

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ НОВОСИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ.  
Н.Н. ВОРОЖЦОВА СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК**

На правах рукописи



Панфилов Михаил Андреевич

**Синтез флуоресцентных индикаторов и фотоактивируемых доноров  
оксида азота (II)**

1.4.3 Органическая химия

**Диссертация**

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:

к.х.н., с.н.с. Воробьев Алексей Юрьевич

Новосибирск - 2023

## Оглавление

Список сокращений .....	4
Введение .....	6
Глава 1. Литературный обзор .....	14
1.1 Фотоактивируемые доноры оксида азота (II) .....	14
1.1.1 Фотоактивируемые доноры NO, на основе N-нитрозо соединений .....	15
1.1.2 о-Замещенные нитроарены .....	24
1.1.3 «Упакованные» NONO-аты («Caged» NONO-аты) .....	30
1.2 NO-чувствительные флуоресцентные зонды .....	33
1.2.1 Классические методы детектирования NO.....	33
1.2.2 Флуоресцентный метод анализа NO .....	36
1.2.2.1 о-Диаминоароматические соединения.....	38
1.2.2.2 Флуоресцентные зонды на основе дигидропиридина.....	51
1.2.2.3 Другие флуоресцентные зонды .....	57
Вывод по обзору литературы.....	63
Глава 2. Получение производных 9-акридона, содержащих о-диаминовый фрагмент, в качестве потенциальных NO-чувствительных флуоресцентных зондов (обсуждение результатов) .....	64
2.1 Синтез 7,8-диамино-4-карбокси-10-метил-9(10H)акридона .....	65
2.2 Синтез 1,2-диамино-10-(карбоксиметил)-9(10H)-акридона.....	67
2.3 Спектральные характеристики и определение NO .....	69
2.4 Визуализация NO в клетках Jurkat.....	69
Глава 3. Получение производных BODIPY и aza-BODIPY, содержащих стерически напряженный нитро-ароматический фрагмент и N-нитрозо фрагмент в качестве потенциальных фотоактивируемых доноров оксида азота (II) (обсуждение результатов).....	73
3.1 Получение мезо-замещенных производных BODIPY .....	75
3.2 Исследование фотохимических свойств BODIPY с пространственно затрудненными нитрогруппами.....	77
3.3 Получение соединений BODIPY с N-нитрозо фрагментом и исследование их фотохимических свойств.....	85
3.4 Применение к исследованию активации тромбоцитов.....	94
3.5 Синтез производных aza-BODIPY, содержащих N-нитрозо фрагмент .....	97
3.6 Фотохимические исследования aza-BODIPY 157 .....	104
Выводы.....	110

<b>Глава 4. Экспериментальная часть.....</b>	<b>112</b>
<b>Список использованной литературы.....</b>	<b>137</b>
<b>Приложения.....</b>	<b>155</b>

## Список сокращений

- Ac** (Acyl) – Ацил
- Boc** (*tert*-butyloxycarbonyl) – *Трет*-бутоксикарбонильная группа
- Aza-BODIPY** (aza-Dipyrrrometheneboron difluoride) – Аза-дипиррометенбора дифторид
- BODIPY** (Dipyrrrometheneboron difluoride) – Дипиррометенбора дифторид
- DCM** (Dichloromethane) – Дихлорметан
- DDQ** (2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone) – 2,3-дихлор-5,6-дициано-п-бензохинон
- DIPEA** (*N,N*-Diisopropylethylamine) - *N,N*-Диизопропилэтиламин
- DMF, ДМФА** (*N,N*-Dimethylformamide) - *N,N*-Диметилформамид
- DMSO, ДМСО** (Dimethyl sulfoxide) – Диметилсульфоксид
- Et** (Ethyl) – Этил
- GTN** (Glyceryl trinitrate) – Нитроглицерин
- Hex** (Hexane) – Гексан
- HRMS** (High resolution mass spectroscopy) – Масс-спектрометрия высокого разрешения
- Me** (Methyl) – Метил
- NIS** (N-Iodosuccinimide) – *N*-иодсукцинимид
- NIR** (Near-infrared) – Ближний инфракрасный
- NO** (Nitric oxide) – Оксид азота
- PET** (Photoinduced electron transfer) – Фотоиндуцируемый перенос электрона
- PETN** (Pentaerythritol tetranitrate) – Пентаэритриттетранитрат
- Ph** (phenyl) – Фенил
- photoNOD** (Photoactivatable nitric oxide donor) – Фотоактивируемый донор оксида азота
- photoNORM** (Photoactivatable nitric oxide releasing material) – Фотоактивируемый материал, высвобождающий оксида азота
- SNAP** (*S*-Nitroso-*N*-acetylpenicillamine) – *S*-Нитрозо-*N*-ацетилпеницилламин
- TBDMS** (*tert*-Butyldimethylsilyl) – *Трет*-Бутилдиметилсилил
- TFA** (Trifluoroacetic acid) – Трифторуксусная кислота
- THF, ТГФ** (Tetrahydrofuran) – Тетрагидрофуран
- TMS** (Trimethylsilyl) – Триметилсилил
- QY** (Quantum yield) – Квантовый выход
- UV-vis** (Ultraviolet–visible spectroscopy) – Оптическая спектроскопия
- АФК** – Активные формы кислорода
- ВЭЖХ** – Высокоэффективная жидкостная хроматография

**УФ** – Ультрафиолетовый

**ЯМР** – ядерный магнитный резонанс

## Введение

**Актуальность темы.** Оксид азота (NO) играет важную роль в различных системах человеческого организма в качестве сигнальной молекулы: в иммунной, нервной и сосудистой системах [1–8]. Исследования показали, что нарушение регуляции NO связано с различными заболеваниями, включая болезни сердца, гипертонию, инсульт и нейродегенерацию [9]. Также известно, что неконтролируемая секреция NO вызывает выработку активных форм кислорода/азота, которые вызывают большое количество патологий, таких как развитие раковых опухолей, ишемия, септический шок, воспаление и нейродегенерация [10]. Хотя NO является относительно стабильным свободным радикалом, он легко и быстро реагирует со свободными радикалами и металлсодержащими белками в биологических системах, оказывая физиологические или патофизиологические эффекты. В связи с этим, для более глубокого понимания биологической роли оксида азота необходимы инструменты, которые бы могли помочь отслеживать его секрецию в режиме реального времени *in situ* как *in vitro*, так и *in vivo*.

Флуоресцентная микроскопия с использованием NO-чувствительных флуоресцентных зондов является крайне привлекательным методом анализа, поскольку отличается высокой чувствительностью, высокой скоростью ответа, а также хорошим пространственным разрешением [11]. Для дизайна NO-чувствительных флуоресцентных зондов используются следующие подходы: использование *o*-диаминарароматических фрагментов в аэробных условиях, превращение эфиров Ганча в соответствующие пиридины, реакция *N*-нитрозинов аминов с получением диазоциклических соединений, прямое *N*-нитрозирование и др. [12] Среди них, самым популярным является подход с использованием остова *o*-фенилендиамина. Несмотря достигнутый прогресс в области флуоресцентных NO-чувствительных зондов, их ограничения по-прежнему зачастую является их подверженность окислению, возможное взаимодействие с различными соединениями, присутствующими в клетках

(глутатион, аскорбиновая кислота), «утекание» из клеток, а также растворимость, в связи с чем поиск новых зондов, основанных на различных красителях, по-прежнему является актуальной задачей.

Для исследования влияния NO удобно использовать вещества, которые могут высвободить NO в контролируемых количествах. Для этой цели перспективным выглядит использование веществ, которые высвобождают оксид азота (II) под действием света. Преимуществами использования таких соединений являются возможность с их помощью создавать локальные концентрации NO, а с помощью химических модификаций можно улучшать средства их доставки. В настоящее время для синтеза фотоактивируемых доноров оксида азота (II) используются различные подходы, например, получение нитрозильных и нитрито-комплексов переходных металлов, *N*-нитрозо соединений, «упакованных»-NONO-атов и соединений, содержащих в своем остове стерически напряженную нитрогруппу. Также на основе вышеперечисленных подходов в настоящее время разрабатываются различные материалы, способные выделять NO под внешним воздействием.

**Степень разработанности темы.** В настоящее время представлен широкий ряд различных NO-чувствительных флуоресцентных зондов, работа которых основана на различных принципах (см. глава 1, п. 1). В свою очередь, представлен лишь единичный пример на основе акридина в сочетании с *o*-фенилендиаминовым фрагментом, на основе же 9-акридона такие примеры отсутствуют.

Ряд фотоактивируемых доноров NO так же представлен набором различных соединений на основе различных красителей. Однако, практически во всех случаях, синтез подобных соединений включает в себя большое количество стадий, в частности реакции кросс-сочетания.

**Цель работы.** Целями данной работы является синтез новых NO-чувствительных флуоресцентных зондов на основе 9-акридона, а также разработка новых соединений, являющихся фотоактивируемыми донорами оксида азота (II) на основе остовов BODIPY и aza-BODIPY и исследование их свойств.

### Основные задачи данного исследования:

1. Разработка подходов к синтезу производных 1,2-диамино-9(*H*)-акридона и исследование их способности улавливать NO.
2. Синтез соединений, содержащих остов BODIPY и пространственно напряженный нитроароматический фрагмент в *мезо*-положении путем реакции конденсации ароматических альдегидов, содержащих стерически напряженные нитрогруппы, с пирролами, с дальнейшим превращением в целевые BODIPY-соединения;
3. Синтез соединений, содержащих остов BODIPY и *N*-нитрозо фрагмент, путем взаимодействия 10-(хлорметил)-5,5-дифтор-1,3,7,9-тетраметил-5*H*-4λ<sup>4</sup>,5λ<sup>4</sup>-дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,2]диазаборинина с первичными аминами и дальнейшим нитрозированием;
4. Синтез соединений, содержащих остов aza-BODIPY и *N*-нитрозо фрагмент путем превращения халконов в aza-BODIPY производные и последующей реакцией нитроирования;
5. Исследование фотофизических свойств и способности полученных соединений выделять NO при фотолизе.

### Научная новизна.

Были синтезированы и исследованы фотофизические свойства 1,2-диамино-10-(карбоксиметил)-9(10*H*)-акридона и 7,8-диамино-4-карбоксо-10-метил-9(10*H*)акридона – производных 9-акридона, содержащие NO-чувствительные фрагменты. Было показано, что 7,8-диамино-4-карбоксо-10-метил-9(10*H*)акридон способен успешно взаимодействовать с оксидом азота (II) *in vitro* в клеточной культуре Jurkat с образованием флуоресцирующего продукта.

Были впервые получены производные BODIPY, в остов которых напрямую через *мезо*-положение были введены арильные заместители, содержащие стерически напряженную нитрогруппу. Для полученных соединений BODIPY, был показан эффект агрегационно-индуцируемой эмиссии при различных соотношениях растворителей (вода:этанол).

Были разработаны методы получения N-нитрозо соединений на основе остова BODIPY, позволяющие получать различные производные всего лишь в несколько стадий из общего стартового вещества. Наиболее эффективным фотоактивируемым донором NO оказался N-((5,5-дифтор-1,3,7,9-тетраметил-5H-4λ<sup>4</sup>,5λ<sup>4</sup>-дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,2]дизаборинин-10-ил)метил)-N-фениламид азота, для которого квантовый выход высвобождения составляет  $QY_{NO} = 5.5 \times 10^{-4}$ , что сопоставимо с  $QY_{NO}$  для ранее описанных в литературе доноров. Было показано, что данное соединение способно эффективно ингибировать активацию тромбоцитов *in vitro* при облучении светом. Также было установлено, алкилирование по атому бора и введение атомов йода в ядро хромофора уменьшает эффективность выделения NO, но влияет на способность к генерации синглетного кислорода.

Был осуществлен ряд превращений, который позволил получить фотоактивируемый донор на основе aza-BODIPY, содержащий в своем остове два N-нитрозо фрагмента, способный выделять NO под воздействием ближнего инфракрасного света в зависимости от интенсивности используемого излучения. Также на основе полученного вещества была реализована система с обратной связью, позволяющая активно поддерживать заданную концентрацию оксида азота в образце, управляя интенсивностью лазерного излучения.

#### **Теоретическая и практическая значимость.**

Разработанные подходы к модификациям остова 9-акридона позволили получить новый пример NO-чувствительного флуоресцентного зонда, работающего в диапазоне современных флуоресцентных микроскопов. Также полученные производные 9-акридона могут представлять интерес в качестве стартовых соединений для получения различных новых гетероциклов.

Установленные закономерности влияния заместителей в красителях BODIPY, содержащих N-нитрозо фрагменты, позволят более точно настраивать свойства желаемых фотоактивируемых доноров как с точки зрения эффективности

выделения NO, так и с точки зрения комбинационного действия NO и синглетного кислорода.

Полученный фотоактивируемый донор на основе aza-BODIPY эффективно выделял NO при облучении ближним инфракрасным светом. Особенностью полученного донора является возможно обратного захвата оксида азота (II), что открывает возможности использования такого донора в качестве буферной системы при проведении биологических исследований. Также на основе полученного донора была разработана установка с системой обратной связи, позволяющая поддерживать постоянную заданную концентрацию NO в растворе *in vitro*.

**Методология и методы исследования.** В ходе выполнения работы использовались как классические, так и современные методы органического синтеза, основанные на реакциях конденсации, ароматического электрофильного замещения, аминирования и других классических реакциях органической химии. Выделение и очистка соединений осуществлялись методами экстракции, осаждения, хроматографии и кристаллизации. В работе использовались физико-химические методы установления структуры и чистоты химических соединений: ЯМР и масс-спектрометрия высокого разрешения.

**Положения, выносимые на защиту:**

- Синтез 1,2-диамино-10-(карбоксиметил)-9(10H)-акридоны и 7,8-диамино-4-карбоксо-10-метил-9(10H)акридоны;
- Оценка способности полученных акридонов взаимодействовать с NO с образованием флуоресцирующих продуктов;
- Синтез новых производных BODIPY путем конденсации 3,5-диметил-4-нитробензальдегида и 4-нитро-3-(трифторметил)бензальдегида с пирролом и 2,4-диметилпирролом;
- Исследование фотохимических свойств полученных BODIPY, содержащих стерически напряженную нитро-группу;

- Синтез *N*-нитрозо производных BODIPY путем нитрозирования вторичных аминов, получаемых аминированием тетраметил-*мезо*-CH<sub>2</sub>Cl-BODIPY;
- Исследование способности полученных *N*-нитрозо BODIPY выделять NO и генерировать синглетный кислород при фотолизе;
- Синтез 5,5-дифтор-3,7-бис(4-(метил(нитрозо)амино)фенил)-1,9-дифенил-5H-дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,5,2]триазаборинин-4-иум-5-уида;
- Исследование фотовысвобождения NO из полученного *N*-нитрозо aza-BODIPY.

**Степень достоверности** обеспечена тщательностью проведения эксперимента и применением современных физико-химических методов исследования структур. Строение всех впервые полученных веществ доказано методами <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>19</sup>F ЯМР, и масс-спектрометрии высокого разрешения. Достоверность результатов подтверждается независимой экспертизой опубликованных материалов в рецензируемых научных изданиях и апробацией на российских и международных конференциях.

### **Структура диссертации**

Работа изложена на 164 страницах машинописного текста, содержит 83 схемы, 38 рисунков и 5 таблиц. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы (192 литературных источника) и 10 приложений (стр. 155-164).

**Апробация работы.** Работа выполнялась в рамках выполнения госзадания № 1021052605821-9-1.4.1 «Фотокатализируемые и фотоактивируемые превращения органических веществ (новая лаборатория)», а также в рамках выполнения гранта РФФИ № 18-15-00049 «Динамическое исследование активации тромбоцитов и лейкоцитов человека с целью выявления клеточных механизмов патогенеза

микрососудистых осложнений сахарного диабета и создания новых неинвазивных методов их терапии».

Результаты работы докладывались на следующих конференциях: Всероссийский конгресс по химии гетероциклических соединений «КОСТ-2021» (Сочи, 2021), Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022).

По теме диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, и 2 сообщения в виде тезисов докладов.

**Личный вклад** соискателя состоит в поиске, анализе и обобщении научной литературы по теме диссертации. Автор принимал непосредственное участие в планировании и проведении всех химических экспериментов, обработке экспериментальных данных, анализе и интерпретации полученных результатов, подготовке научных статей и тезисов к публикации.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую признательность научному руководителю к.х.н. Воробьеву Алексею Юрьевичу за постановку интересных и нетривиальных задач, помощь в написании диссертации, чуткое руководство, а также за переданные знания, опыт и безграничное терпение.

Автор выражает благодарность своему первому научному руководителю к.х.н. Халфиной Ирине Александровне за обучение экспериментальным навыкам, работе, поиску и систематизации научной информации.

Автор также выражает благодарности сотрудникам Лаборатории Фотоактивируемых Превращений НИОХ СО РАН за создание веселой и комфортной рабочей атмосферы. Отдельное спасибо автор выражает Филиппову Игорю Романовичу за поддержку, ценные советы и дружеское участие.

Отдельные благодарности автор выражает Лаборатории оптики и динамики биологических систем НГУ, в частности ее руководителю – Москаленскому Александру Ефимовичу и Карогодиной Татьяне Юрьевне за плодотворное сотрудничество и помощь в исследовании свойств полученных соединений.

Автор благодарит всех сотрудников Центра спектральных исследований НИОХ СО РАН, в особенности сотрудников группы ЯМР, Скорову Анну Борисовну и Кандаурову Веру Васильевну, за регистрацию ЯМР-спектров, Стаценко Ольгу Борисовну за запись масс-спектров, а также сотрудников Лаборатории микроанализа под руководством Тиховой Веры Дмитриевны, за выполнение элементного анализа и определение температуры плавления соединений.

Огромное спасибо моей любимой жене, которая ни на секунду не сомневалась во мне и всегда поддерживала меня. Также спасибо моей семье: маме, папе, бабушкам и дедушке за любовь, заботу и веру в мой успех.

## Глава 1. Литературный обзор

### 1.1 Фотоактивируемые доноры оксида азота (II)

Классическими низкомолекулярными донорами оксида азота (II) являются органические нитраты (GTN **1**, PETN **2**, никорандил **3** и др.) и нитриты (амилнитрит, изоамил нитрит, *трет*-бутилнитрит и др.), нитрозотиолы (SNAP **4**, S-нитрозоглутатион **5** и др.), NONO-аты (Диэтиламин NONOate **6** и др.), различные металлокомплексы (нитропруссид натрия), а так также N-нитрозо соединения (2,5-дефостатин **7** и др.).

