/pnas.04057059738>.
38. Crawford, T., Moshnikova, A., Roles, S., Weerakkody, D., DuPont, M., Carter, L. M., Shen, J., Engelman, D. M., Lewis, J. S., Andreev, O. A., & Reshetnyak, Y. K. (2020). pHLIP ICG for delineation of tumors and blood flow during fluorescence-guided surgery. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75443-5>
39. Ebert, B., Riefke, B., Sukowski, U., & Licha, K. (2011). Cyanine dyes as contrast agents for near-infrared imaging in vivo: acute tolerance, pharmacokinetics, and

fluorescence imaging. *Journal of Biomedical Optics*, 16(6), 066003. doi:10.1117/1.3585678.

40. Grabchuk G., Derevyanko N., Ischenko A. (2013). Features of methylmethacrylate thermopolymerization in the presence of intraionic dyes. *Chemistry and chemical technology*, 7(4), 429-434.

41. Kulinich, A. V., Ishchenko, A. A., Shishkina, S. V., Konovalova, I. S., & Shishkin, O. V. (2007). Molecular and crystal structure of di- and hexamethine merocyanine dyes — derivatives of 3H-indole and malononitrile — manifesting positive solvatochromism. *Journal of Structural Chemistry*, 48(5), 914–921. doi:10.1007/s10947-007-0135-4

42. Ishchenko, A. A., Kulinich, A. V., Bondarev, S. L., & Knyukshto, V. N. (2007). Photodynamics of Polyene–Polymethine Transformations and Spectral Fluorescent Properties of Merocyanine Dyes. *The Journal of Physical Chemistry A*, 111(51), 13629–13637. doi:10.1021/jp076016u

43. Ishchenko, A. A., Kulinich, A. V., & Shishkina, S. V. (2017). Effect of donor terminal group and polymethine chain length on structure of merocyanine dyes in the crystal state. *Dyes and Pigments*, 145, 181–188. doi:10.1016/j.dyepig.2017.06.009

44. Ishchenko, A. A., Kulinich, A. V., Bondarev, S. L., & Raichenok, T. F. (2018). UV–Vis absorption spectra and electronic structure of merocyanines in the gas phase. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 190, 332–335. doi:10.1016/j.saa.2017.09.054

45. А.В.Кулініч, О.О.Іщенко. Електронна будова та спектрально-флуоресцентні властивості мероціанінів. Київ: Наукова думка, 2022. – 319с. ISBN 978-966-00-1871-6

46. Park, H., & Chang, S.-K. (2015). Signaling of water content in organic solvents by solvatochromism of a hydroxynaphthalimide-based merocyanine dye. *Dyes and Pigments*, 122, 324–330. doi:10.1016/j.dyepig.2015.07.010.

47. Chen, J. Y., Cheung, N. H., Fung, M. C., Wen, J. M., Leung, W. N., & Mak, N. K. (2000). Subcellular localization of merocyanine 540 (MC540) and induction of

- apoptosis in murine myeloid leukemia cells. *Photochemistry and photobiology*, 72(1), 114–120. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2000\)072<0114:slomma>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2000)072<0114:slomma>2.0.co;2).
48. Touthkine, A., Nguyen, D.-V., & Hahn, K. M. (2007). Simple One-Pot Preparation of Water-Soluble, Cysteine-Reactive Cyanine and Merocyanine Dyes for Biological Imaging. *Bioconjugate Chemistry*, 18(4), 1344–1348. doi:10.1021/bc060376n
 49. Nalbant, P., Hodgson, L., Kraynov, V., Touthkine, A., & Hahn, K. M. (2004). Activation of endogenous Cdc42 visualized in living cells. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5690), 1615–1619. doi.org/10.1126/science.1100367
 50. MacNevin, C. J., Gremyachinskiy, D., Hsu, C.-W., Li, L., Rougie, M., Davis, T. T., & Hahn, K. M. (2013). Environment-Sensing Merocyanine Dyes for Live Cell Imaging Applications. *Bioconjugate Chemistry*, 24(2), 215–223. doi:10.1021/bc3005073
 51. Aliyan, A., Cook, N. P., & Martí, A. A. (2019). Interrogating Amyloid Aggregates using Fluorescent Probes. *Chemical Reviews*. doi:10.1021/acs.chemrev.9b00404.
 52. Fu, H., Cui, M., Tu, P., Pan, Z., & Liu, B. (2014). Evaluation of molecules based on the electron donor–acceptor architecture as near-infrared β -amyloid-targeting probes. *Chemical Communications*, 50(80), 11875–11878. doi:10.1039/c4cc04907a.
 53. Yan, J., Zhu, J., Zhou, K., Wang, J., Tan, H., Xu, Z., ... Zhang, L. (2017). Neutral merocyanine dyes: for in vivo NIR fluorescence imaging of amyloid- β plaques. *Chemical Communications*, 53(71), 9910–9913. doi:10.1039/c7cc05056a.
 54. Yang, H. L., Fang, S. Q., Tang, Y. W., Wang, C., Luo, H., Qu, L. L., Zhao, J. H., Shi, C. J., Yin, F. C., Wang, X. B., & Kong, L. Y. (2019). A hemicyanine derivative for near-infrared imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease. *European journal of medicinal chemistry*, 179, 736–743. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.07.005>.
 55. Guo, R., Yin, J., Ma, Y., Li, G., Wang, Q., & Lin, W. (2018). A novel NIR probe for detection of viscosity in cellular lipid droplets, zebra fishes and living mice. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 271, 321–328. doi:10.1016/j.snb.2018.05.055.
 56. Mukherjee, T., Martinez-Sanchez, R. J., Fam, K. T., Bou, S., Richert, L., Garnier, D., Collot, M. (2021). Near infrared emitting molecular rotor based on merocyanine for