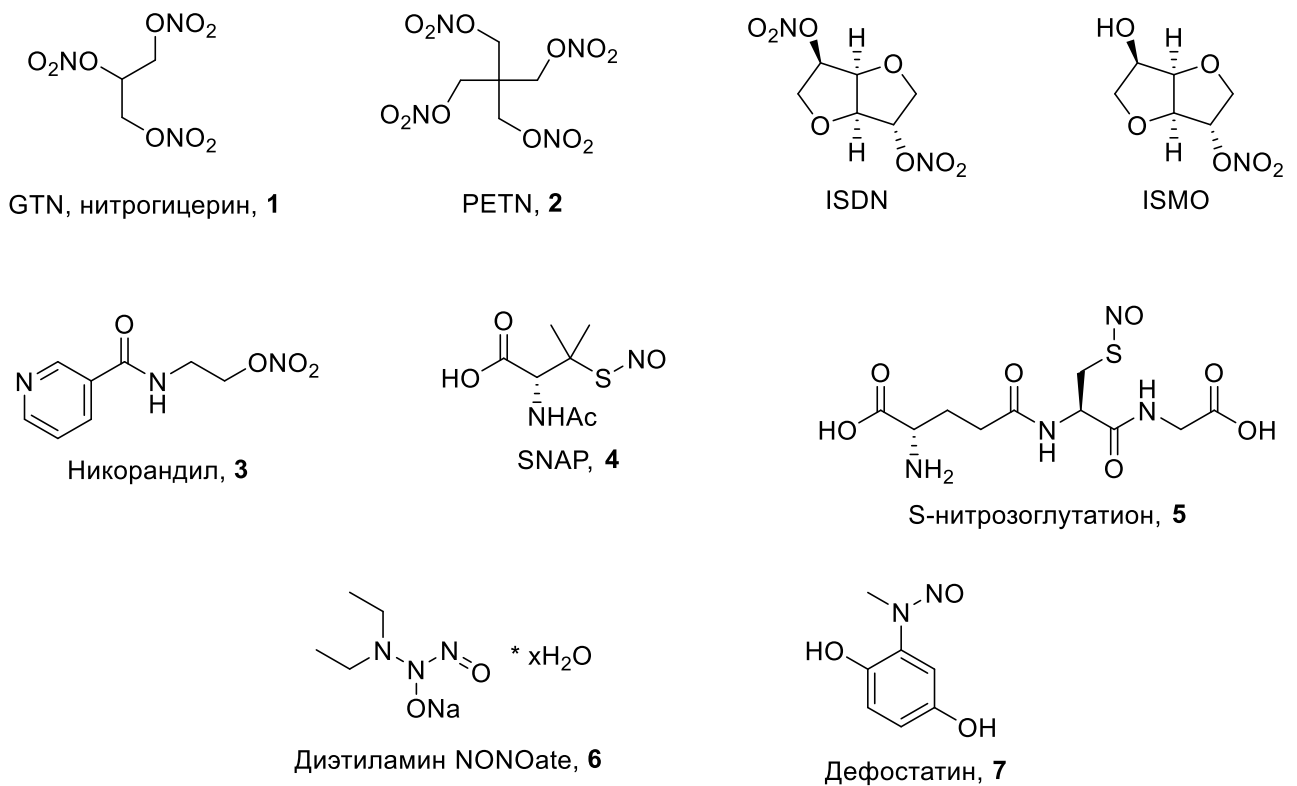


Рисунок 1. Некоторые примеры низкомолекулярных доноров NO

Несмотря на то, что подобные вещества уже давно известны, коммерчески доступны и широко применяются как в терапевтических целях, так и в различных биологических исследованиях, их использование осложняется невозможностью контролировать высвобождение NO и таргетно доставлять препарат. В связи с этим, в последнее десятилетие наблюдается повышенный интерес к разработке доноров NO, способных его выделять при определенном воздействии, в частности под воздействием света. В следующих разделах обзора будут рассмотрены лишь

доноры, основанные на неметаллосодержащих малых молекулах, в связи с чем для ознакомления с металлосодержащими донорами NO читателю рекомендуются следующие работы [13–20], а для ознакомления с NO выделяющими полимерными и нанокомпозитными материалами - следующие [15; 16; 21–23]. Также для некоторых примеров фотоактивируемых доноров NO будут приведены схемы синтеза, чтобы продемонстрировать нетривиальность получения таких соединений.

### **1.1.1 Фотоактивируемые доноры NO, на основе N-нитрозо соединений**

N-нитрозо амины являются распространенными донорами NO, поскольку они легко получаются путем нитрозирования вторичных аминов с помощью различных реагентов ( $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{NOBF}_4$ ,  $\text{NOCl}$ ,  $\text{tBuONO}$  и др.) [24]. Связь N-NO обычно очень слабая ( $\sim 39$  ккал/моль); ее энергия сравнима с энергией фотона с длиной волны  $\sim 730$  нм [25]. Однако N-NO фрагмент имеет очень слабое поглощение в видимой/ближней ИК части спектра и поэтому зачастую сочетается с подходящим сенсibilизатором. При фотовысвобождении NO N-нитрозамины образуют аминильные радикалы, которые могут отрывать атомы водорода от других молекул или подвергаться восстановлению, или окислению [26; 27]. Они также могут транснаитрозировать нуклеофилы, такие как тиолы [28] (Схема 1).

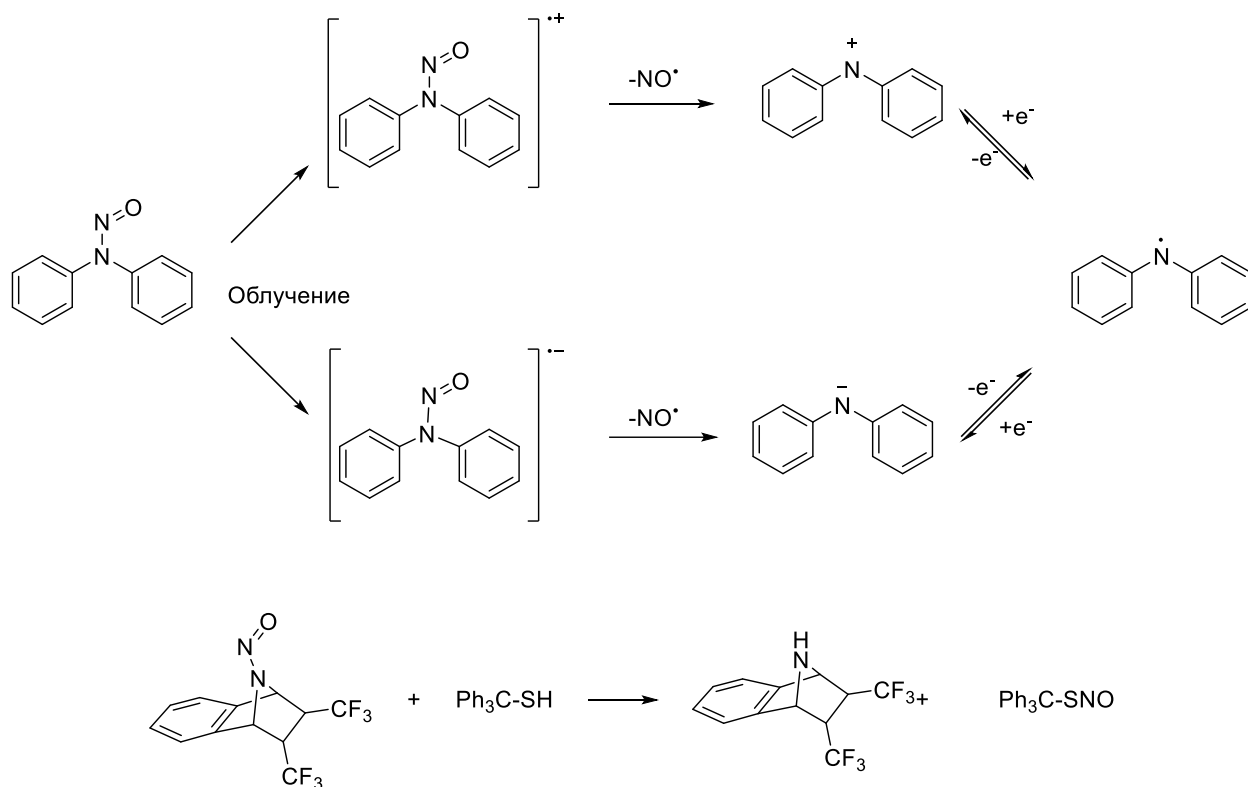


Схема 1. Окисление и восстановление *N*-нитрозаминов и транснаитрозирование тиолов

Фухимори (Fujimori) и его коллеги [29] разработали фотоактивируемые доноры NO первого поколения на основе *N*-алкил-*N*-нитрозо-фенилендиамина, BNN (8,9). При облучении производных BNN в районе полосы поглощения УФ-светом (280-400 нм) выделяется NO посредством гомолитического расщепления связи N-N *N*-нитрозофрагмента с образованием оксида азота (II) и промежуточного радикального соединения **10** (Схема 2). Этот промежуточный продукт затем высвобождает еще одну молекулу NO и, наконец, превращается в стабильную хинондииминную форму. Данная реакция высвобождения NO происходит только при фотооблучении, тем самым обеспечивая контроль за выделением NO. Это свойство чрезвычайно полезно для точного контроля образования NO и исследования его сигнальных свойств, однако мало подходит для биологических исследований, поскольку УФ-свет вызывает различные изменения в биологических системах [30].

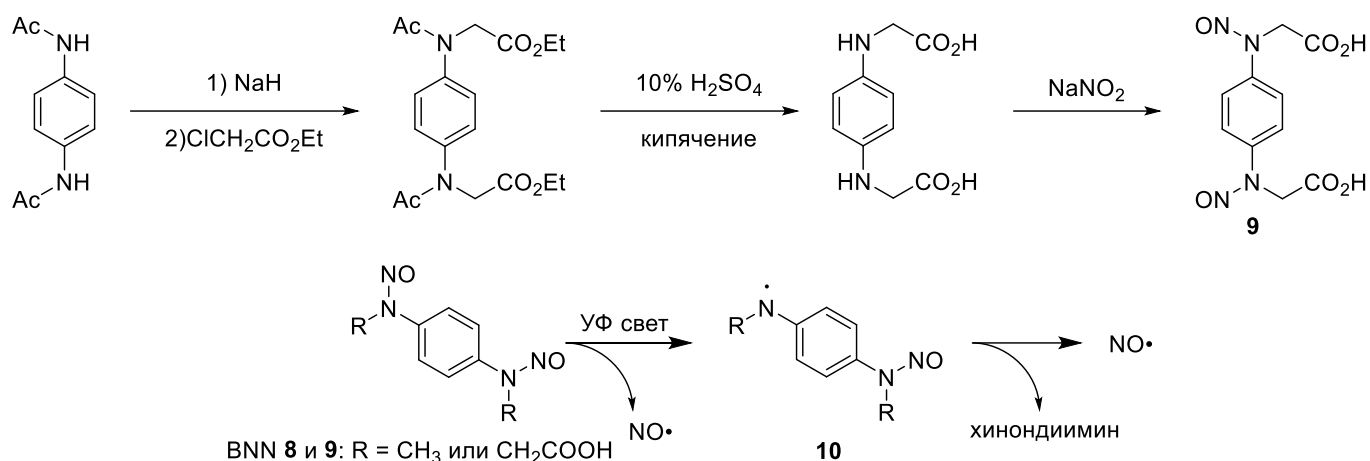


Схема 2. Облучение соединений BNN УФ светом

Для того, чтобы избежать использования жесткого УФ-света, зачастую используется подход с введением N-нитрозо фрагмента в сочетании с различными хромофорами, красителями. Так, в своей работе [31] Накагава (Nakagawa) и коллеги использовали реакции с фотоиндуцируемым переносом электрона (PET). В качестве красителей они использовали остов BODIPY (NOBL-1, **11**). Целевое соединение было получено путем конденсации 2,4-диметил-3-цианопиррола и 4-формил-N-метокси-N-метилбензамида, с последующим окислением DDQ и реакцией с  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  в присутствии триэтиламина. Дальнейшее восстановление полученного амида Вайнреба с помощью реагента Шварца до соответствующего альдегида, который затем конденсировали с *tert*-бутил 3-(5-амино-2-гидроксифенил)пропаноатом. Полученный имин *in situ* восстанавливали до вторичного амина, который после гидролиза вводился в реакцию нитрозирования с получением целевого соединения NOBL-1 (**11**). Для полученного соединения было показано, что NO выделяется при облучении светом с диапазоном длин волн 480-500 нм и при облучении лазерным диодом с длиной волны 488 нм (Схема 3).



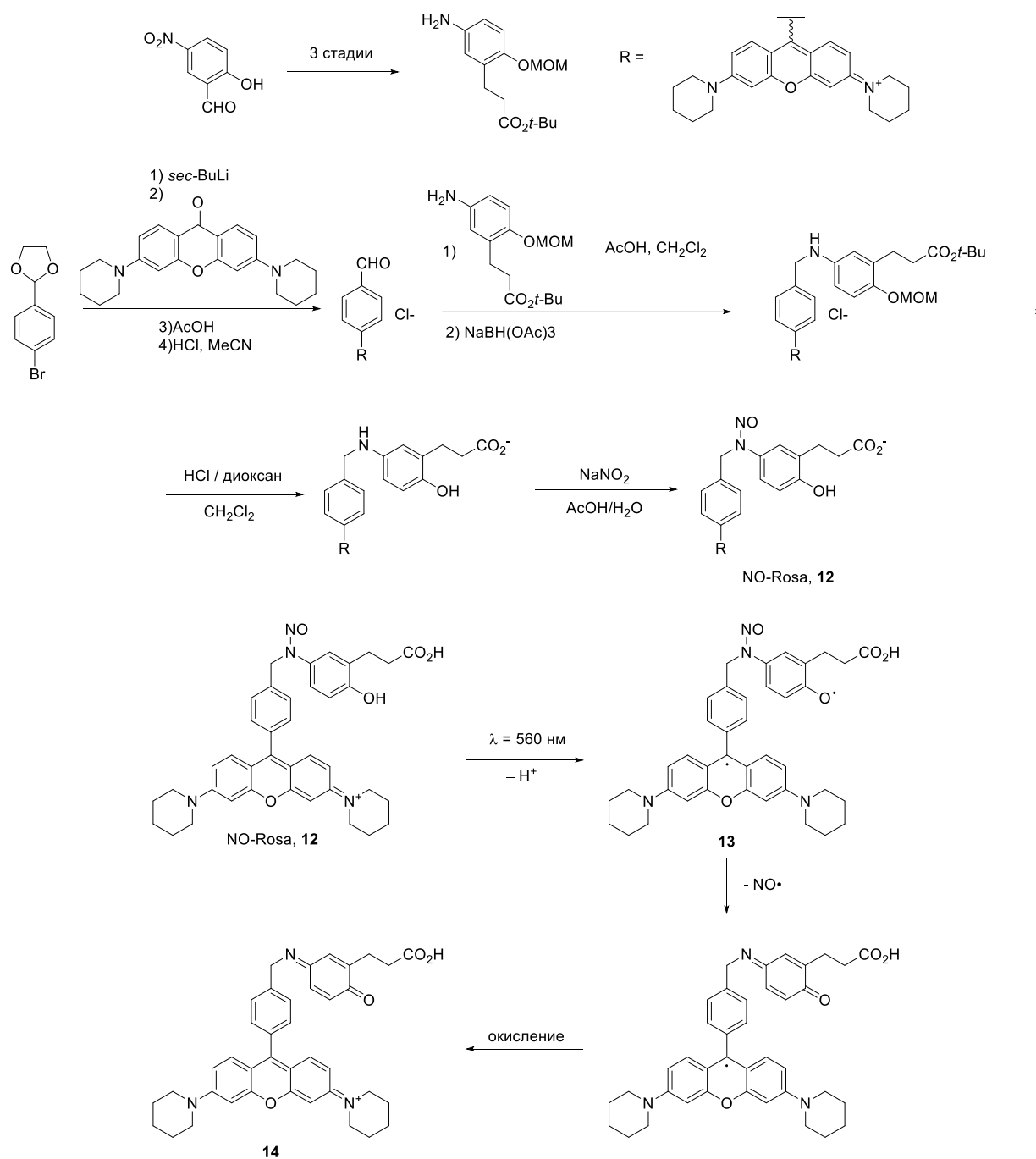


Схема 4. Схема синтеза NO-Rosa и механизм фотохимического выделения NO

Такой подход получил развитие в дальнейшей работе группы Накагава (Nakagawa) [33]. Фотодоноры **15** и **16** были получены путем, аналогичным NO-Rosa (**12**) из 2-(4-бром-3-метилфенил)-1,3-диоксолана или 2-(2-бромфенил)-1,3-диоксолана. Было обнаружено, что на эффективность высвобождения NO влияет расстояние между N-нитрозаминофенольной группой и остовом розамина. Также было установлено, что соединение **16** наиболее эффективно выделяло NO при облучении светом длиной волны 530-590 нм ( $\Phi_{\text{NO}} = 1,01 \times 10^{-3}$ ), в то время как

остальные соединения (**15 a-c**) лишь показали высокую интенсивность флуоресценции (Схема 5). Авторы объясняют это тем, что для соединения **16** облегчен процесс  $\pi$ - $\pi$  стэкинга между NO-высвобождающим фрагментом и фрагментом хромофора, что приводит к эффективному переносу электрона. Также авторы показали, что для их соединений ключевым шагом в фотовысвобождении NO является образование феноксильного радикала, путем метилирования гидроксильной группы, что значительно подавляло фотовысвобождение NO.

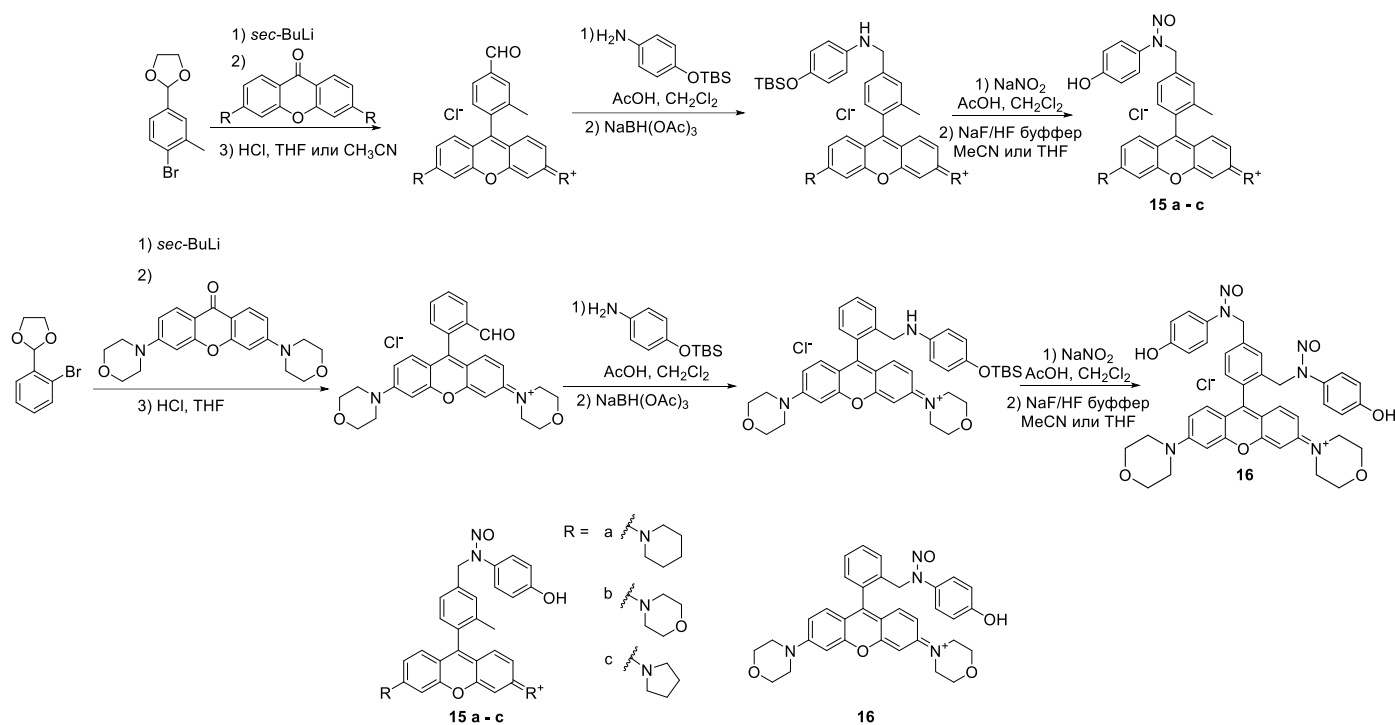


Схема 5. Схема синтеза фотодоноров **15** и **16**

Далее Накагава (Nakagawa) и коллеги [34] разработали аналог донора **16** - NORD-1 (**17**) на основе остова Si-родамина [35], работающий в красной области. Для получения целевого соединения использовалась аналогичная схема превращений, в которой были использованы 2-(2-бромфенил)-1,3-диоксолан и 3,7-бис(диметиламино)-5,5-диметилдибензо[b,e]силин-10(5H)-он. Было показано, что выделение NO происходит при облучении светом длиной волны 630-690 нм ( $\Phi_{NO} = 3.85 \times 10^{-3}$ , Схема 6). Авторы установили, что с помощью **17** можно успешно фотоуправлять вазодилатацией крысиной аорты *ex vivo*, а также контролировать внутрикавернозное давление с помощью комбинации NORD-1 и источника красного света *in vivo*.

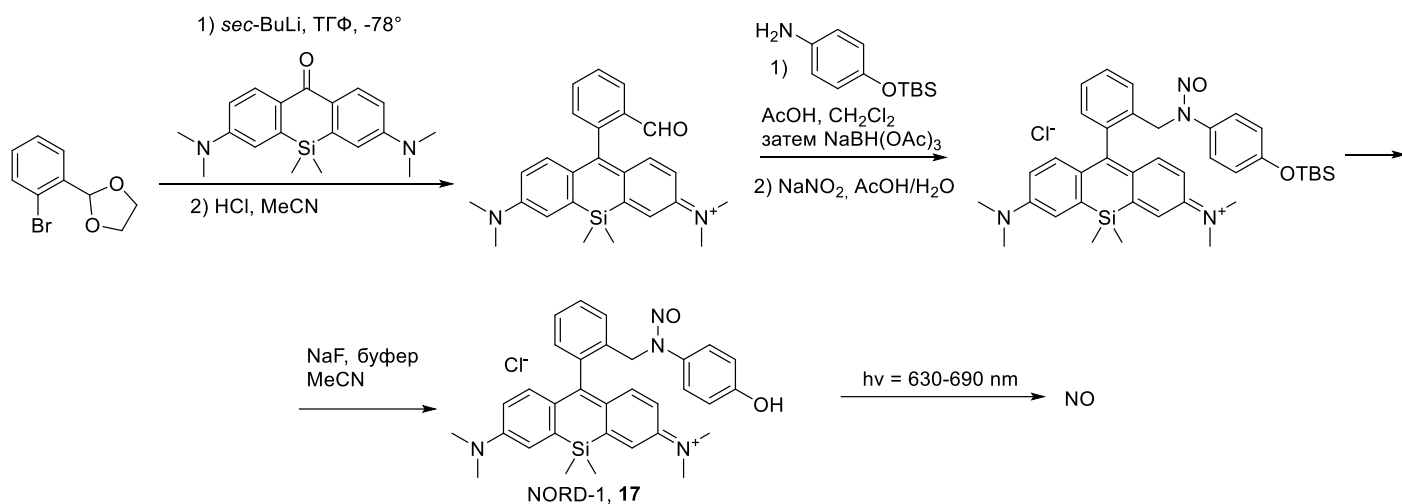


Схема 6. Синтез фотодонора *NORD-1* и фотохимическое выделение *NO*

Янг (Yang) и коллеги [36] получили *N*-нитрозо донор NOD560 (**18**) на основе родамина, в котором нитрозо-группа находится при атоме азота родаминового кольца. Они показали, что высвобождение *NO* происходит при облучении светом длиной волны 532 нм. Одновременно с этим увеличивается интенсивность флуоресценции в процессе отщепления нитрозо-группы, что может быть полезно для наблюдения за выделением *NO* в биологических системах. В дальнейшем авторы модифицировали полученный донор. В первом случае добавлением сульфонатной группы к *N*-нитрозо фрагменту (**20**), что увеличило растворимость вещества в воде [37]. Во втором случае был получен морфолин-замещенный донор (**22**), который, благодаря морфолиновому заместителю, мог целенаправленно действовать на лизосомы [38].

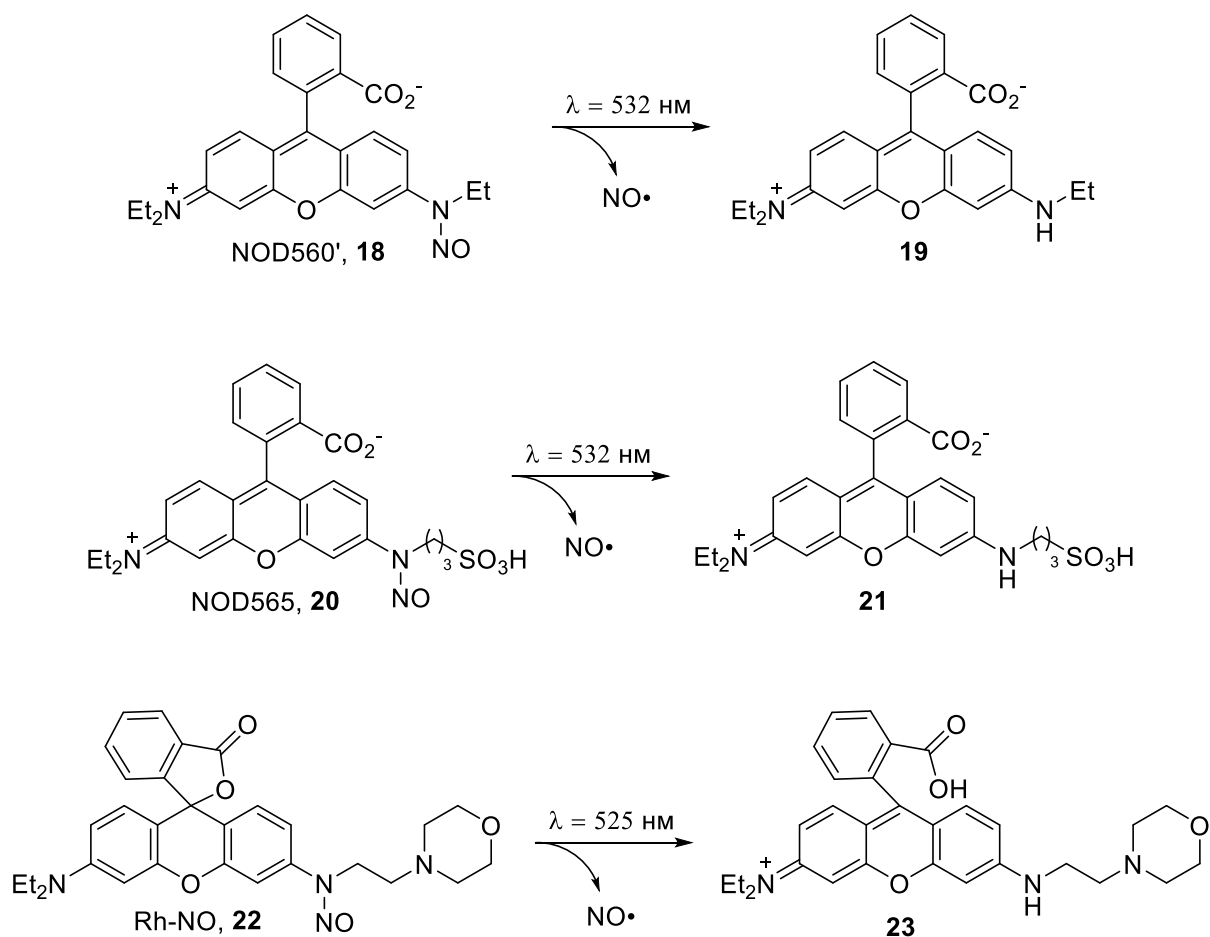


Схема 7. Структуры доноров NOD560', NOD565 и Rh-NO

Стоит отметить, что хроменилиевый аналог соединения **22**, донор **24** высвобождал NO с выходом 91% только при возбуждении длиной волны 365 нм несмотря на то, что полоса поглощения данного соединения находится в видимой области ( $\lambda_{\text{abs}} = 537 \text{ nm}$ ) [39]. Более того, было обнаружено, что двугранный угол между нитрозо-фрагментом и ядром родамина влияет на эффективность фотовысвобождения NO. В соединениях **18**, **20** и **22** нитрозаминная группа практически ортогональна плоскости хромофора, в то время как в соединении **25** N-нитрозо фрагмент закреплен в копланарной геометрии, благодаря наличию дополнительного шестичленного цикла [26]. Прямое сопряжение хромофора и нитрозоаминовых фрагментов обеспечивает более эффективный фотоиндуцированный внутримолекулярный перенос заряда, что приводит к высвобождению NO при облучении длиной волны 532 нм примерно в 20 раз эффективнее, чем при облучении соединения **18**.

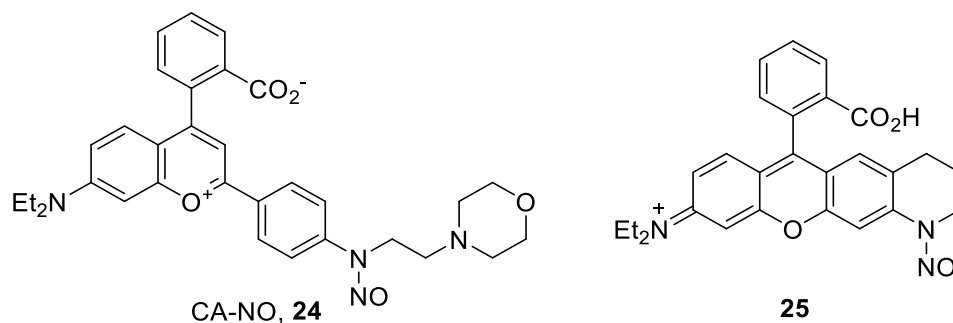


Рисунок 2. Структуры доноров CA-NO (**24**) и **25**

Дважды N-нитрозированный аналог **18** **26** высвобождает NO только при облучении УФ-светом ( $\lambda = 365$  нм) [40]. В отличие от **18**, которое существует в виде равновесной смеси открытой флуоресцентной формы, поглощающей видимый свет, и лактонной нефлуоресцентной, поглощающей УФ-свет, донор NOG (**26**) существует исключительно в виде лактона. Эта молекула была использована для изучения изменений в митохондриальной динамике после высвобождения NO, индуцированного облучением светом с длиной волны 375 нм [41].

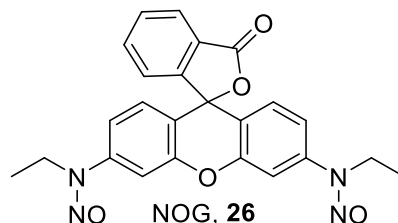


Рисунок 3. Структура донора NOG

Чжоу (Zhou) и коллеги синтезировали N-NO доноры photoNOD (**27,28**) на основе остова aza-BODIPY [42]. Было показано *in vivo* и *in vitro* высвобождение NO при облучении светом с длиной волны 700 нм (Схема 8). Эти молекулы также являются фотоакустическими сенсорами, которые позволяют отслеживать с помощью фотоакустической томографии *in vivo* локальное высвобождение NO, зависящее от облучения. Использование красного и ближнего инфракрасного света представляет особую ценность для биологических исследований, поскольку такой свет способен проникать в кожу на глубину 4-5 мм, при этом минимизируя возникновение побочных процессов [43].

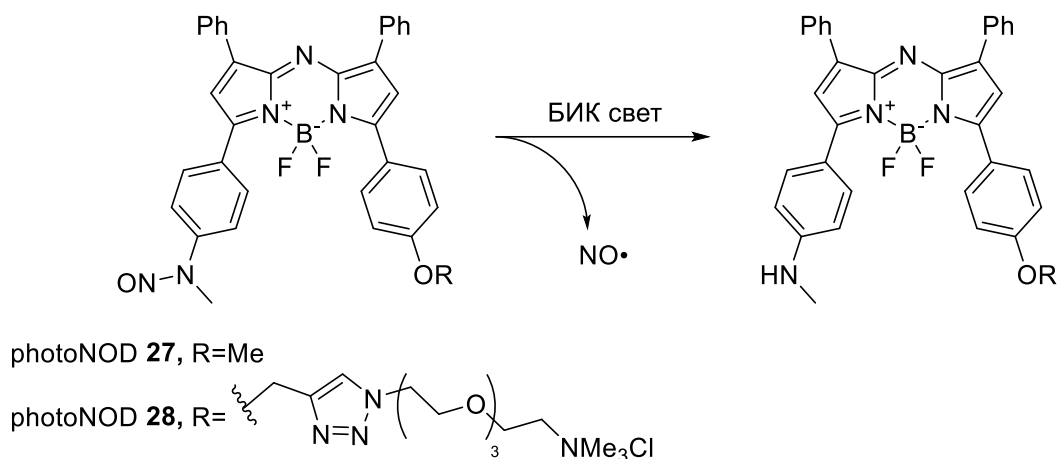


Схема 8. Облучение соединений *photoNOD* БИК светом

Производное нафталимида **29** представляет собой еще один *N*-нитрозоамино фотоактивируемый донор [44]. Он выделяет NO только при облучении УФ-светом ( $\lambda_{\text{irr}} = 365$  нм) или при 2P (двухфотонном) возбуждении при  $\lambda_{\text{irr}} = 740$  нм. Его кумаринилзамещенный аналог **30** также выделяет NO при УФ-облучении или двухфотонном возбуждении при  $\lambda_{\text{irr}} = 800$  нм с химическим выходом 79% [45].

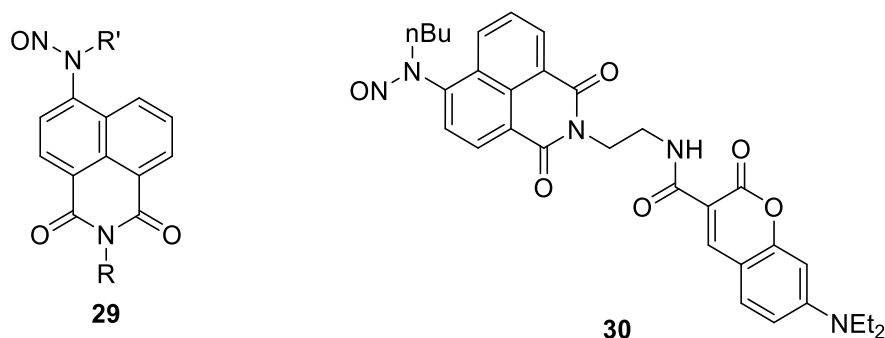


Рисунок 4. Структуры NO доноров на основе нафталимида

### 1.1.2 *o*-Замещенные нитроарены

Производные нитробензола также используются в качестве фотоактивируемых доноров NO. В отличие от BNN, в таких соединениях группой, ответственной за фотовысвобождение NO, является нитроарильная группа. Облучение нитробензола жестким УФ-светом (от 40 нм до 280 нм) или светом в более коротковолновом диапазоне индуцирует фотоизомеризацию до арилнитрита, который в последствии претерпевает гомолитическое расщепление O-NO связи с выделением NO [46]. Согласно литературе [47], такое превращение инициируется нуклеофильной атакой атома кислорода нитрогруппы в *ипсо*-положение

ароматического кольца. Перегруппировка нитроарена в арилнитрит зависит от электронной плотности на атоме *ipso*-углерода и положения нитрогруппы по отношению к кольцу, поскольку перегруппировка включает в себя взаимодействие атома кислорода нитрогруппы с *ipso*-атомом углерода. (Схема 9)

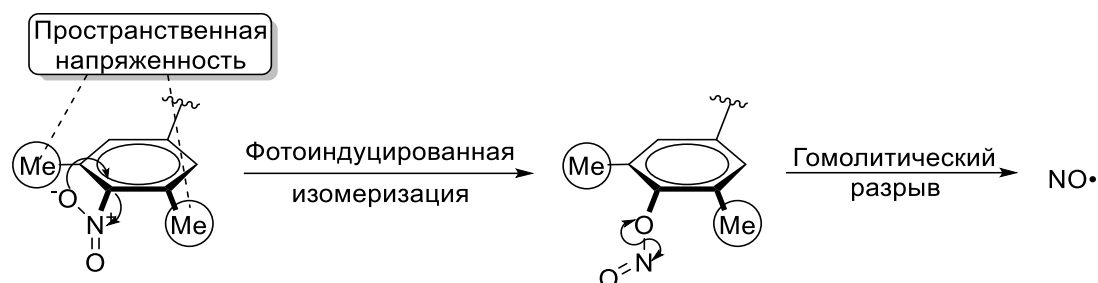


Схема 9. Механизм фотоиндуцируемой нитро – нитритной перегруппировки

Сортино (Sortino) и коллеги исследовали клинически используемый нестероидный антиандрогенный препарат флутамид (**31**), в котором пониженная электронная плотность *ipso*-углерода обусловлена наличием трифторметильной группы в *ortho*-положении к нитрогруппе (Схема 10). Они обнаружили, что препарат может высвобождать NO при облучении светом в диапазоне от УФ-А до видимого [48; 49], и синтезировали различные производные **31** в качестве фотоуправляемых доноров NO и материалов, высвобождающих NO [50].