- probing the viscosity of cellular lipid environments. *Materials Chemistry Frontiers*, 5(5), 2459–2469. doi:10.1039/d0qm00872a.
57. Redmond, R. W., Srichai, M. B., Bilitz, J. M., Schlomer, D. D., & Krieg, M. (1994). Merocyanine dyes: effect of structural modifications on photophysical properties and biological activity. *Photochemistry and Photobiology*, 60(4), 348–355. doi:10.1111/j.1751-1097.1994.tb05114.x
58. Ishchenko, A. A., & Kulinich, A. V. (2016). The unusual solvatochromism and solvatofluorochromism of longwave absorbing and emitting barbiturate merocyanine dyes. *Methods and applications in fluorescence*, 4(3), 034001. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/4/3/034001>
59. Kulinich, A. V., Derevyanko, N. A., & Ishchenko, A. A. (2006). Synthesis, structure, and solvatochromism of merocyanine dyes based on barbituric acid. *Russian Journal of General Chemistry*, 76(9), 1441–1457. doi:10.1134/s1070363206090167
60. Kulinich, A. V., Ishchenko, A. A., Bondarev, S. L., & Knyukshto, V. N. (2021). Effect of donor and acceptor end-groups on electronic structure and spectral-fluorescent properties of merocyanines in frozen ethanol. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 405, 112932. doi: 10.1016/j.jphotochem.2020.112611
61. Ibrayev, N. K., Seliverstova, E. V., Valiev, R. R., Kanapina, A. E., Ishchenko, A. A., Kulinich, A. V., Kurten, T., & Sundholm, D. (2023). Influence of plasmons on the luminescence properties of solvatochromic merocyanine dyes with different solvatochromism. *Physical chemistry chemical physics: PCCP*, 25(34), 22851–22861. <https://doi.org/10.1039/d3cp03029f>
62. Kulinich, A. V., Derevyanko, N. A., & Ishchenko, A. A. (2007). Electronic structure and solvatochromism of merocyanines based on N,N-diethylthiobarbituric acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 188(2-3), 207–217. doi: 10.1016/j.jphotochem.2006.12.
63. Kulinich, A. V., Derevyanko, N. A., Ishchenko, A. A., Bondarev, S. L., & Knyukshto, V. N. (2008). Structure and fluorescent properties of merocyanines based on N,N-diethylthiobarbituric acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 197(1), 40–49. doi: 10.1016/j.jphotochem.2007.12.

64. Kulinich, A. V., Derevyanko, N. A., Mikitenko, E. K., & Ishchenko, A. A. (2010). Merocyanines based on 1,3-indanedione: electronic structure and solvatochromism. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 24(8), 732–742. doi:10.1002/poc.1821
65. Kulinich, A. V., Mikitenko, E. K., & Ishchenko, A. A. (2015). Fluorescent properties of merocyanines based on 1,3-indandione. *Optics and Spectroscopy*, 119(1), 39–48. doi:10.1134/s0030400x15070164
66. Humeniuk, H. V., Derevyanko, N. A., Ishchenko, A. A., & Kulinich, A. V. (2019). Merocyanines based on 1,2-diphenyl-3,5-pyrazolidinedione. *New Journal of Chemistry*. doi:10.1039/c9nj03275d
67. Nadezhda, A., Derevyanko, N. A., Ishchenko, A. A., & Kulinich, A. V. (2020). Deeply coloured and fluorescent highly dipolar merocyanines based on tricyanofuran. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 22(5), 2748 – 2762. doi:10.1039/c9cp05827c
68. Xia, G., & Wang, H. (2017). Squaraine dyes: The hierarchical synthesis and its application in optical detection. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 31, 84–113. doi: 10.1016/j.jphotochemrev.2017
69. Xiao, Q., Yang, S., Wang, R., Zhang, Y., Zhang, H., Zhou, H., & Li, Z. (2018). Synthesis, structure and material properties of thiopyranylidene-based asymmetrical squaraines. *Dyes and Pigments*, 154, 137–144. doi: 10.1016/j.dyepig.2018.03.003
70. Ilin K, MacCuaig WM, Laramie M, Jeouty JN, McNally LR, Henary M. (2020). Squaraine Dyes: Molecular Design for Different Applications and Remaining Challenges. *Bioconjugate Chemistry*, 31(2):194-213. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00482.
71. Skryshevskii, Y. A., Davidenko, N. A., Ishchenko, A. A., Kadashchuk, A. K., & Ostapenko, N. I. (2000). Special features of spectral and luminescent properties of squarilic dyes in polymer matrices. *Optics and Spectroscopy*, 88(3), 352–358. doi:10.1134/1.626801
72. Kurdiukova, I. V., Kulinich, A. V., & Ishchenko, A. A. (2012). Near-infrared squarate and croconate dianions derived from tetranitrofluorene. *New Journal of Chemistry*, 36(8), 1564. doi:10.1039/c2nj40303j