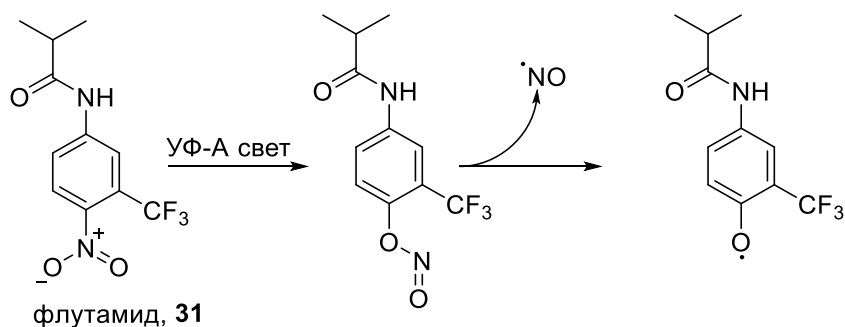


Схема 10. Облучение соединения флутамид светом УФ-А диапазона

Гексадециламин-замещенный 4-нитро-3-(трифторметил)анилин **32** (Рисунок 5) был использован Хосе (Jose) и коллегами [51] для приготовления наноразмерных липидных везикул для фотоиндуцированной доставки NO ( $\lambda_{irr} = 410$  нм). Однако push-pull замещенные нитроарены являются плохими хромофорами ( $\epsilon_{max} \approx 1000$  М<sup>-1</sup> · см<sup>-1</sup>) и должны быть сенсibilизированы, чтобы обеспечить активацию видимым светом. Сортино (Sortino) и его коллеги [52] представили

фотоактивируемый донор **33** на основе антрацена, который выделяет NO при облучении светом с длиной волны 420 нм. Соединение **33** было использовано в качестве фотодонора при конструировании меченого флуоресцеином супрамолекулярного комплекса  $\beta$ -циклодекстрина с фотосенсибилизатором - фталоцианином цинка [53]. Эта система обладает фотохимическими характеристиками «пять в одном»: возбуждение видимым светом или двухфотонное возбуждение (740 нм), легкая визуализация благодаря отчетливой флуоресценции, выработка цитотоксического синглетного кислорода и высвобождение NO, цитотоксический эффект которых тестировался на клетках карциномы A431. Соединение **34** на основе кумарина вводили в фотоантимикробные полимерные пленки для высвобождения NO при облучении с длиной волны больше 400 нм [54].

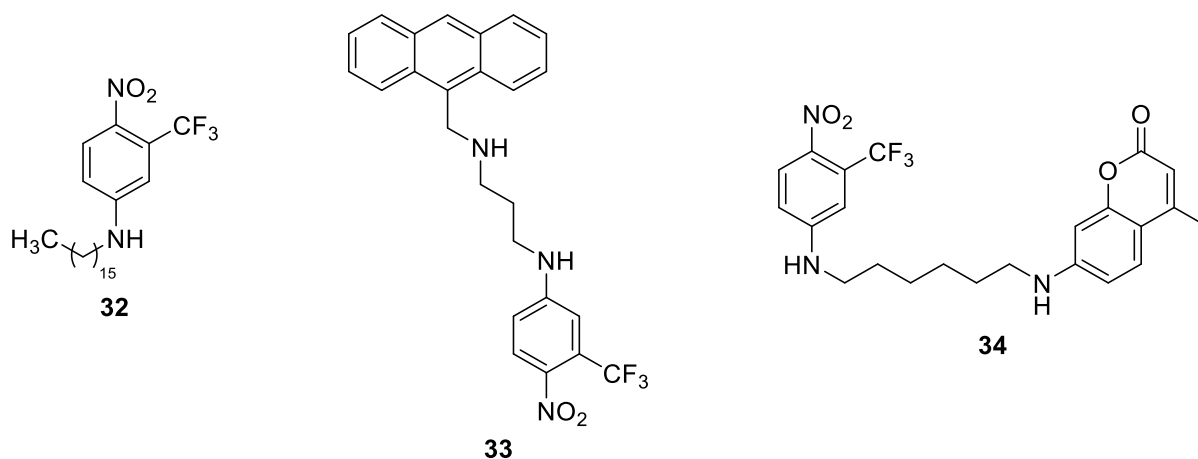


Рисунок 5. Структуры фотодоноров на основе *o*-трифторметил замещенных нитроаренов

Фукухара (Fukuhara) и коллеги [55] также независимо сообщили о таком типе фотоизомеризации видимым светом в 6-нитробенз[*a*]пирене (**35**) (Рисунок 6). Предполагается, что в этом соединении атомы водорода в *пери*-положениях к нитрогруппе вызывают стерические затруднения, тем самым выводя ее из плоскости молекулы и облегчая фотоактивируемую нитро-нитритную перегруппировку.

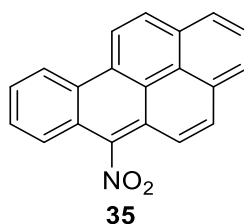


Рисунок 6. Структура 6-нитробенз[а]пирена

Накагава (Nakagawa) и коллеги [56] сообщили об аналогичной реакции высвобождения NO в 2,6-диметилнитробензоле, сопряженного с фенилбутадиеном (**36a**), в диапазоне УФ-А. Ими был исследован ряд производных 2,6-диметилнитробензола и его родственных соединений. Авторы предположили, что двугранный угол между нитрогруппой и бензольным кольцом является одной из ключевых особенностей, влияющих на фотовысвобождение NO, и что увеличение сопряженной  $\pi$ -системы увеличивает длину волны полосы поглощения соединения. Предполагается, что в производных 2,6-диметилнитробензола две метильные группы выводят нитрогруппу из плоскости кольца, что приводит к более выгодному взаимодействию неподеленной пары атома кислорода с р-орбиталью атома углерода в *инсо*-положении. Некоторые из соединений авторов работали как доноры NO в клеточной культуре и проявляли цитотоксическую активность, которая зависела от высвобождения NO, индуцированного облучением [56].

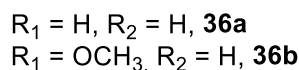
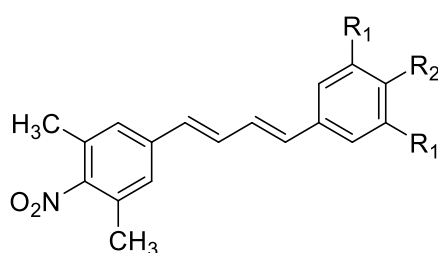


Рисунок 7. Производные 2,6-диметилнитробензолов

Сортино (Sortino) и его коллеги недавно синтезировали два гибридных флуоресцентных соединения photoNORM **37a** и **38** (Рисунок 8), которые объединяют фрагмент *N*-нитрозамина с *o*-трифторметилнитроареном и

сенсбилизатором BODIPY или родамином [57]. Оба соединения высвобождали NO при облучении зеленым светом ( $\lambda_{irr} = 510$  нм для **37a** и 532 нм для **38**), но выделение оксида азота (II) было более эффективным из BODIPY-замещенного производного **37a** ( $\Phi_{NO} = 0,031$ ), чем из родаминзамещенного соединения **38** ( $\Phi_{NO} = 0,001$ ). Предполагается, что реакция инициируется переносом электрона с группы N–NO на возбужденный фрагмент красителя. Хотя эти соединения должны выделять 2 экв. NO (один из N-нитрозамина и один из арильной нитрогруппы), наблюдался только разрыв связи N–N нитрозамина N–NO. Соединение **37b** выделяет NO при облучении светом с длиной волны 532 нм наряду с образованием синглетного кислорода [58].

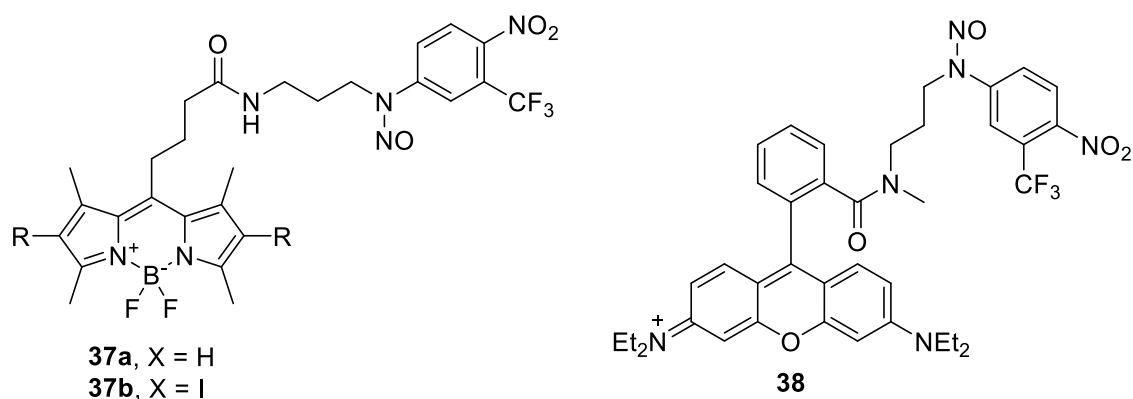


Рисунок 8. Гибридные фотодоноры, сочетающие N-нитрозоаминовый иотрифторметилнитро бензольный остовы

Группой Накагава (Nakagawa) также были получены и исследованы доноры NO на основе 2,6-диметилнитробензола в сочетании с остовами красителей. Было показано, что соединение Flu-DNB (**39**) выделяет NO при облучении светом 330–380 нм (УФ-А) [59]. В дальнейшем, авторами была показана возможность выделения оксида азота при облучении фемтосекундным лазером с длиной волны 720–735 нм, вероятно, через двухфотонное поглощение [60]. Также авторы продемонстрировали применение Flu-DNB *in vivo* на модели живой мыши, в мозгу которой наблюдали увеличение диаметра сосудов при облучении БИК-импульсным лазером. В дальнейшем авторы попытались улучшить свой донор, заменив амидный фрагмент на двойную связь C–C. В результате, квантовый выход

процесса двухфотонного поглощения-разложения Flu-DNB-DB (**40**) был примерно в 8 раз выше, чем у его предшественника [61].

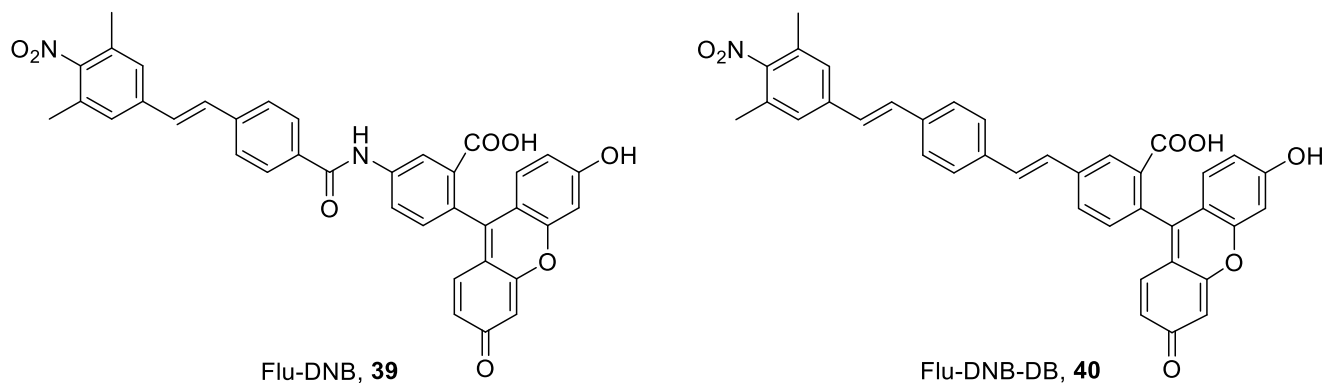


Рисунок 9. Структуры фотодоноров на основе диметилнитробензола и остова флуоресцеина

Также группа Накагава (Nakagawa) сообщила о еще одном примере 2,6-динитробензольного донора NO – RoIDNB (**41**, **42**, Рисунок 10), в котором донорный остов и остов хромофора были расположены более «компактно», в отличие от ранее описанных примеров. Было обнаружено, что RoIDNB выделяют NO при облучении длиной волны 530-590 нм. Также одной из особенностей данных соединений является селективная локализация в митохондриях благодаря катионной природе [62].

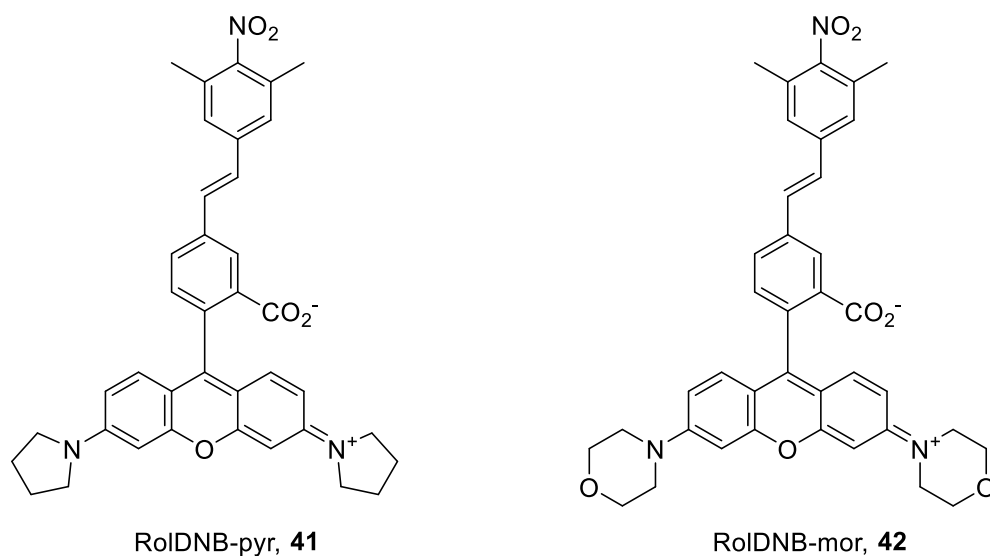


Рисунок 10. Структуры фотодоноров на основе диметилнитробензола и остова родамина

### 1.1.3 «Упакованные» NONO-аты («Caged» NONO-аты)

NONO-аты являются классическими представителями доноров NO, которые широко известны и коммерчески доступны. Минусами таких соединений является их условия хранения – NONO-аты стабильны в щелочных растворах (pH = 8) и при температуре порядка -20 °С. При уменьшении pH и увеличении температуры наблюдается выделение двух молекул NO из исходных соединений [63].

Обойти ограничения, связанных с условиями хранения NONO-атов, удалось благодаря внедрению фотолабильных групп. Так, Циен (Tsien) и его коллеги [64] разработали серию соединений CNO (**43**, caged nitric oxide, Схема 11), «упакованные» версии диолата диазения (NONO-аты) в качестве первого поколения фотоактивируемых доноров NO. CNO представляют собой NONO-аты защищенные фотолабильными орто-нитробензильными производными. CNO превращаются в соответствующий NONO-ат при фотооблучении в УФ-диапазоне, который в результате дальнейшего гидролиза высвобождает NO. Снятие фотолабильной защитной группы можно активировать однократным фотооблучением. Авторы предполагали, что в результате снятия защитной группы будет восстанавливаться исходный NONOат, который бы высвобождал NO в течение нескольких минут. Однако NO высвобождался практически моментально ( $\leq 5$  мс). Такую высокую скорость выделения авторы связывают с катионом  $H^+$ , выделяющимся в результате снятия защитной группы, что и вызывало быстрое разложение NONOата.

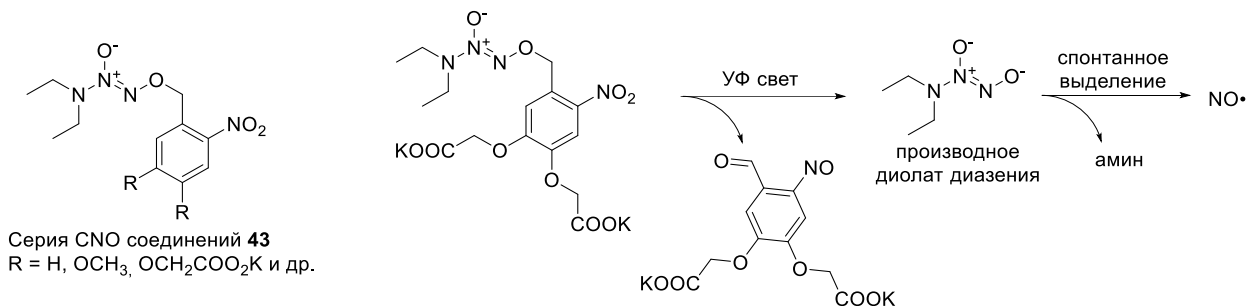


Схема 11. Структуры CNO. Фотоиндуцированное УФ светом выделение NO из CNO

Другой подход был использован Сортино (Sortino) и его коллегами, которые использовали купферрон, термически высвобождающий NO (существующий в двух резонансных формах: диолат фенилдиазения **44** и N-нитрозо-N-фенилгидроксиламинат **45** [65]) в сочетании с остовом BODIPY **46** [21]. Его облучение при 530–550 нм приводило к отщеплению защитной группы BODIPY и высвобождению купферрона, который термически выделяет 1 эквивалент NO. Авторы успешно продемонстрировали использование комбинации соединений **46** и **47** в качестве агента для фотодинамической терапии на клеточной линии меланомы человека. При облучении зеленым светом комбинация соединений проявляла цитотоксичность к исследуемой клеточной линии, благодаря комбинированному действию NO и  $^1\text{O}_2$ . Введение атомов йода в ядро хромофора BODIPY увеличивает выход синглетного кислорода в аэрированных растворах благодаря сенсibiliзирующему эффекту триплетно-возбужденного красителя [66].