73. Ibrayev, N. K., Seliverstova, E. V., Ishchenko, A. A., & Kudinova, M. A. (2017). The effect of sulfonate groups on spectral-luminescent and photovoltaic properties of squarylium dyes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 346, 570–575. doi:10.1016/j.jphotochem.2017.06
74. Qin C, Numata Y, Zhang S, Yang X, Islam A, Zhang K, Chen H, and Han L (2014) Novel Near Infrared Squaraine Sensitizers for Stable and Efficient Dye Sensitized Solar Cells. *Advanced Functional Materials*, 24 (20), 3059–3066.
75. Mayerhöffer, U., Fimmel, B., & Würthner, F. (2012). Bright near-infrared fluorophores based on squaraines by unexpected halogen effects. *Angewandte Chemie*, 51(1), 164–167. <https://doi.org/10.1002/anie.201107176>.
76. Martins TD, Pacheco ML, Boto RE, Almeida P, Farinha JPS, and Reis LV (2017) Synthesis, characterization and protein-association of dicyanomethylene squaraine dyes. *Dyes and Pigments*, 147, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.07.070>
77. Umezawa, K., Citterio, D., & Suzuki, K. (2008). Water-soluble NIR fluorescent probes based on squaraine and their application for protein labeling. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 24(2), 213–217. <https://doi.org/10.2116/analsci.24.213>.
78. Gassensmith, J. J., Baumes, J. M., & Smith, B. D. (2009). Discovery and early development of squaraine rotaxanes. *Chemical Communications*, (42), 6329. doi:10.1039/b911064j
79. Wang, X., Chen, Y., Xiong, Y., Zhang, L., Wang, B., Liu, Y., & Cui, M. (2023). Design and Characterization of Squaramic Acid-Based Prostate-Specific Membrane Antigen Inhibitors for Prostate Cancer. *Journal of medicinal chemistry*, 66(10), 6889–6904. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00309>
80. Oetl, K., Stadlbauer, V., Petter, F., Greilberger, J., Putz-Bankuti, C., Hallström, S., & Stauber, R. E. (2008). Oxidative damage of albumin in advanced liver disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1782(7-8), 469–473. doi:10.1016/j.bbadis.2008.04.002

81. Jermendy, G., & Ruggenenti, P. (2007). Preventing microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 23(2), 100–110. doi:10.1002/dmrr.693.
82. Ghuman, J., Zunszain, P. A., Petitpas, I., Bhattacharya, A. A., Otagiri, M., & Curry, S. (2005). Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *Journal of molecular biology*, 353(1), 38–52. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.075>.
83. Jiménez, M. C., Miranda, M. A., & Vayá, I. (2005). Triplet Excited States as Chiral Reporters for the Binding of Drugs to Transport Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 127(29), 10134–10135. doi:10.1021/ja0514489
84. Dockal, M., Carter, D. C., & Rüker, F. (1999). The three recombinant domains of human serum albumin. Structural characterization and ligand binding properties. *The Journal of biological chemistry*, 274(41), 29303–29310. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.41.29303>
85. Орлов В.Д., Ліпсон В.В., Іванов В.В. (2018). Медична хімія: навчальний посібник. – Х.: Ексклюзив, ISBN 978-617-7204-80-9.
86. Lehman-McKeeman L.D. (2010). Chapter 5. absorption, distribution, and excretion of toxicants. Klaassen C.D., & Watkins J.B., III(Eds.), Casarett & Doull's *Essentials of Toxicology*, 2e. McGraw Hill.
87. Wu J.B., Shao C., Li X., et al. (2014). Near-infrared fluorescence imaging of cancer mediated by tumor hypoxia and HIF1 α /OATPs signaling axis. *Biomaterials*. 35(28), 8175–8185. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.05.073.
88. Usama, S. M., Park, G. K., Nomura, S., Baek, Y., Choi, H. S., & Burgess, K. (2020). Role of Albumin in Accumulation and Persistence of Tumor-Seeking Cyanine Dyes. *Bioconjugate chemistry*, 31(2), 248–259. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00771>.
89. Liu, Z., & Chen, X. (2016). Simple bioconjugate chemistry serves great clinical advances: albumin as a versatile platform for diagnosis and precision therapy. *Chemical Society reviews*, 45(5), 1432–1456. <https://doi.org/10.1039/c5cs00158g>

90. Pronkin, P. G., & Tatikolov, A. S. (2022). Photonics of Trimethine Cyanine Dyes as Probes for Biomolecules. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(19), 6367. <https://doi.org/10.3390/molecules27196367>
91. Stehle G, Sinn H, Wunder A, Schrenk HH, Schutt S, Maier-Borst W, and Heene DL (1997) The loading rate determines tumor targeting properties of methotrexate-albumin conjugates in rats. *Anti-Cancer Drugs* 8, 667–685.
92. Frei, E. (2011). Albumin binding ligands and albumin conjugate uptake by cancer cells. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 3, 11. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-3-11>.
93. Yang, F., Zhang, Y., & Liang, H. (2014). Interactive association of drugs binding to human serum albumin. *International journal of molecular sciences*, 15(3), 3580–3595. <https://doi.org/10.3390/ijms15033580>.
94. Abuin E, Aspee A, Lissi E, Leon L.(2007). Binding of rose Bengal to bovine serum albumin. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 52(2), 1196-1197. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072007000200017>
95. Chakraborty, G., Ray, A. K., Singh, P. K., & Pal, H. (2018). A highly fluorescent turn-on probe in the near-infrared region for albumin quantification in serum matrix. *Chemical Communications*, 54(60), 8383–8386. doi:10.1039/c8cc05058a
96. Chen, Q., Liang, C., Wang, C., & Liu, Z. (2015). An imagable and photothermal "Abraxane-like" nanodrug for combination cancer therapy to treat subcutaneous and metastatic breast tumors. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 27(5), 903–910. <https://doi.org/10.1002/adma.201404308>.
97. Onoe, S., Temma, T., Shimizu, Y., Ono, M., & Saji, H. (2014). Investigation of cyanine dyes for in vivo optical imaging of altered mitochondrial membrane potential in tumors. *Cancer medicine*, 3(4), 775–786. <https://doi.org/10.1002/cam4.252>
98. Kamisaka K., Yatsuji Y., Yamada H., Kameda H., (1974). The binding of indocyanine green and other organic anions to serum proteins in liver diseases. *Clinica Chimica Acta*, 53(2), 255–264.