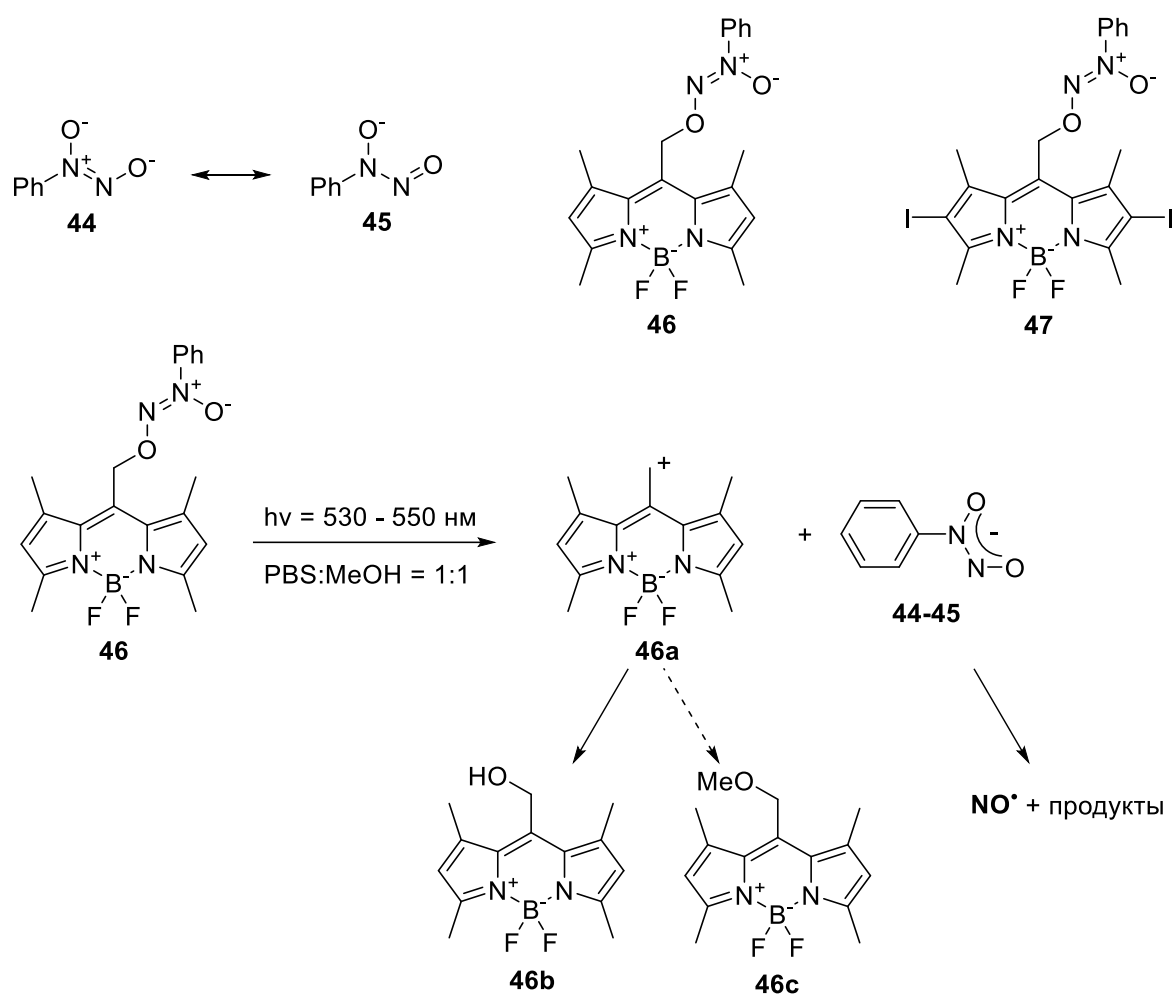


Рисунок 11. Структуры купферрона и фотодоноров на его основе. Механизм отщепления защитной BODIPY группы и выделение NO

Таким образом, на сегодняшний день был получен широкий ряд фотоактивируемых доноров оксида азота (II) на основе различных красителей, использующих различные принципы фотовыделения. Диапазон работы современных успешно покрывает большую часть светового спектра активации (УФ-А - БИК). Одним из недостатков современных фотоактивируемых доноров, например на основе родамина или розамина, является их многоступенчатый синтез, что значительно уменьшает выход целевых соединений. В связи с этим, актуальной задачей является поиск более простых методов получения фотоактивируемых доноров на основе «легкособираемых» красителей.

## 1.2 NO-чувствительные флуоресцентные зонды

### 1.2.1 Классические методы детектирования NO

Для изучения многообразия ролей оксида азота (II) в живых организмах исследователям необходимы инструменты, способные как направленно выделять NO, так и детектировать его наличие и количество в различных органах и клетках. Одним из классических методов определения NO является спектрофотометрия с использованием реагента Грисса [67; 68]. Реагент Грисса состоит из N-(1-нафтил)этилендиамина и сульфаниловой кислоты (или сульфаниламида) в равных пропорциях. Образующийся из NO в результате легко протекающего окисления *in vivo* или в водной среде,  $\text{NO}_2^-$  может взаимодействовать с сульфаниловой кислотой с образованием diazonиевой соли, которая затем реагирует с N-(1-нафтил)этилендиаминном (Схема 12). Полученный продукт представляет собой фиолетово окрашенный азо-краситель, который может быть количественно определен с помощью оптической спектроскопии на длине волны 520-560 нм [69]. Ограничением такого метода анализа является тот факт, что определяется лишь  $\text{NO}_2^-$ , но не  $\text{NO}_3^-$ . В связи с этим  $\text{NO}_3^-$  необходимо сначала восстановить до  $\text{NO}_2^-$ , используя нитратредуктазу или другие восстановители, непосредственно перед анализом. Низкая стоимость и простота в использовании являются общепризнанными преимуществами данного метода. Однако такой подход к определению NO не может быть использован для обнаружения внутриклеточного NO из-за его относительно низкой чувствительности (около 0,5 мкМ) [70].

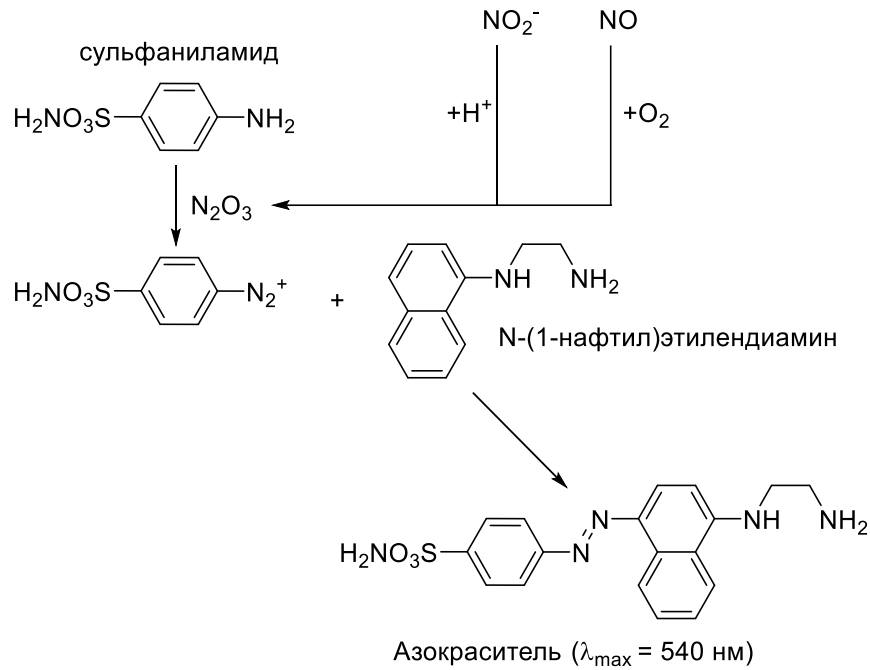


Схема 12. Принцип анализа с использованием реагента Грисса

Другим распространенным методом обнаружения NO является хемилюминисцентный метод. Классический хемилюминесцентный метод обнаружения NO основан на реакции между озоном ( $O_3$ ) и NO с образованием диоксида азота в возбужденном состоянии ( $NO_2^*$ ), который впоследствии возвращается в основное состояние с выделением света [71]. На этом принципе построена широко используемая система детектирования NO Sievers 280i Nitric Oxide Analyzer (NOA), обладающая высокой чувствительностью с пределом обнаружения до 1 пМ [72].

В отличие от вышеупомянутых методов обнаружения электрохимический метод может непрерывно измерять концентрацию NO в режиме реального времени. Механизм такого обнаружения и измерения заключается в следующем: поверхность рабочего электрода покрывается полупроницаемой полимерной пленкой (например пленка Nafion) [73], через которую NO может проходить со скоростью, пропорциональной его концентрации. При взаимодействии NO и катода происходит окисление и производится ток, пропорциональный концентрации окисленного оксида. На таком принципе был разработан прибор ISO-NO компанией World Precision Instrument (WPI). С тех пор было разработано

множество электрохимических сенсоров NO с наименьшим пределом обнаружения 0,2 нМ [74]. С помощью такого метода анализа можно оценить поведение доноров NO, активируемых светом. Используя измеритель ISO-NO, Сортино (Sortino) и коллеги исследовали фотовысвобождение NO из полимерных пленок с добавлением фотодоноров [54].

Несмотря на радикальную природу NO, использование ЭПР спектроскопии для прямого определения оксида азота затруднительно в следствии ряда факторов: низкая концентрация NO в организме ( $10^{-9} - 10^{-7}$  М в организме человека), способность легко проникать сквозь мембраны, высокая реакционная способность по отношению к кислороду, супероксид аниону, металлопротеинам (образование нитрозил-производных) и к цистеину и его остаткам (образование нитрозо-тиолов) [75]. В связи с этим, для определения NO используются различные спиновые ловушки. Например, нитронил нитроксиды (NNO, например РТЮ 48, сРТЮ 49), которые представляют собой N-оксо-имидазольные радикалы, которые при взаимодействии с NO образуют  $\text{NO}_2^{\bullet}$  и имино-нитроксидный радикал [76; 77]. Таким образом не происходит прямого захвата NO и конечный ЭПР спектр представляет собой перекрывающиеся ЭПР спектры двух радикалов, образующихся в результате реакции, что затрудняет интерпретацию результатов и количественное определение NO [78].

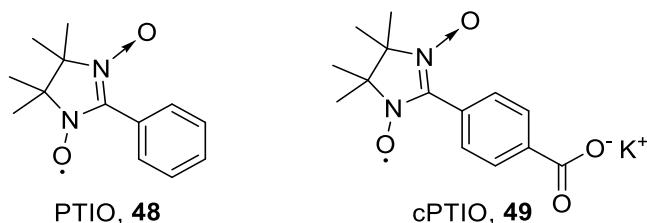


Рисунок 12. Структуры нитронил нитроксидов (NNO)

Другой спиновой ловушкой для исследования NO является гемоглобин (Hb) и миоглобин. В отличие от нитронил нитроксидов, гемоглобин напрямую захватывает NO, что позволяет проводить эксперименты с изотопом  $\text{N}^{15}$ . В качестве ограничений использования таких спиновых ловушек является необходимость проведения экспериментов в анаэробных условиях для поддержания

деоксигенации гемоглобина. Также одной из особенностей такого анализа является более сложный ЭПР спектр [79–82].

Третьим типом спиновых ловушек являются бис-дитиокарбаматы железа ( $\text{Fe}(\text{TC})_2$ ), поскольку NO крайне охотно связывается с хелатами железа [83–89]. Замена атома водорода при аминогруппе позволяет получать гидрофобные или гидрофильные спиновые ловушки (DETC **50** или MGD **51** соответственно). В результате взаимодействия ловушки с NO образуется мононитрозильный железный комплекс, ЭПР спектр которого может быть легко записан и исследован при комнатной температуре.

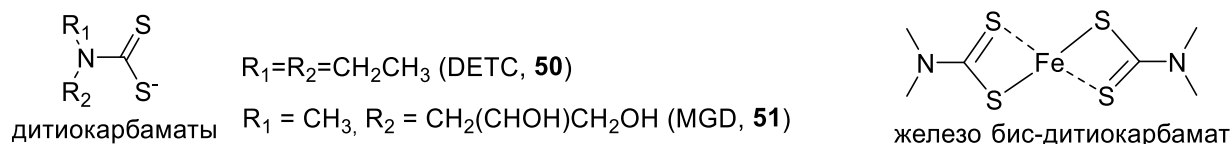


Рисунок 13. Структуры бис-дитиокарбаматов

### 1.2.2 Флуоресцентный метод анализа NO

Метод биовизуализации с использованием флуоресцентной спектроскопии привлекает исследователей, поскольку он может обеспечить визуализацию и определение NO в клетках и тканях *in vivo* и *in vitro*, а так же позволяет отслеживать концентрацию NO в режиме реального времени [90]. По сравнению с другими вышеупомянутыми методами детекции NO, такими как хемиллюминесцентная спектрометрия и спектрометрия электронного парамагнитного резонанса, флуоресцентный анализ имеет много преимуществ с точки зрения чувствительности, селективности, пространственно-временного разрешения и удобства проведения эксперимента [91; 92].

Флуоресцентные NO-зонды на органической основе зачастую состоят из двух элементов: NO-чувствительной части и флуорофора. NO-чувствительная часть служит модулятором в механизме фотоиндуцированного переноса электронов, который гасит флуоресценцию флуорофоров до тех пор, пока не вступит в реакцию с NO или продуктами окисления NO.

Наиболее распространенным подходом к обнаружению NO является использование *o*-диаминоароматических соединений в аэробных условиях, который был инициирован группой Нагано (Nagano) [93]. Также был разработан ряд новых флуоресцентных зондов на основе органических низкомолекулярных соединений использующие другие подходы – превращение эфиров Ганча в соответствующие пиридины (Схема 13B), реакция N-нитрозирования ароматических аминов с образованием диазо соединений (Схема 13C), превращение тиосемикарбазида в 1,3,4-оксадиазол (Схема 13D), прямое нитрозирование вторичных ароматических аминов (Схема 13E) и дезаминирование ароматических первичных аминов (Схема 13F). Механизм включения флуоресценции для перечисленных подходов также заключается в подавлении фотоиндуцированного переноса электронов при взаимодействии с NO.

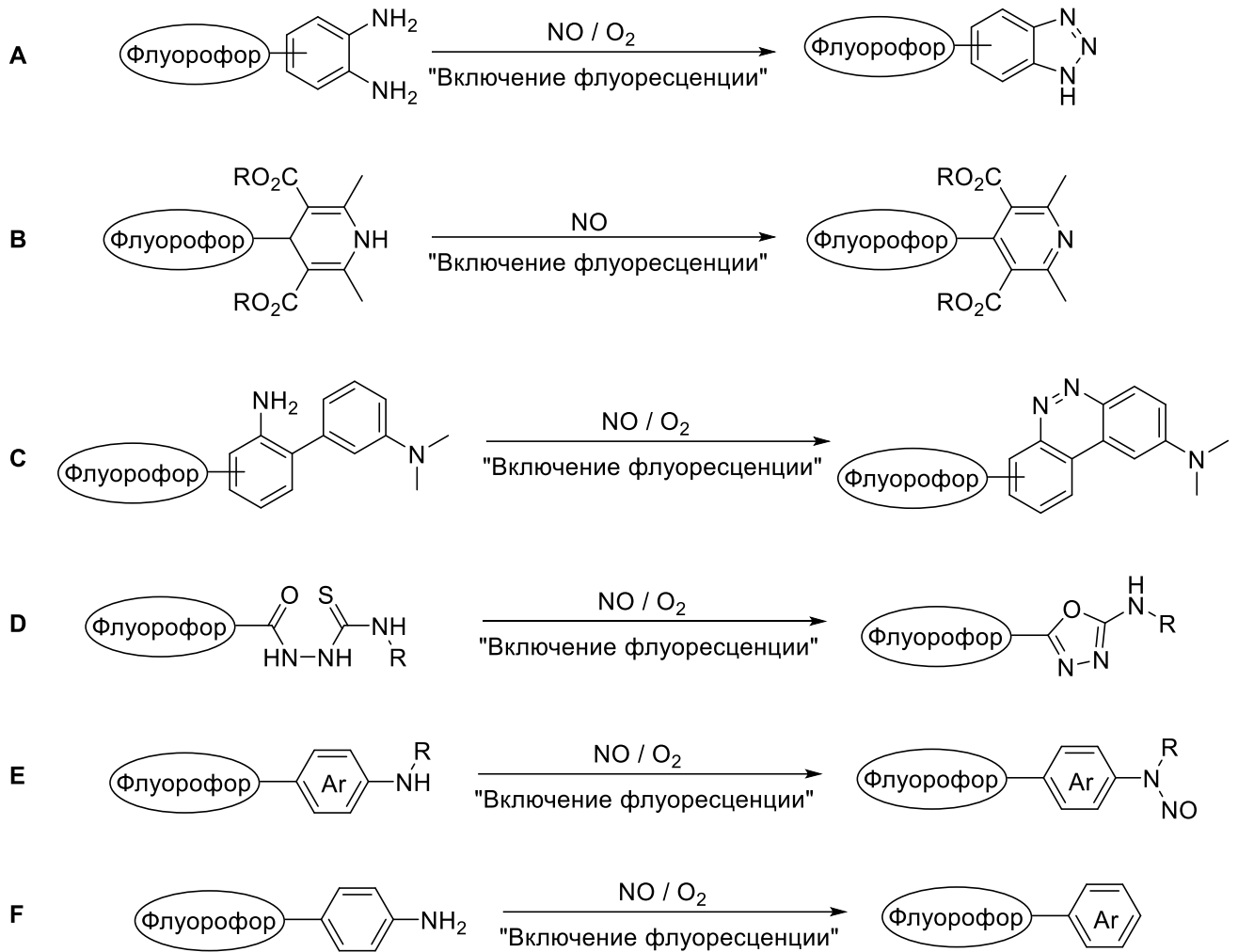


Схема 13. *Различные стратегии дизайна NO-чувствительных флуоресцентных проб*

### 1.2.2.1 *o*-Диаминоароматические соединения

Одним из классических NO чувствительных флуоресцентных зондов является 2,3-диаминонафталин (DAN). Подобно анализу с использованием реагента Грисса, использование DAN позволяет косвенно определять высвобождение NO путем измерения концентрации  $\text{NO}_2^-$ . В кислых условиях  $\text{NO}_2^-$  реагирует с 2,3-диаминонафталином (DAN) с образованием флуоресцирующего вещества 1-(*H*)-нафтотриазола [94], обладающего высокой эффективностью флуоресценции в щелочных условиях ( $\text{pH} > 10$ ) и который можно количественно определять по интенсивности флуоресценции при 450 нм после возбуждения светом с длиной волны 365 нм. DAN подходит для обнаружения NO в растворах, поскольку его чувствительность примерно в 50-100 раз выше, чем у анализа с

использованием реагента Грисса [95]. Предел обнаружения метода равен около 10 нМ. Минусами использования данного зонда для определения NO являются необходимость облучения УФ-светом и наличия кислотной среды, что ограничивает его использование *in vivo*.

Развитие идеи флуоресцентных зондов, использующих о-диаминоароматические производные, продолжилось в работах группы Нагано (Nagano), которая использовала в качестве хромофора остов флуоресцеина [93]. Полученный ими ряд соединений (**52-57**) не реагировал напрямую с NO, но реагировал с эквивалентами NO<sup>+</sup>, продуктами аутоокисления NO (например, N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Взаимодействие полученных соединений с NO в аэробных условиях приводило к получению триазольных производных с высоким уровнем флуоресценции.

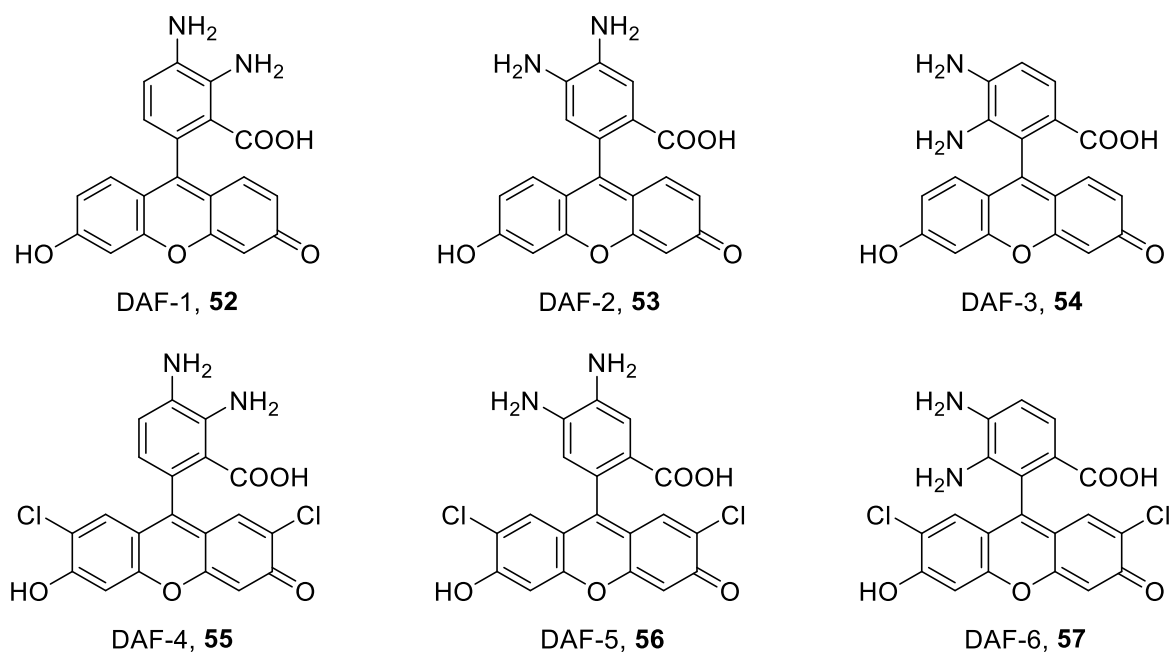


Рисунок 14. Структуры соединений DAF

В соответствии с предложенной авторами схемой реакции (Схема 14) для образования нитрозирующего продукта (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) требуется две молекулы NO [96; 97]. Отсутствие прямой реакции DAF с NO является важным свойством, поскольку измерение с помощью таких зондов не должно мешать передаче сигналов, связанных с NO.

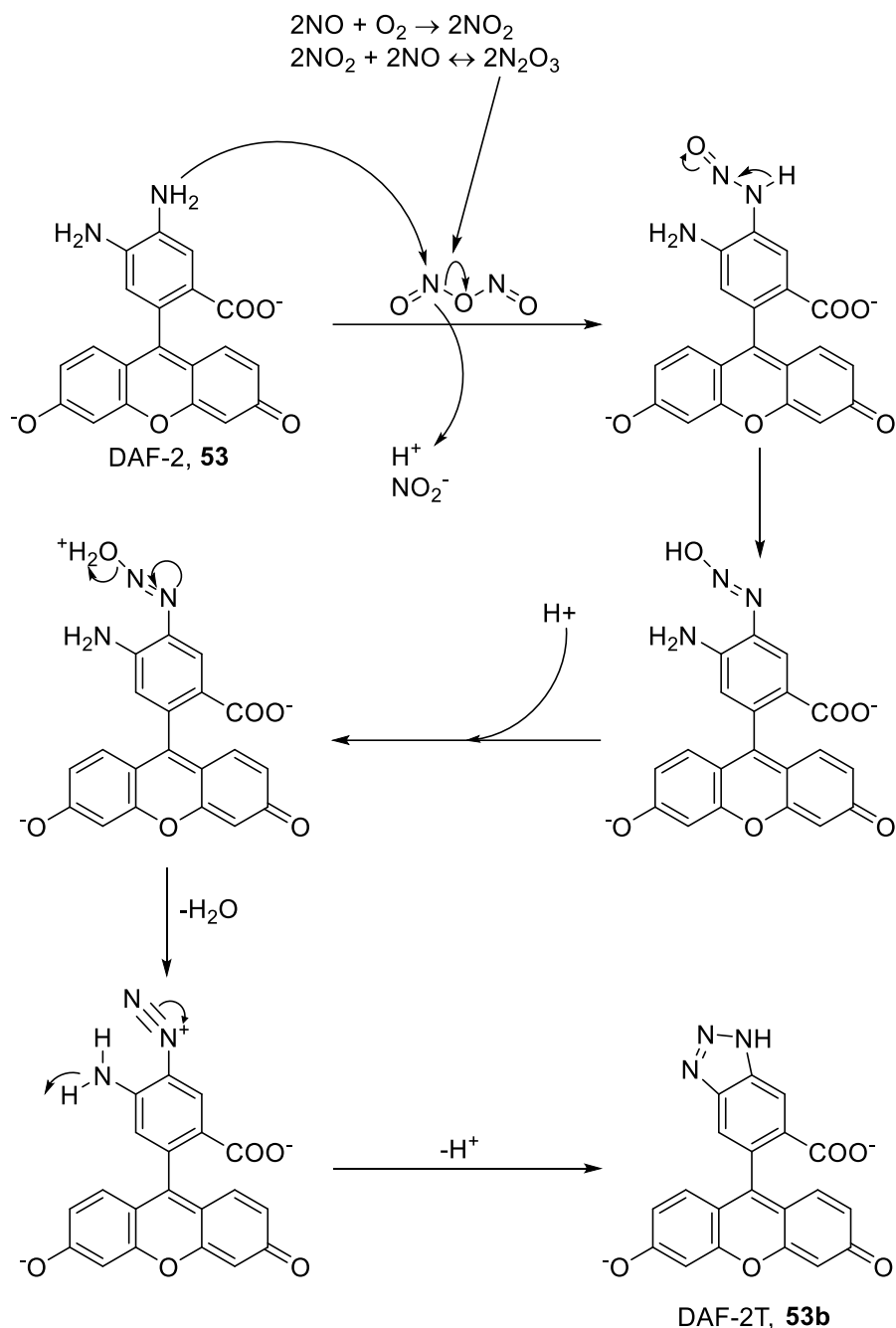


Схема 14. Предполагаемый механизм захвата NO DAF-2 (53) [93]

Кодзима (Kojima) с соавторами [93] показали, что DAF не реагируют в нейтральном растворе с другими окисленными формами NO, такими как  $\text{NO}_2^-$  или  $\text{NO}_3^-$ , а также не взаимодействуют с другими активными формами кислорода, такими как  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{ONOO}^-$ , с образованием каких-либо флуоресцентных продуктов. Также в отсутствие NO в физиологических условиях не образуются триазольные продукты [93]. Среди полученных ими зондов, наибольшую селективность к определению NO показали зонды DAF-2 и DAF-4, по сравнению с

другими DAF. Было установлено, что предел обнаружения NO для DAF-2 составляет 5 нМ.

Чтобы улучшить эффективность введения зондов в клетки, авторы также синтезировали зонд DAF-2 DA (**58**) – продукт диацилирования DAF-2. Полученный зонд был протестирован в клеточных условиях, и было установлено, что он легко проникает в клетки, где гидролизуется в течение 10 минут до DAF-2 внутриклеточными эстеразами, существующими в различных типах клеток (Схема 15). Поскольку зонд генерируется только внутри клетки, DAF-2 DA не может быть использован для пространственной (внутриклеточной) визуализации оксида азота (II) [93; 98].

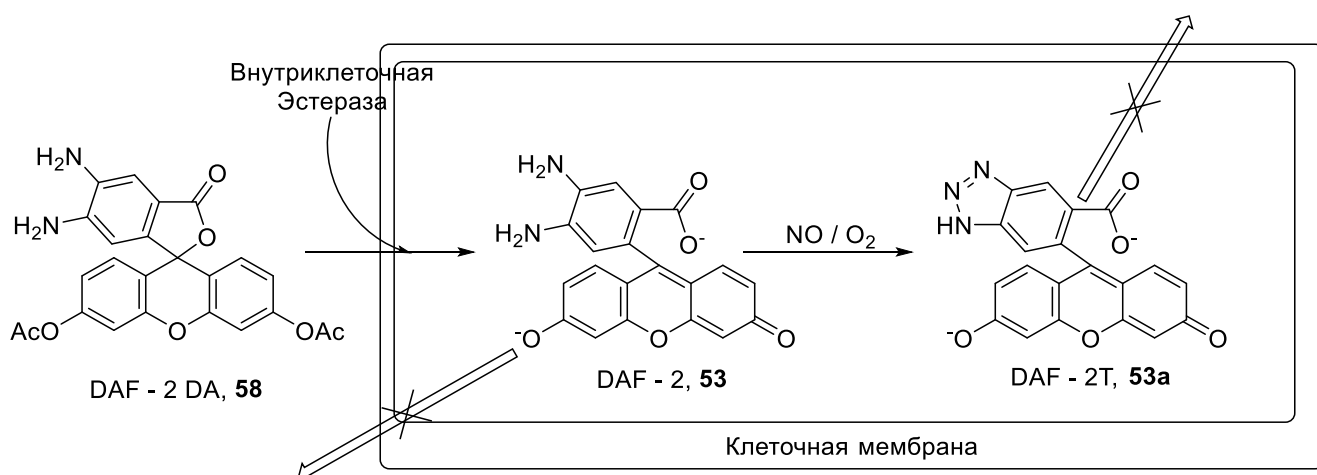


Схема 15. Определение NO с помощью зонда DAF – 2 DA

Поскольку флуоресценция флуоресцеина с двумя фенольными гидроксо-группами практически полностью гасится при протонировании OH<sup>-</sup> группы, авторы синтезировали зонды DAF-4 – DAF-6 (**55-57**) с электроноакцепторными атомами хлора с целью снизить рKa гидроксильных групп и получить стабильную интенсивность флуоресценции в условиях физиологического pH. Несмотря на то, что рKa гидроксильных групп действительно снизился, наблюдалось уменьшение интенсивности флуоресценции в диапазоне pH 7-9, вероятно, из-за депротонирования триазольного фрагмента [93]. В связи с этим, авторы решили ввести метильную группу в полученные ранее зонды (DAF-4 M1 **59**, 4 M2 **60**, 5 M1 **61** и 5 M2 **62**). Среди новых полученных зондов, наиболее чувствительным к

NO оказался DAF-4 M2. Интенсивность флуоресценции триазольной формы была стабильна при  $\text{pH} > 5.8$ .

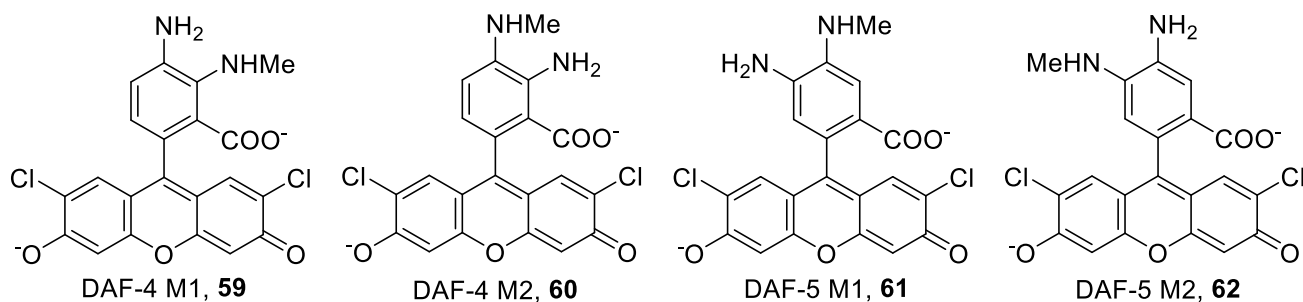


Рисунок 15. Структуры *N*-метилированных зондов DAF-4 и DAF-5

Известно, что фторированные производные флуоресцеина более устойчивы к фотообесцвечиванию, чем флуоресцеин. В связи с этим, Нагано (Nagano) и коллеги синтезировали зонд DAF-FM (**63**), в котором атомы хлора были заменены на атомы фтора. Исследование фотообесцвечивания при облучении солнечным светом солнце показало, что триазольная форма DAF-FM (DAF-FM T **64**) более стабильна, чем триазольные формы DAF-2 и DAF-4. Чувствительность DAF-FM оказалась в 1,4 раза выше, чем у DAF-2, что может быть связано с электронодонорным эффектом метильной группы. Его предел обнаружения NO составил 3 нмоль/л [98].

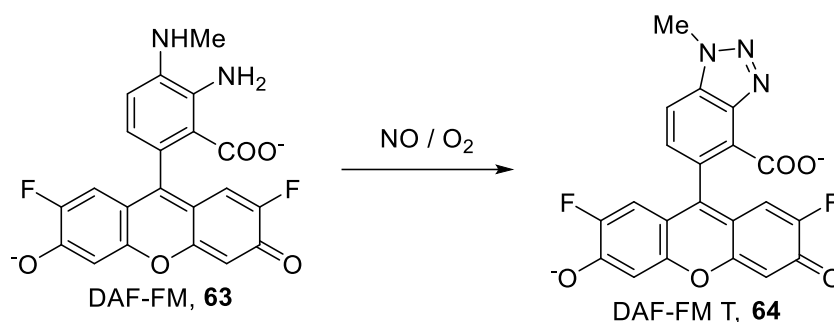


Схема 16. Взаимодействие зонда DAF-FM с NO в присутствии кислорода

В 2001 году, Кодзима (Kojima) и коллеги синтезировали ряд новых NO-чувствительных флуоресцентных зондов на основе красителя Родамина В (**65-74**, Рисунок 16). Переход к остову родамина был обусловлен желанием авторов улучшить фотостабильность изучаемых зондов, увеличить их длину возбуждения, а также расширить диапазон рабочего pH [99].

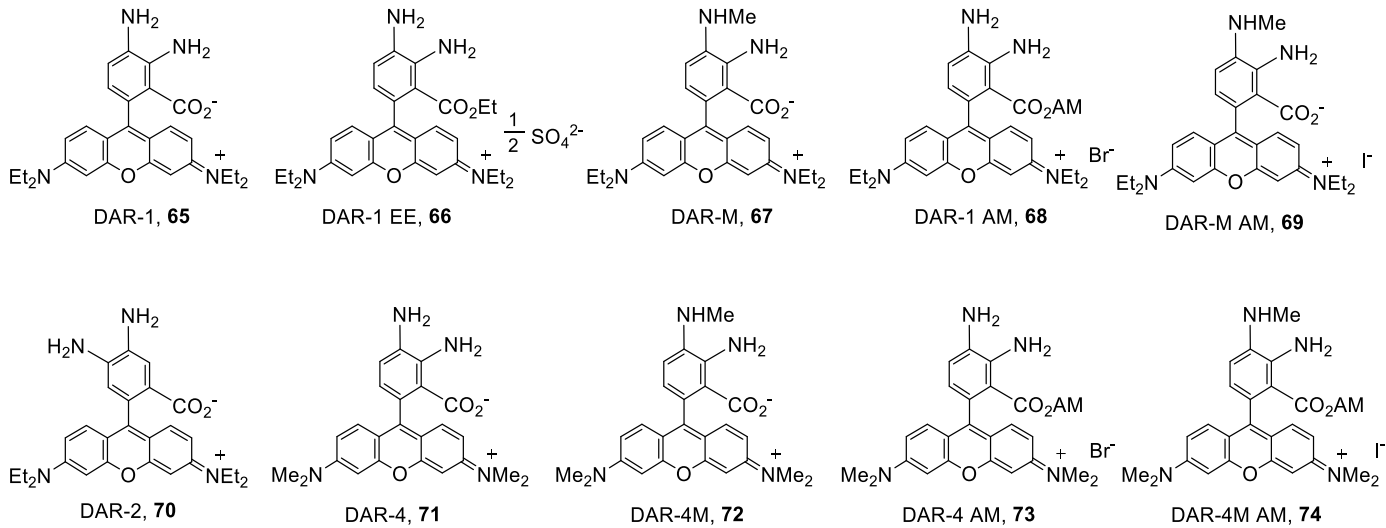


Рисунок 16. Структуры зондов 65-74

Среди всех полученных соединений, наиболее отличительными свойствами обладал зонд DAR-4M (72). Он обладал наибольшей квантовой эффективностью триазольной формы среди всех исследованных DAR. Порог определения NO для DAR-4M составил 7 нмоль/л. Также DAR-4M позволил определять NO при  $\text{pH} > 4$ , в то время как ранее описанный DAF-FM может быть использован только при  $\text{pH} > 5.8$  [100].

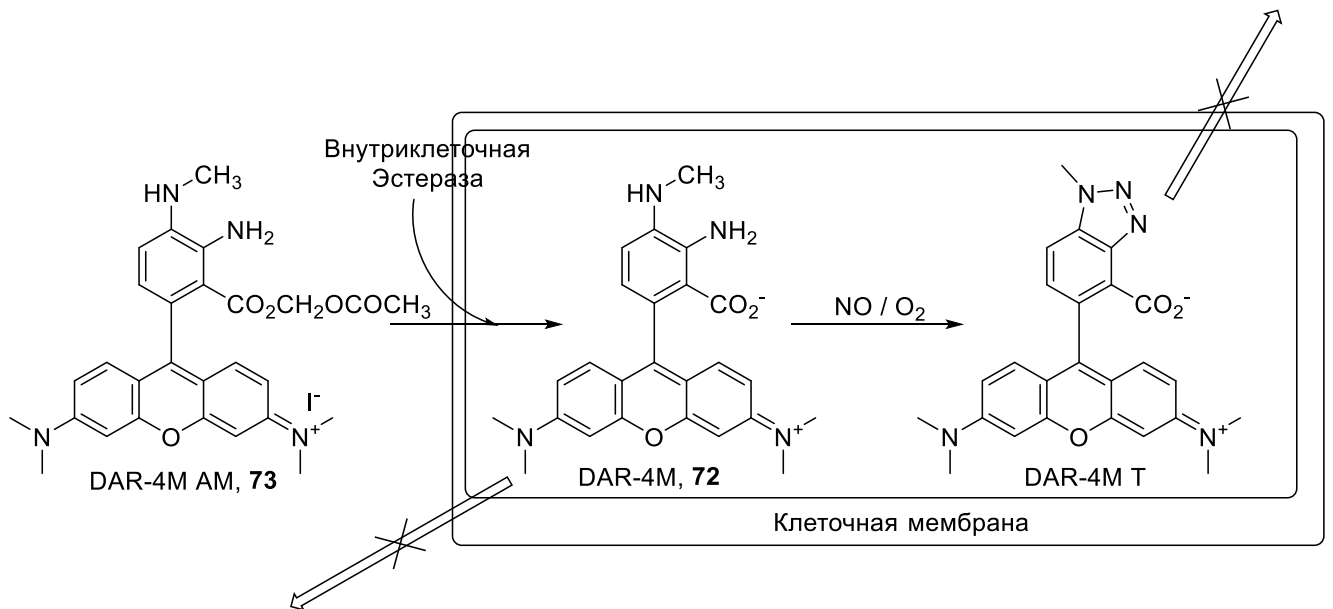


Схема 17. Определение NO с помощью зонда DAR-4M AM

Примером часто используемого NO-чувствительного флуоресцентного зонда с использованием *o*-диаминового подхода является 1,2-диаминоантрахинон (DAQ, 75). Было показано, что это соединение обладает высокой чувствительностью,

селективностью и точностью по отношению к NO [101]. Реакция DAQ с NO в присутствии кислорода приводит к образованию нерастворимого в воде красно-флуоресцирующего соединения ATD (76). ATD может быть визуализирован с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием фильтра, который используется для визуализации родамина ( $\lambda > 580$  нм). Как и в ранее описанных случаях, изменение в интенсивности флуоресценции связано с образованием триазольного кольца при реакции с NO в присутствии кислорода.