99. Ciamberlini C., Guarnieri V., Longobardi G., Poggi P., Donati M.C., Panzardi G. (1997). Indocyanine green videoangiography using cooled charge-coupled devices in central serous choroidopathy. *Journal of Biomedical Optics*, 2(2), 218–225.
100. Genina E.A., Bashkatov A.N., Kochubei V.I., Tuchin V.V., Altshuler G.B. (2001). The interaction of Indocyanine Green dye with the human epidermis studied In vivo. *Technical Physics Letters*, 27(7), 602–604.
101. Hamann, F. M., Brehm, R., Pauli, J., Grabolle, M., Frank, W., Kaiser, W. A., Fischer, D., Resch-Genger, U., & Hilger, I. (2011). Controlled modulation of serum protein binding and biodistribution of asymmetric cyanine dyes by variation of the number of sulfonate groups. *Molecular imaging*, 10(4), 258–269. <https://doi.org/10.2310/7290.2011.00005>.
102. Lin, F., Das, P., Zhao, Y., Shen, B., Hu, R., Zhou, F., Liu, L., & Qu, J. (2019). Monitoring the endocytosis of bovine serum albumin based on the fluorescence lifetime of small squaraine dye in living cells. *Biomedical optics express*, 11(1), 149–159. <https://doi.org/10.1364/BOE.11.000149>
103. Welder, F., Paul, B., Nakazumi, H., Yagi, S., Colyer, C.L. (2003) Symmetric and asymmetric squarylium dyes as noncovalent protein labels: a study by fluorimetry and capillary electrophoresis. *Journal of chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 793(1):93-105. DOI: 10.1016/s1570-0232(03)00367-2.
104. Zhang, Y., Yue, X., Kim, B., Yao, S., Bondar, M. V., & Belfield, K. D. (2013). Bovine Serum Albumin Nanoparticles with Fluorogenic Near-IR-Emitting Squaraine Dyes. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5(17), 8710–8717. doi:10.1021/am402361w.
105. Cai, R., & Chen, C. (2019). The Crown and the Scepter: Roles of the Protein Corona in Nanomedicine. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 31(45), e1805740. <https://doi.org/10.1002/adma.201805740>.
106. Choi, H. S., Gibbs, S. L., Lee, J. H., Kim, S. H., Ashitate, Y., Liu, F., Hyun, H., Park, G., Xie, Y., Bae, S., Henary, M., & Frangioni, J. V. (2013). Targeted zwitterionic near-infrared fluorophores for improved optical imaging. *Nature biotechnology*, 31(2), 148–153. <https://doi.org/10.1038/nbt.2468>.

107. Choi, H. S., Nasr, K., Alyabyev, S., Feith, D., Lee, J. H., Kim, S. H., Ashitate, Y., Hyun, H., Patonay, G., Strekowski, L., Henary, M., & Frangioni, J. V. (2011). Synthesis and in vivo fate of zwitterionic near-infrared fluorophores. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 50(28), 6258–6263. <https://doi.org/10.1002/anie.201102459>.
108. Gunaydin, G., Gedik, M. E., & Ayan, S. (2021). Photodynamic Therapy-Current Limitations and Novel Approaches. *Frontiers in chemistry*, 9, 691697. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.691697>
109. Dolmans, D. E., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2003). Photodynamic therapy for cancer. *Nature reviews. Cancer*, 3(5), 380–387. <https://doi.org/10.1038/nrc1071>.
110. Voiciuk, V., Redeckas, K., Derevyanko, N. A., Kulinich, A. V., Barkauskas, M., Vengris, M., ... Ishchenko, A. A. (2014). Study of photophysical properties of a series of polymethine dyes by femtosecond laser photolysis. *Dyes and Pigments*, 109, 120–126. doi:10.1016/j.dyepig.2014.05.012.
111. Kulinich, A. V., Ishchenko, A. A., Chibisov, A. K., & Zakharova, G. V. (2014). Effect of electronic asymmetry and the polymethine chain length on photoprocesses in merocyanine dyes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 274, 91–97. doi:10.1016/j.jphotochem.2013.09.
112. Redeckas K., Voiciuk V., Ishchenko A.A., Vengris M. (2018). Dark states of symmetric polymethine dyes revealed by pump–dump–probe spectroscopy. *Lithuanian Journal of Physics*. 58(4): 346–357. <https://doi.org/10.3952/physics.v58i4.3879>.
113. Ishchenko A.A., Kurdyukova I.V., Bogdanovich M.V., Bondarev S.L., Romanenko A.A., Ryabtsev A.G., Ryabtsev G.I. (2021). Electronic structure and spectral-fluorescent properties of thiopyrrolo-4-tricarbocyanine laser dyes. *Optics and Spectroscopy*. 129(8), 926 – 934. <https://doi.org/10.1134/S0030400X21070080>.
114. D'Alessandro, S., & Priefer, R. (2020). Non-Porphyrin Dyes Used as Photosensitizers in Photodynamic Therapy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 101979. doi:10.1016/j.jddst.2020.101979

115. Kulinich, A. V., Ishchenko, A. A., & Kurdyukov, V. V. (2019). Effect of bulky substituents in the donor and acceptor terminal groups on solvatochromism of Brooker's merocyanine. *New Journal of Chemistry*. 43(19), 7379 – 7385. doi:10.1039/c9nj00831d
116. Derevyanko, N. A., Ishchenko, A. A., & Kulinich, A. V. (2020). Deeply coloured and fluorescent highly dipolar merocyanines based on tricyanofuran. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 22(5), 2748 – 2762. doi:10.1039/c9cp05827c
117. Zareba, M., Niziolek, M., Korytowski, W., & Girotti, A. W. (2005). Merocyanine 540-sensitized photokilling of leukemia cells: role of post-irradiation chain peroxidation of plasma membrane lipids as revealed by nitric oxide protection. *Biochimica et biophysica acta*, 1722(1), 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.11.007>
118. Li, Z., Huang, B., Wang, Y., Yuan, W., Wu, Y., Yu, R., Xing, G., Zou, T., & Tao, Y. (2020). Design, synthesis and application in biological imaging of a novel red fluorescent dye based on a rhodanine derivative. *RSC advances*, 11(1), 160–163. <https://doi.org/10.1039/d0ra08998b>.
119. Lin, H. Y., Chen, C. T., & Huang, C. T. (2004). Use of merocyanine 540 for photodynamic inactivation of Staphylococcus aureus planktonic and biofilm cells. *Applied and environmental microbiology*, 70(11), 6453–6458. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6453-6458.2004>.
120. Lum, L. G., Yamagami, M., Giddings, B. R., Joshi, I., Schober, S. L., Sensenbrenner, L. L., & Sieber, F. (1991). The immunoregulatory effects of merocyanine 540 on in vitro human T- and B-lymphocyte functions. *Blood*, 77(12), 2701–2706.
121. Devi, D. G., Cibin, T. R., & Abraham, A. (2013). Bis (3,5-diiodo-2,4,6-trihydroxyphenyl) squaraine photodynamic therapy induces in vivo tumor ablation by triggering cytochrome c dependent mitochondria mediated apoptosis. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 10(4), 510–517. doi:10.1016/j.pdpdt.2013.04.005
122. Sushil Khopkar, Ganapati Shankarling. (2019). Synthesis, photophysical properties and applications of NIR absorbing unsymmetrical squaraines: A review. *Dyes and Pigments*. 170, 107645. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107645>.

123. Mandim, F., Graça, V. C., Calhelha, R. C., Machado, L. F., Ferreira, F. V., Ferreira, F. R., & Santos, P. F. (2019). Synthesis, Photochemical and In Vitro Cytotoxic Evaluation of New Iodinated Aminosquaraines as Potential Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Molecules*, 24(5). doi.org/10.3390/molecules24050863.
124. Magalhães, Á. F., Graça, V. C., Calhelha, R. C., et al. (2019). Synthesis, photochemical and in vitro cytotoxic evaluation of benzoselenazole-based aminosquaraines. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 18, 336–342. <https://doi.org/10.1039/C8PP00201K>
125. Lima, E., Silva, J. F., Santos, A. O., et al. (2020). Photodynamic activity of indolenine-based aminosquaraine cyanine dyes: Synthesis and in vitro photobiological evaluation. *Dyes and Pigments*, 174, 108024. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.108024>
126. Shandura, M. P., Poronik, Y. M., Kovtun, Y. P., & Ishchenko, A. A. (2008). Substituted xanthylocyanines, Part IV: Trinuclear dyes with a pyronine nucleus. *Dyes and Pigments*, 77(2), 369–373. doi:10.1016/j.dyepig.2007.06.007.
127. Li, Z., Zhao, P., Tofighi, S., Sharma, R., Ensley, T. R., Jang, S.-H., ... Jen, A. K.-Y. (2016). Zwitterionic Cyanine–Cyanine Salt: Structure and Optical Properties. *The Journal of Physical Chemistry C*, 120(28), 15378–15384. doi:10.1021/acs.jpcc.6b03037.
128. Demchuk, M. I., Ishchenko, A. A., Krasnaya, Z. A., & Mikhailov, V. P. (1990). The excited-state relaxation times of cationic-anionic polymethine dyes. *Chemical Physics Letters*, 167(1-2), 170–174. doi:10.1016/0009-2614(90)85090-y.
129. Zhang, X.; Wang, Z.; Hou, Y.; Yan, Y.; Zhao, J.; Dick, B. (2021). Recent Development of Heavy-Atom-Free Triplet Photosensitizers: Molecular Structure Design, Photophysics and Application. *Journal of Materials Chemistry*, 9, 11944–11973. <https://doi.org/10.1039/D1TC02535J>.
130. Sun, J., Feng, E., Shao, Y., Lv, F., Wu, Y., Tian, J., Sun, H., & Song, F. (2022). A Selenium-Substituted Heptamethine Cyanine Photosensitizer for Near-Infrared Photodynamic Therapy. *Chembiochem: a European journal of chemical biology*, 23(22), e202200421. <https://doi.org/10.1002/cbic.202200421>.

131. Lima, E., Barroso, A. G., Sousa, M. A., Ferreira, O., Boto, R. E., Fernandes, J. R., Almeida, P., Silvestre, S. M., Santos, A. O., & Reis, L. V. (2022). Picolyamine-functionalized benz[e]indole squaraine dyes: Synthetic approach, characterization and in vitro efficacy as potential anticancer phototherapeutic agents. *European journal of medicinal chemistry*, 229, 114071. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.114071>.
132. Peceli D., Hu H., Fishman D. et al. (2013). Enhanced Intersystem Crossing Rate in Polymethine-Like Molecules: Sulfur-Containing Squaraines versus Oxygen-Containing Analogues. *The Journal of Physical Chemistry A*, 117(11), 2333–2346. doi:10.1021/jp400276g.
133. Mahalingam, S. M., Ordaz, J. D., & Low, P. S. (2018). Targeting of a Photosensitizer to the Mitochondrion Enhances the Potency of Photodynamic Therapy. *ACS Omega*, 3(6), 6066–6074. doi:10.1021/acsomega.8b00692.
134. Kessel, D., & Reiners, J. J. (2015). Promotion of Proapoptotic Signals by Lysosomal Photodamage. *Photochemistry and Photobiology*, 91(4), 931–936. doi:10.1111/php.12456.
135. Zhao, X., Yang, Y., Yu, Y., Guo, S., Wang, W., & Zhu, S. (2019). A cyanine-derivative photosensitizer with enhanced photostability for mitochondria-targeted photodynamic therapy. *Chemical Communications*, 55, 13542 – 13545. doi:10.1039/c9cc06157f
136. Noh, I., Lee, D., Kim, H., Jeong, C.-U., Lee, Y., Ahn, J.-O., ... Kim, Y.-C. (2017). Enhanced Photodynamic Cancer Treatment by Mitochondria-Targeting and Brominated Near-Infrared Fluorophores. *Advanced Science*, 5(3), 1700481. doi:10.1002/advs.201700481.
137. Zhang L., Li H.-M., Chen J.-L. (2022). Multifunctional Probes with High Utilization Rates: Self-Assembled Merocyanine Nanoparticles in Water as Acid–Base Indicators and Mitochondrion-Targeting Chemotherapeutic Agents. *Journal of Physical Chemistry*, 13(4), 1090 - 1098. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.1c04092>.
138. Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2005). Mechanisms in photodynamic therapy: Part three—Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution,

- tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(2), 91–106. doi:10.1016/s1572-1000(05)00060-8
139. Kessel, D., Thompson, P., Saatio, K., & Nantwi, K. D. (1987). Tumor localization and photosensitization by sulfonated derivatives of tetraphenylporphine. *Photochemistry and photobiology*, 45(6), 787–790. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1987.tb07883.x>.
140. Choudhury, R., Sharma, A. K., Paudel, P., Wilson, P., & Pereira, A. B. (2022). In situ generation of a Zwitterionic fluorescent probe for detection of human serum albumin protein. *Analytical Biochemistry*, 646, 114630. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114630>
141. Choudhury, R., Rajeshbhai Patel, S., & Ghosh, A. (2019). Selective detection of human serum albumin by near infrared emissive fluorophores: Insights into structure-property relationship. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 376, 100-107. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2019.02.038>
142. Gomes, V. S., Gonçalves, H. M., Boto, R. E., Almeida, P., & Reis, L. V. (2020). Barbiturate squaraine dyes as fluorescent probes for serum albumins detection. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 400, 112710. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.112710>.
143. Gao, F.-P., Lin, Y.-X., Li, L.-L., Liu, Y., Mayerhöffer, U., Spenst, P., ... Wang, H. (2014). Supramolecular adducts of squaraine and protein for noninvasive tumor imaging and photothermal therapy in vivo. *Biomaterials*, 35(3), 1004–1014.
144. Zhang, D., Zhao, Y. X., Qiao, Z. Y., Mayerhöffer, U., Spenst, P., Li, X. J., Würthner, F., & Wang, H. (2014). Nano-confined squaraine dye assemblies: new photoacoustic and near-infrared fluorescence dual-modular imaging probes in vivo. *Bioconjugate chemistry*, 25(11), 2021–2029. <https://doi.org/10.1021/bc5003983>.
145. Silva, E., Santos, E.D., Gonçalves, C.S., Cardoso, M.A., Soares, CP. (2016). Beltrame J M. Zinc phthalocyanine-conjugated with bovine serum albumin mediated photodynamic therapy of human larynx carcinoma. *Laser Physics*, 26(10), 105601. doi:10.1088/1054-660X/26/10/105601.

146. Fadel, M., Samy, N., Nasr, M., & Alyoussef, A. A. (2016). Topical colloidal indocyanine green-mediated photodynamic therapy for treatment of basal cell carcinoma. *Pharmaceutical Development and Technology*, 22(4), 545–550. doi: 10.3109/10837450.2016.1146294/
147. Tan, X., Luo, S., Long, L., et al. (2017). Structure-guided design and synthesis of a mitochondria-targeting near-infrared fluorophore with multimodal therapeutic activities. *Advanced Materials*, 29, 1704196. doi: 10.1002/adma.201704196.
148. Marconi A, Mattioli EJ, Ingargiola F, Giugliano G, Marforio TD, Prodi L, Di Giosia M, Calvaresi M. Dissecting the Interactions between Chlorin e6 and Human Serum Albumin. *Molecules*. 2023; 28(5):2348. doi.org/10.3390/molecules28052348.
149. Matsuoka, T., Imai, H., Kohno, H., & Fukui, Y. (2006). Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. *The Journal of reproduction and development*, 52(5), 675–683. <https://doi.org/10.1262/jrd.18033>.
150. Alarcón, E., Edwards, A. M., Garcia, A. M., Muñoz, M., Aspée, A., Borsarelli, C. D., & Lissi, E. A. (2009). Photophysics and photochemistry of zinc phthalocyanine/bovine serum albumin adducts. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8(2), 255. doi:10.1039/b815726j.
151. Foley, M. S. C., Beeby, A., Parker, A. W., Bishop, S. M., & Phillips, D. (1997). Excited triplet state photophysics of the sulphonated aluminium phthalocyanines bound to human serum albumin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 38(1), 10–17. doi:10.1016/s1011-1344(96)07434-9.
152. Huang, J.-D., Lo, P.-C., Chen, Y.-M., Lai, J. C., Fong, W.-P., & Ng, D. K. P. (2006). Preparation and in vitro photodynamic activity of novel silicon(IV) phthalocyanines conjugated to serum albumins. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100(5-6), 946–951. doi:10.1016/j.jinorgbio.2005.12.004
153. Kessler, M. A., & Wolfbeis, O. S. (1992). Laser-induced fluorometric determination of albumin using longwave absorbing molecular probes. *Analytical Biochemistry*, 200(2), 254–259. doi:10.1016/0003-2697(92)90462-g.