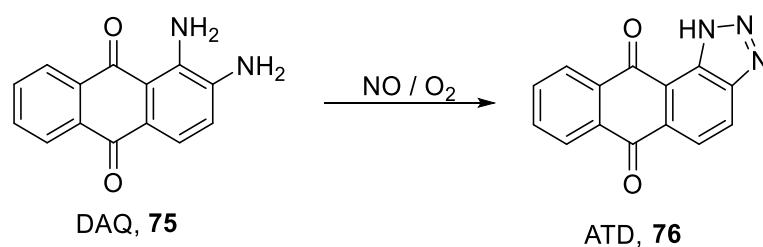


Схема 18. Определение NO с помощью зонда DAQ

Поскольку ATD не растворим в воде и выпадает в осадок при образовании, он не способен самопроизвольно диффундировать в ткани. Такая особенность позволяет проводить исследования флуоресценции даже в фиксированных (мертвых) тканях. Кроме того, принимая во внимание тот факт, что DAQ не проявляет нейротоксических свойств [102], с его помощью можно визуализировать в режиме реального времени продукцию NO в культивируемых нейронах гиппокампа [103] и в срезах мозга [102; 104]. Важно отметить, что усиление флуоресценции может ингибироваться поглотителями NO или ингибиторами NOS (nitric oxide synthase, NO-синтаза) [101; 105], а реакции DAQ с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, потенциальным источником кислородных радикалов, не наблюдалось [101; 103].

Остов BODIPY является хорошо известным хромофором, который зарекомендовал себя в различных биологических благодаря своей стабильности по отношению к окислению, термо- и фотодеструкции, а также благодаря возможности настраивать спектральные свойства целевых соединений с помощью простых химических превращений. Более того, спектр флуоресценции производных BODIPY лежит в широком диапазоне от 500 до 700 нм. Габе (Gabe) и коллеги [106] синтезировали ряд производных BODIPY, содержащих *o*-

фенилендиаминовый фрагмент. Среди полученных соединений, наиболее отличительными свойствами обладало соединение DAMBO-P<sup>H</sup> (77). Практически нефлуоресцирующий DAMBO-P<sup>H</sup> в присутствии NO превращается в соответствующую высокофлуоресцентную триазольную форму DAMBO-P<sup>H</sup>-T (78) ( $\lambda_{\text{возбуждения}} = 521$  нм;  $\lambda_{\text{испускания}} = 537$  нм). Благодаря введению в ядро хромора группы CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH (P<sup>H</sup>), полученный зонд может быть использован в широком диапазоне рН (3-13), в то время как большинство флуоресцентных зондов на основе флуоресцеина и родамина теряют флуоресцентные свойства из-за реакции лактонизации в кислых условиях. DAMBO-P<sup>H</sup> также можно использовать в буферных растворах, благодаря чему он может быть полезен для обнаружения ·NO в биологических исследованиях [106].

Также было показано, что чувствительность DAMBO-P<sup>H</sup> по отношению к оксиду азота (II) выше, чем у зонда DAF-2, благодаря отсутствию электроноакцепторных групп в *o*-фенилендиаминовом остове. Хотя DAMBO-P<sup>H</sup> обладает более высокой реакционной способностью, его селективность в отношении NO по сравнению с различными активными формами кислорода (АФК) оставалась высокой. Даже HO·, самый сильный окислитель среди АФК, не вызывал усиление флуоресценции [106].

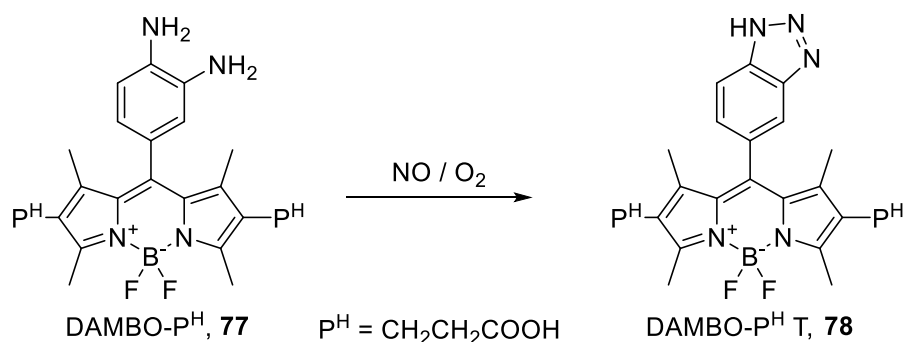


Схема 19. Взаимодействие зонда DAMBO-P<sup>H</sup> с NO в присутствии кислорода

Лю (Liu) и коллеги [107] синтезировали два NO-чувствительных флуоресцентных зонда на основе дибензоксантена с использованием *o*-фенилендиаминового фрагмента (Рисунок 17).

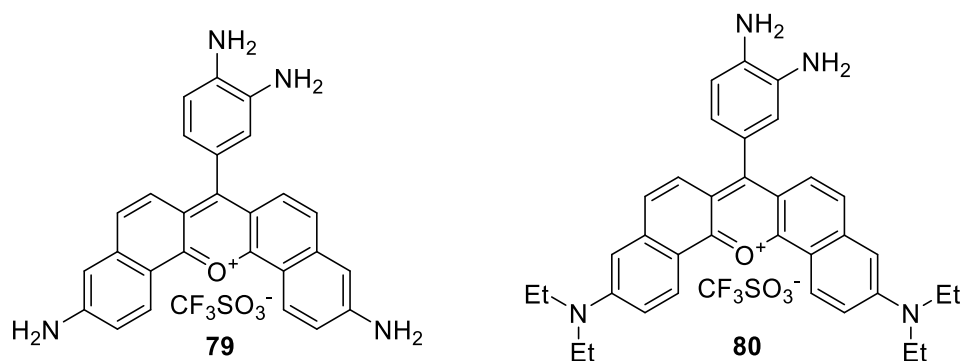


Рисунок 17. *NO* чувствительные зонды на основе дибензоксантена

Флуоресценция соединения **80** увеличивалась в 35 раз при взаимодействии с *NO* в присутствии кислорода. Оптический отклик зонда **80** по отношению к *NO* был протестирован с использованием донора *NO* 1-гидрокси-2-оксо-3-(3-аминопропил)-3-метил-1-триазен (NOC13, Рисунок 18) [108]. Было установлено, что тестовая реакция между зондом **80** и NOC13 завершалась в течение 20 мин, и была получена хорошая линейная зависимость при концентрации NOC13 в диапазоне 0,0–1,8 экв. Усиление флуоресценции являлось результатом подавления фотоиндуцированного переноса электрона между диаминофенильным и бензоксантениевым фрагментами, что было подтверждено расчетами DFT. Зонд **80** обладал хорошей селективностью и реагировал преимущественно с *NO* и не реагировал с другими потенциально мешающими веществами в биологических условиях. Также не наблюдалось заметных различий в спектрах флуоресценции в присутствии различных активных форм кислорода и азота ( $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ClO}^-$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$ ).

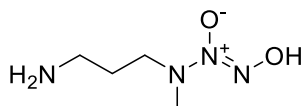


Рисунок 18. Структура NOC13

Применимость зонда **80** для детекции *NO* в живых клетках исследовалось на клетках линии HeLa. Было обнаружено, что при обработке клеток лишь зондом **80** флуоресценция не наблюдалась, в то время как при добавлении к обработанным клеткам донора NOC13 наблюдалась сильная красная флуоресценция.

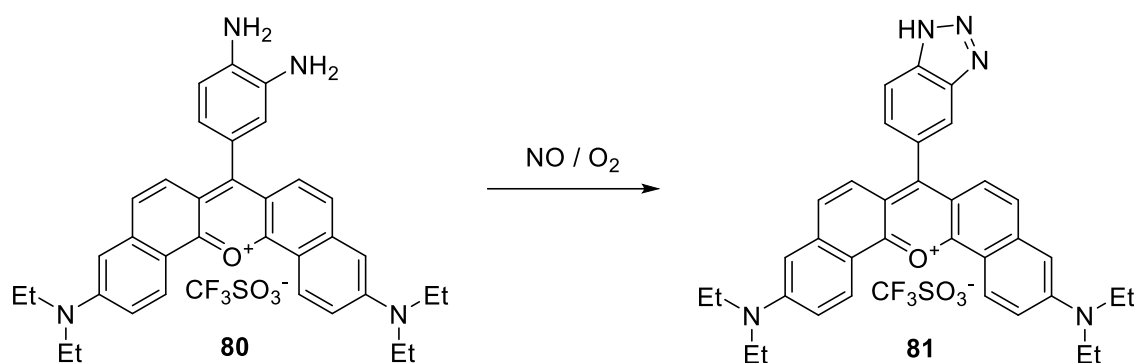


Схема 20. Взаимодействие зонда **80** с NO в присутствии кислорода

Ван (Wang) и коллеги [109] разработали быстрый и селективный флуоресцентный зонд на основе родамина для мониторинга эндогенного NO в живых клетках. В фосфатном буферном растворе для зонда **82** наблюдалась слабая флуоресценция на длине волны 581 нм, которая значительно усиливалась при добавлении NO. Как и в других случаях использования зондов с фенилендиаминового фрагмента, усиление флуоресценции было связано с подавлением PET эффекта при образовании триазольного цикла. Предел обнаружения NO зондом **82** был рассчитан и составил 68,2 нМ. Зонд **82** проявил высокую селективность и преимущественно реагировал с NO, но не реагировал другими многочисленными биологически значимыми молекулами, включая биотиолы, активные формы кислорода и азота, аскорбиновую кислоту, метилглиоксаль и ионы металлов. Более того, зонд **82** демонстрировал быструю реакцию на NO, и было обнаружено, что реакция между **82** и NO проходила в течение 2,5 мин в растворе PBS, что намного быстрее, чем у коммерчески доступного зонда DAF-2 [93].

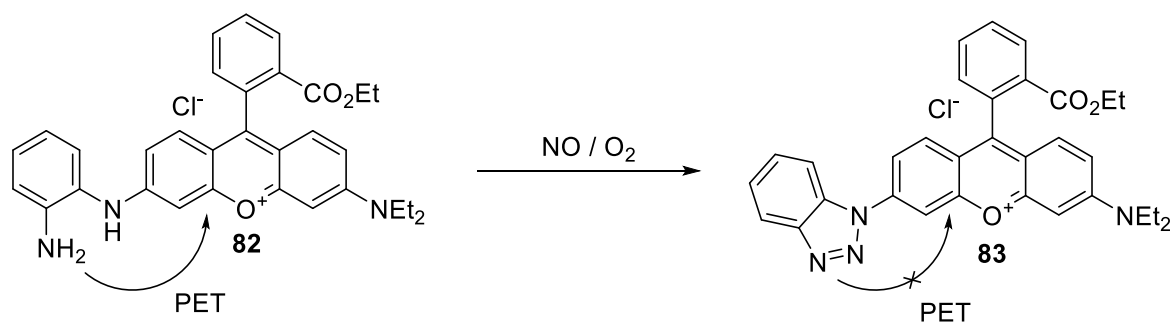


Схема 21. Структура зонда **82** и его взаимодействие с NO в присутствии кислорода

Вегесна (Vegesna) и коллеги [110] синтезировали водорастворимый флуоресцентный зонд на основе BODIPY для селективного обнаружения NO в живых клетках. Полосы поглощения и флуоресценции зонда **84** были равны 539 нм и 570 нм соответственно. Было также показано, что зонд **84** имеет слабую флуоресценцию с квантовым выходом флуоресценции 0,001 в PBS (pH 7,0). s Предел обнаружения NO зонда **84** составил 0,5 мкМ. Кроме того, зонд **84** также показал высокую специфичность по отношению к NO по сравнению с другими активными формами кислорода/азота, присутствующими в биологической среде, за исключением  $OSCl^-$ .

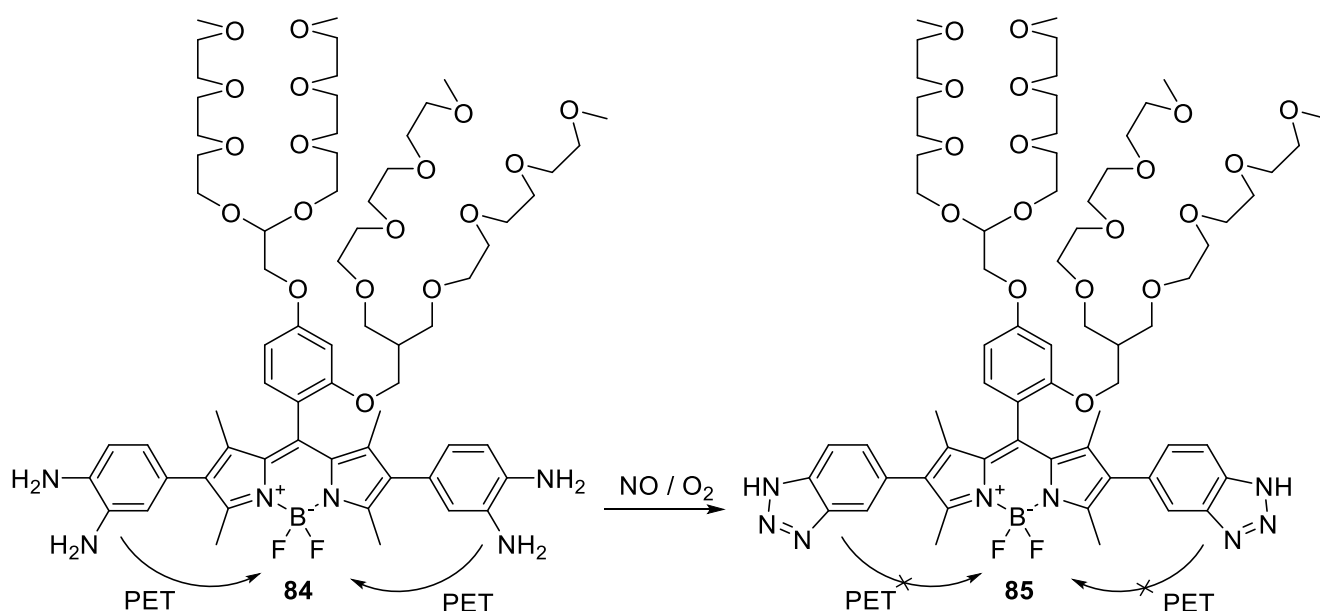


Схема 22. Структура зонда **87** и его взаимодействие с NO в присутствии кислорода

Сасаки (Sasaki) с коллегами разработали флуоресцентные зонды на основе трикарбоцианина и *o*-фенилендиаминового фрагмента (Схема 23), работающие в ближней инфракрасной области [108]. Было показано, что квантовый выход флуоресценции зондов DAC увеличивается приблизительно в 14 раз при взаимодействии с NO. Также было установлено, что триазольные формы полученных зондов имеют стабильную флуоресценцию в диапазоне pH от 2 до 12, тем самым они хорошо подходят для исследований в биологических условиях. Авторы установили, что скорость реакции полученных зондов с NO

приблизительно в 53 раза выше, чем у коммерчески доступного зонда DAF-2. Применимость полученных зондов была проверена на изолированной мышинной печени.

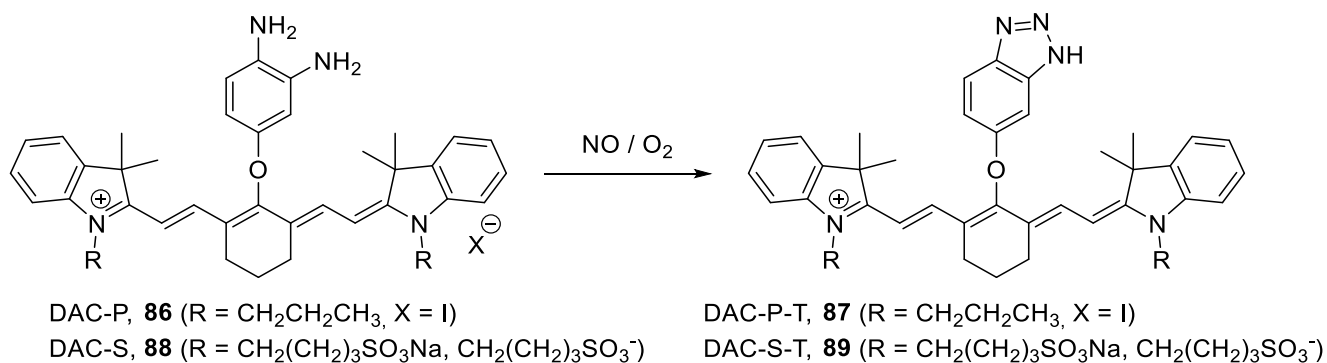


Схема 23. Структуры зондов DAC и их взаимодействие с NO в присутствии кислорода

Ю (Yu) с соавторами [111] сообщили о двухфотонно-индуцируемом флуоресцентном зонде Lyso-NINO (**90**) для визуализации лизосомального NO в живых клетках. Структура Lyso-NINO состоит из NO-захватывающего *o*-фенилендиамина, нацеливающего на лизосомы (аминоэтил)морфолина и эффективного двухфотонного флуорофора нафталимида. Зонд Lyso-NINO практически не проявлял флуоресценции в водном растворе (содержащем 20% ацетронитрила в качестве соразтворителя) при pH=5,0. При добавлении NO (5,0 экв.) появлялась сильная флуоресценция триазольного продукта при 530 нм. Было показано, что Lyso-NINO обладает слабой флуоресценцией в лизосомальных диапазонах pH (4,5–5,5), в то время как соответствующее триазольное производное проявляло сильную флуоресценцию при том же значении pH, что выгодно для применения в лизосомах. Кроме того, зонд Lyso-NINO продемонстрировал высокую селективность и хорошую чувствительность по отношению к NO по сравнению с различными активными формами кислорода. Предел обнаружения оксида азота (II) составил 5 нМ.