154. Yu. Slominskii, I. Radchenko, A. Tolmachev, (1975) Ukraine. *Chemistry Journal*, 41, 760-764.
155. Liu, Y., Grimm, M., Dai, W. T., Hou, M. C., Xiao, Z. X., & Cao, Y. (2020). CB-Dock: a web server for cavity detection-guided protein-ligand blind docking. *Acta pharmacologica Sinica*, 41(1), 138–144. <https://doi.org/10.1038/s41401-019-0228-6>.
156. Cao, Y., & Li, L. (2014). Improved protein-ligand binding affinity prediction by using a curvature-dependent surface-area model. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(12), 1674–1680. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu104>.
157. Han, X., Xu, K., Taratula, O., & Farsad, K., (2019). Applications of nanoparticles in biomedical imaging. *Nanoscale*, 11(3), 799–819. <https://doi.org/10.1039/c8nr07769j>
158. O’Connell, M. J., Bachilo, S. M., Huffman, C. B., Moore, V. C., Strano, M. S., Haroz, E. H., Rialon, K. L., Boul, P. J., Noon, W. H., and Carter, K. (2002) Band gap fluorescence from individual single-walled carbon nanotubes. *Science* 297, 593– 596, DOI: 10.1126/science.1072631
159. Chen, G., Tian, F., Zhang, Y., Zhang, Y., Li, C., and Wang, Q. (2014) Tracking of transplanted human mesenchymal stem cells in living mice using near-infrared Ag2S quantum dots. *Advanced Functional Materials*. 24, 2481– 2488. doi:10.1002/adfm.201303263
160. Naczynski, D. J., Tan, M. C., Zevon, M., Wall, B., Kohl, J., Kulesa, A., ... Moghe, P. V. (2013). Rare-earth-doped biological composites as in vivo shortwave infrared reporters. *Nature Communications*, 4(1). doi:10.1038/ncomms3199.
161. Resch-Genger, U., Grabolle, M., Cavaliere-Jaricot, S., Nitschke, R., & Nann, T. (2008). Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature methods*, 5(9), 763–775. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1248>.
162. Hoye, A. T., Davoren, J. E., Wipf, P., Fink, M. P., & Kagan, V. E. (2008). Targeting Mitochondria. *Accounts of Chemical Research*, 41(1), 87–97. doi:10.1021/ar700135m.
163. Shi, G.-J., Gu, X.-H., Lv, H.-Y., Chen, R., Zhang, Q., Chen, S., ... Hu, Z.-Q. (2020). Hybrid coumarin-difluoroboron dyes for mitochondrial staining. *Dyes and Pigments*, 108430. doi:10.1016/j.dyepig.2020.108430

163. Reichardt, C., Welton, T., (2010) Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry: Fourth Edition, *Wiley-VCH*, Weinheim, Chapter 5, doi.org/10.1002/9783527632220.ch5.
164. Andrii V. Kulinich, Alexander A. Ishchenko. Design and Photonics of Merocyanine Dyes (Review). *The Chemical Record*. 2023. Vol.23. Issue 10.
165. Ishchenko, A. A., Kulinich, A. V., Bondarev, S. L., & Knyukshto, V. N. (2007). Photodynamics of Polyene–Polymethine Transformations and Spectral Fluorescent Properties of Merocyanine Dyes. *The Journal of Physical Chemistry A*, 111(51), 13629–13637. doi:10.1021/jp076016u.
166. Ishchenko, A. A., Kulinich, A. V., Bondarev, S. L., & Knyukshto, V. N. (2008) Electronic Structure and Fluorescent Properties of Malononitrile-Based Merocyanines with Positive and Negative Solvatochromism. - *Optics and Spectroscopy*, 104(1), 57–68 10.1007/s11449-008-1008-y.
167. Ishchenko, A. A., Kramarenko, F.G., Maydannic, A.G., Sereda, S.V., Vasilenko, N.P. (1991). Structure and association of carbocyanines of the benz[c,d]indole series in binary mixtures of solvents. *Journal of information recording materials*, 19(3), 207-219.
168. Савостьянова М.В. (1963). Взаимодействие красителей с высокомолекулярными веществами. *Успехи химии*. 32(10), 1233-1269.
169. Ishchenko, A. A. (1991). Structure and spectral-luminescent properties of polymethine dyes (Reviews). *Russian Chemical Reviews*. 60(8), 865-884. <https://doi.org/10.1070/rc1991v060n08abeh001116>
170. Uldry, M., Ibberson, M., Hosokawa, M., & Thorens, B. (2002). GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Letters*, 524(1-3), 199–203. doi:10.1016/s0014-5793(02)03058-2.
171. Macheda, M. L., Rogers, S., & Best, J. D. (2005). Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *Journal of cellular physiology*, 202(3), 654–662. <https://doi.org/10.1002/jcp.20166>.
172. Calvo, M. B., Figueroa, A., Pulido, E. G., Campelo, R. G., & Aparicio, L. A. (2010). Potential role of sugar transporters in cancer and their relationship with

- anticancer therapy. *International journal of endocrinology*, 2010, 205357.
<https://doi.org/10.1155/2010/205357>
173. Lima, E., & Reis, L. V. (2022). 'Lights, squaraines, action!' - the role of squaraine dyes in photodynamic therapy. *Future medicinal chemistry*, 14(19), 1375–1402.
<https://doi.org/10.4155/fmc-2022-0112>
174. Korotcov, A. V., Ye, Y., Chen, Y., Zhang, F., Huang, S., Lin, S., Sridhar, R., Achilefu, S., & Wang, P. C. (2012). Glucosamine-linked near-infrared fluorescent probes for imaging of solid tumor xenografts. *Molecular imaging and biology*, 14(4), 443–451. <https://doi.org/10.1007/s11307-011-0520-4>
175. Entradas, T., Waldron, S., & Volk, M. (2020). The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 204, 111787.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111787>.
176. Klosowski, E. M., Lima de Souza, B. T., Mito, M. S., Constantin, R. P., Mantovanelli, G. C., Mewes, J. M., ... Constantin, R. P. (2020). The photodynamic and direct actions of methylene blue on mitochondrial energy metabolism: A balance of the useful and harmful effects of this photosensitizer. *Free Radical Biology and Medicine*, 153, 34-53. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.
177. Ashwell, G. J., Jackson, P. D., Lochun, D., Thompson, P. A., Crossland, W. A., Bahra, G. S., ... Jasper, C. (1994). Second Harmonic Generation from Alternate-Layer LB Films: Quadratic Enhancement with Film Thickness. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 445(1924), 385–398.
doi:10.1098/rspa.1994.0067
178. Ishchenko A.A., Mushkalo I.L., Derevyanko N.A., Zakhidov U., Khidirova T.S. (1989). Nizamov N. Association of biscyanine dyes with rigidly connected chromophores in solvents of different polarity. *Journal of Information Recording Materials*. 17(1), 39-51.
179. Ibrayev N. K., Ishchenko A. A., Karamysheva R. K., Mushkalo, I. L. (2000). Influence of interaction of chromophores, linked by the unconjugated chain, on the

luminescence properties of biscyanine dyes. *Journal of Luminescence*, 90(3-4), 81–88. doi:10.1016/s0022-2313(99)00616-x.

180. Ishchenko, A., Syniugina A. “Structure and Photosensitizer Ability of Polymethine Dyes in Photodynamic Therapy: A Review”. *Theoretical and Experimental Chemistry*, 2023; 58(6):373 – 401, DOI 10.1007/s11237-023-09754-9.

181. Синюгіна А.Т., Іщенко О.О. «Вплив агрегації бензоіндоскваранів на генерацію синглетного Оксигену». Допов. Нац. акад. наук Укр. 2023. № 4. С. 60-67. doi.org/10.15407/dopovidi2023.04.060.

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ В ЯКИХ
ОПУБЛІКОВАНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Syniugina A.**, Chernii S., Losytskyu M., Syniugin A., Slominskii Y., Balanda A., Özkan G., Mokhir A., Kovalska V., Yarmoluk, S. “The synthesis and study of novel merocyanine probes for protein detection and cells visualization” *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 2021, 7, 100046; DOI:10.1016/j.jpap.2021.100046.
Особистий внесок здобувача – збір літературних даних, синтез, спектрально-флуоресцентні дослідження барвників.
2. **Syniugina A.**, Chernii S., Losytskyu M., Ozkan H.G., Slominskii Yu, Syniugin A., Pekhnyo V., Mokhir A., Yarmoluk S. “N-alkyl functionalized squaraine dyes as fluorescent probes for the detection of serum albumins”. *Biopolymers and Cell*, 2022; 38(2):103-116 (Open Access, Q4) DOI 10.7124/bc.000A75. *Особистий внесок здобувача – спектрально-люмінесцентні дослідження барвників та дослідження їх взаємодії із білками, написання та підготовка статті до друку.*
3. **Syniugina A.**, Malanchuk O., Chernii S., Bdzhola A., Horbatok K., Syniugin A., Yarmoluk S. “The squaraine derivatives as potential photosensitizers in photodynamic therapy of cancer”. *Biopolymers and Cell*, 2023; 39(1):3-13, DOI 10.7124/bc.000A81. *Особистий внесок здобувача – спектрально-флуоресцентні вимірювання, оцінка фотодинамічних властивостей барвників, проведення МТТ-аналізу, підготовка статті до друку.*
4. Ishchenko, A., **Syniugina A.** “Structure and Photosensitizer Ability of Polymethine Dyes in Photodynamic Therapy: A Review”. *Theoretical and Experimental Chemistry*, 2023; 58(6):373 – 401, DOI 10.1007/s11237-023-09754-9. *Особистий внесок здобувача – підбір та узагальнення літератури.*
5. **Синюгіна А.Т.**, Іщенко О.О. «Вплив агрегації бензоіндоскваранів на генерацію синглетного Оксигену». *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2023. № 4. С. 60-

67. doi.org/10.15407/dopovidi2023.04.060. *Проведення експериментальної частини.*

6. Syniugina A., Chernii S., Slominskiy Yu., Yarmoluk S. /The study of N-alkyl functionalized indolenine based squaraines as fluorescent probes for proteins detection // Всеукраїнська наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених з міжнародною участю „Хімічні проблеми сьогодення”, Збірник тез, 25-27.05.2020, Вінниця, Україна. - Р. 42

7. Syniugina A., Chernii S., Synugin A., Balanda A., Kovalska V., Yarmoluk S. /The study of novel functionalized merocyanine dyes for albumins detection // XIV IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists, 27-28.05.2020, Kyiv, Ukraine. – P. 21.

8. Syniugina A.T, Chernii S.V., Syniugin A.R., Losytskyy M.Yu., Slominskii Yu.L., Mokhir A.A., Kovalska V.B., Yarmoluk S.M. /Merocyanines as fluorescent probes for the detection in microscopy // IV International scientific conference for students and young scientists, 23-25.03.2021, Vinnytsia, Ukraine.

9. Chernii S.V., Syniugina A.T., Slominskii Yu.L., Özkan H.G., Mokhir A.A., Kovalska V.B., Yarmoluk S.M. /Squaraine dyes as fluorescent probes for microscopy and the detection of proteins // XVII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 19–21 квітня 2021).

10. Syniugina A., Cherniy S., Malanchuk O., Suniugin A., Yarmoluk S. /D-glucosamide-containing derivatives of organic dyes as fluorescence probes for cell imaging // All-Ukrainian conference on molecular and cell biology with international participation, 15 -17.06.2022, p.103. Kyiv, Ukraine.