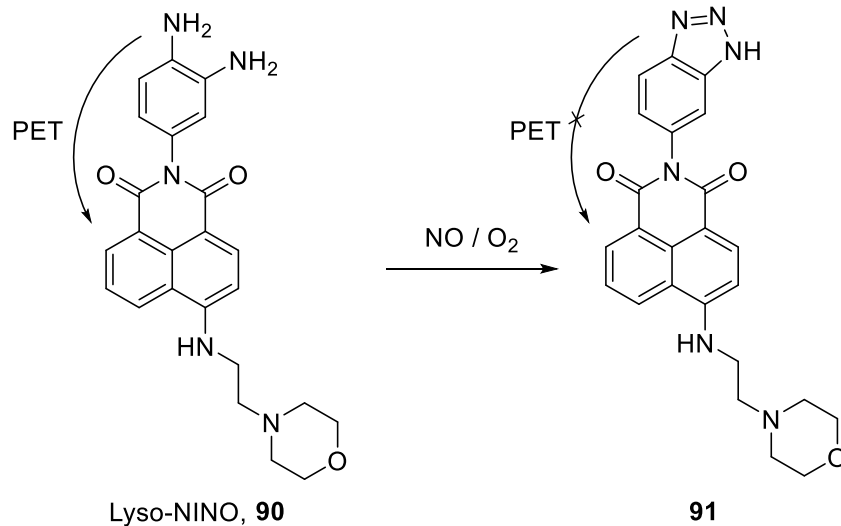


Схема 24. Структура зонда Lyso-NINO и его взаимодействие с NO в присутствии кислорода

Мао (Мао) и коллеги [112] разработали двух-фотонный флуоресцентный зонд NRNO (**92**) работающий в красной области на основе красителя нильский красный. Зонд **92** имел слабую флуоресценцию в фосфатном буфере (pH 7.4, 10% ДМФ в качестве со-растворителя). При реакции с NO наблюдалась сильная красная флуоресценция ( $\lambda_{\text{испускания}} = 650 \text{ нм}$ ) в результате подавления PET-эффекта. Было установлено, что NRNO имеет высокую скорость реакции с NO (достижение плато реакции в течение 180 с) и высокую чувствительность (порог определения 46 нМ). Основываясь на полученных результатах, предполагается, что NRNO можно использовать для определения физиологического уровня NO [113], а высокая скорость ответа позволит в реальном времени отслеживать оксид азота (II) в живых системах.

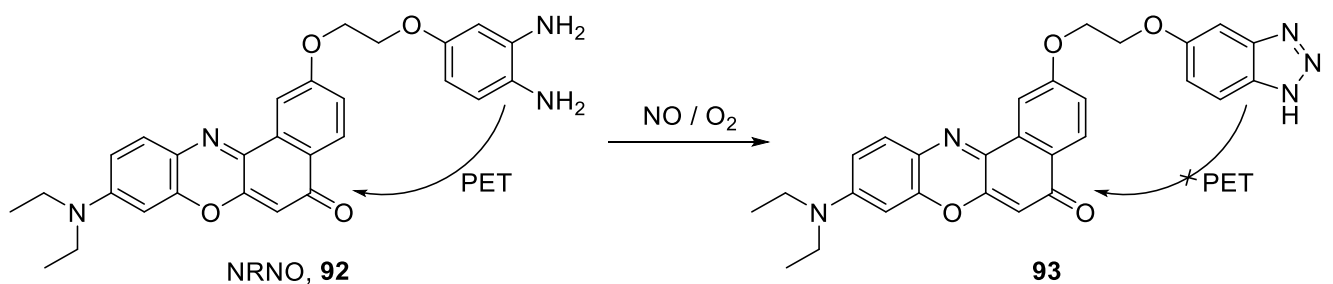


Схема 25. Структура зонда NRNO и его взаимодействие с NO в присутствии кислорода

Недавно, Венг (Weng) и коллеги [114] сообщили о зонде, основанном на остове бензо-1,2,5-тиадиазола для быстрого определения NO на модели болезни Паркинсона. Зонд BT-NH (**94**) имел слабую флуоресценцию ( $\lambda_{\text{испускания}} = 590 \text{ нм}$ ) в растворе HOAc-PBS (1:1), которая значительно усиливалась ( $\lambda_{\text{испускания}} = 620 \text{ нм}$ ) при добавлении раствора NO (5 экв.) при образовании триазольного продукта **95** (Схема 26). Квантовый выход флуоресценции увеличивался с 0,004 до 0,49. Порог определения приблизительно составил 6,96 нМ. Зонд BT-NH был успешно применен для визуализации эндогенного оксида азота (II) в мозговых тканях модели дрозофилы болезни Паркинсона.

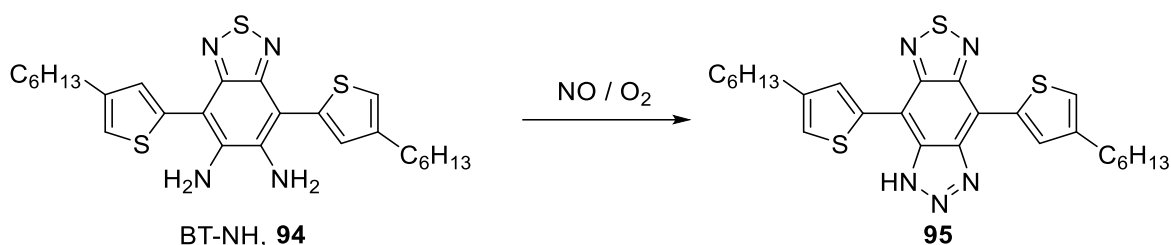


Схема 26. Структура зонда BT-NH (**94**) и его взаимодействие с NO в присутствии кислорода

Хотя ряд новых флуоресцентных зондов на основе *o*-фенилендиамина для обнаружения NO за последнее десятилетие значительно расширился, такие зонды все еще имеют некоторые ограничения, в частности, диаминофлуоресцеины (DAF) работают в узком диапазоне pH [115–117]. Зонды, содержащие диаминовые функциональные группы, подвержены влиянию как окислителей, так и антиоксидантов, вероятно, из-за электронообогащенной фенилендиаминовой группы [118–120]. Многочисленные конкурирующие и смешанные реакции могут стать серьезной проблемой при сравнении различных условий проведения исследований.

### 1.2.2.2 Флуоресцентные зонды на основе дигидропиридина

Чтобы преодолеть вышеупомянутые ограничения флуоресцентных зондов на основе *o*-фенилендиамина, был разработан ряд NO-чувствительных флуоресцентных зондов на основе эфиров Ганча. Известно [120;121], что эфиры Ганча, производные дигидропиридина, могут количественно реагировать с NO с

образованием соответствующих производных пиридина, причем реакция не зависит от присутствия кислорода.

Основываясь на таком механизме, Ма с коллегами [123] разработали флуоресцентный зонд на основе 7-метокси кумарина и эфира Ганча. Полоса поглощения полученного зонда **96** была расположена на 324 нм, в то время как полоса поглощения продукта взаимодействия с NO была незначительно смещена в красную область и находилась на 334 нм. Как и ожидали авторы, собственная флуоресценция зонда была минимальная ( $\phi_{\text{фл}} = 0,009$ ). После реакции с NO наблюдалось появление интенсивной полосы испускания на 450 нм и значительное увеличение квантового выхода флуоресценции ( $\phi_{\text{фл}} = 0,39$ ). Авторы также установили, что интенсивность флуоресценции линейно увеличивалась с увеличением концентрации NO. Проведенные тесты показали, что флуоресценция продукта ароматизации остается практически неизменной в диапазоне pH от 4 до 9. Порог определения NO зонда **96** составил 13 нМ. Также зонд показал высокую селективность по отношению к NO и не взаимодействовал с другими активными формами кислорода и азота, присутствующих в живом организме. Применимость зонда была изучена на клеточных культурах Raw 264.7 и клетках HeLa и было установлено, что **96** способен улавливать как эндогенный, так и экзогенный оксид азота (II).



Схема 27. Структура зонда **96** и его взаимодействие с NO

Позже, Ма [124] с соавторами модифицировали полученный ими ранее зонд **96**, включив в структуру этиленовый мостик между остовом кумарина и дигидропиридина. Как и ранее, зонд DHP-1 (**98**) практически не флуоресцировал в фосфатном буфере (pH = 7,4, 20% ДМСО). После добавления NO наблюдалась

сильная флуоресценция (80 кратное увеличение интенсивности, по сравнению с исходной флуоресценцией) на 392 нм, что соответствовало пиридиновому производному **99** (Схема 28). Предел обнаружения NO зонда DHP-1 составил 17 нМ. Также, зонд DHP-1 показал высокую селективность по отношению к NO и не взаимодействовал с другими активными формами кислорода и азота. Эксперименты по визуализации NO на клеточной культуре Raw 264.7 подтвердили способность DHP-1 визуализировать эндогенный оксид азота (II).



Схема 28. Структура зонда DHP-1 и его взаимодействие с NO

Ван (Wang) и коллеги [125] разработали водорастворимый флуоресцентный зонд на основе дигидропиридина для обнаружения NO в живых клетках. Зонд DHPS состоял из эфира Ганча, 7-метоксикумарина и двух солей четвертичного аммония (гидрофильные группы). Зонд DHPS (**100**) практически не флуоресцировал в фосфатном буфере (pH 7,4), но при добавлении NO наблюдалась интенсивная синяя флуоресценция ( $\lambda_{\text{излучения}} \sim 445$  нм), которая относится к соответствующему производному пиридина **101** (Схема 29). Зонд DHPS продемонстрировал хорошую селективность и чувствительность для обнаружения NO по сравнению с другими активными формами азота или кислорода, которые существуют в живых организмах. Рассчитанный порог определения NO DHPS составил 18,0 нМ. Опыты по визуализации *in vitro* показали, что зонд DHPS способен визуализировать эндогенный NO, генерируемый LPS (липополисахаридом), в клетках Raw 264.7.

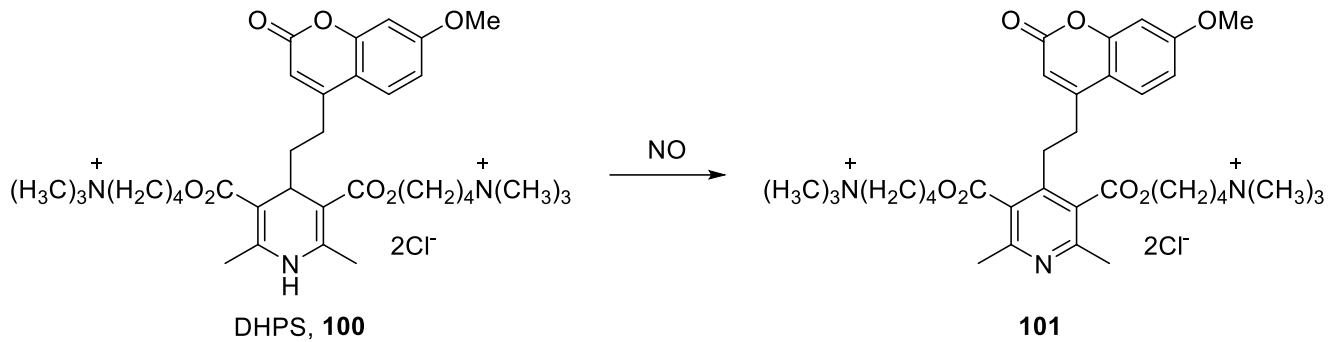


Схема 29. Структура зонда DHPS и его взаимодействие с NO

Гао (Gao) с коллегами [126] сообщили о зонде для обнаружения и визуализации NO, нацеленным на митохондрии. Структура зонда Mito-DHP (**102**) состоит из фрагментов и трифенилфосфония (митохондриально-нацеливающая группа) в остове красителя BODIPY. Зонд Mito-DHP проявлял слабую флуоресценцию при 525 нм в растворе PBS (pH 7,4). При реакции с избытком NO наблюдалось заметное усиление флуоресценции в результате подавления процесса PET, а соответствующий пиридиновый продукт (**103**) демонстрировал 75-кратное усиление флуоресценции по сравнению исходным соединением при 525 нм (Схема 30). Кроме того, Mito-DHP продемонстрировал высокую селективность к NO и не взаимодействовал с рядом активных форм кислорода/азота, высокую чувствительность (предел обнаружения 25 нМ), pH-стабильность и биосовместимость. Способность визуализировать экзогенный оксида азота (II) была подтверждена опытами на клетках HepG2, а способность визуализировать эндогенный NO на клетках Raw 264.7.

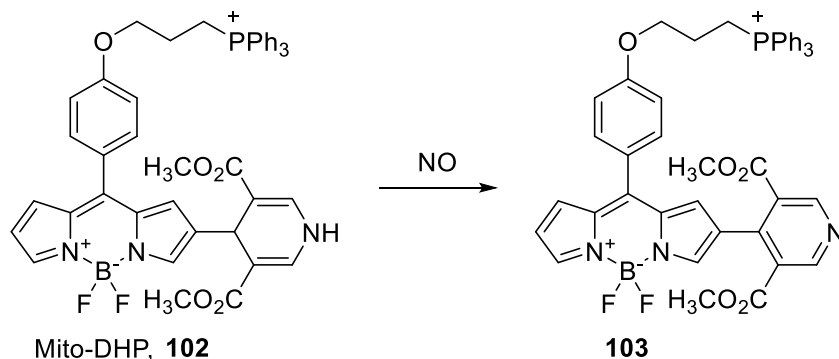


Схема 30. Структура зонда Mito-DHP и его взаимодействие с NO

В отличие от описанного выше механизма флуоресценции, Ли (Li) с коллегами [127] сообщили о зонде для биологической визуализации NO *in vivo* работающим с помощью Фёрстеровского переноса энергии (FRET). Зонд DHPFQ (104) состоит из типичной пары FRET-гасителя – флуорофора FITC (3',6'-дигидрокси-5-изотиоцианато-3H-спиро[изобензофуран-1,9'-ксантен]-3-она) и DABCYL (4-((4-(диметиламино)фенил)азо)бензойной кислоты). FITC и DABCYL были связаны через 1,4-дигидропиридин на расстоянии 10 нм. Зонд DHPFQ специфично реагировал с NO, в результате чего связь C-C между 1,4-дигидропиридином и бензильной группой расщеплялась с высоким выходом [122] (Схема 31). При обработке DHPFQ другими активными формами кислорода/азота не было обнаружено значительного разложения. Результаты показали, что зонд показывает высокую селективность по отношению к NO. Также DHPFQ был способен как визуализировать эндогенный оксида азота (II) в клетках Raw 264.7, так и NO на мышинной модели *in vivo*.

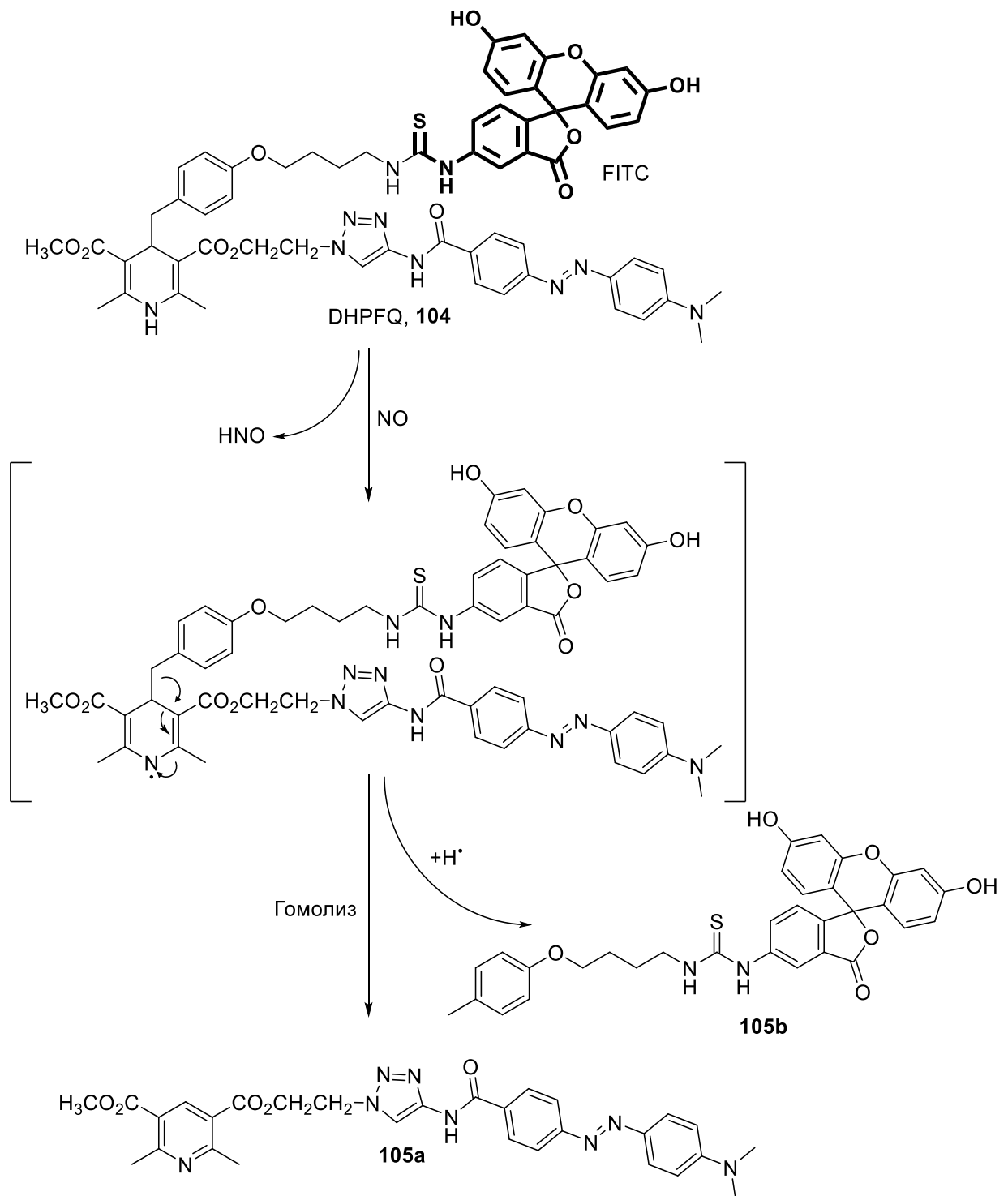


Схема 31. Механизм работы зонда DHPFQ

Стоит отметить, что флуоресцентные зонды на основе сложных эфиров Ганча могут напрямую реагировать с NO, а не с его окисленными формами, что упрощает определение оксида азота (II). Основным недостатком такого типа зондов является то, что реакция с NO зачастую слишком медленная. Поскольку NO имеет короткое

время жизни и быстро диффундирует в биологических системах [128–131] практическая применимость таких зондов ограничена.

### 1.2.2.3 Другие флуоресцентные зонды

Хотя большинство органических низкомолекулярных флуоресцентных зондов для NO основаны на фрагменте *o*-фенилендиамина и дигидропиридиновом остове, у них все еще существуют некоторые недостатки, такие как самоокисление, положительный ответ на дегидроаскорбиновую и аскорбиновую кислоту, длительное время отклика и так далее. В связи с этим, были предложены другие различные методы флуоресцентного определения оксида азота (II).

Один из подходов к получению NO-чувствительных флуоресцентных зондов основывается на реакции N-нитрозирования (Схема 13Е). Ислам (Islam) и коллеги синтезировали NO-чувствительный флуоресцентный зонд PyDA-NP (**106**) на основе пирена [132]. Для полученного соединения было характерно 66-кратное увеличение интенсивности флуоресценции при взаимодействии как с NO в присутствии кислорода, так и при взаимодействии с катионом нитрозония (Схема 32). Усиление флуоресценции в данном случае авторы связывают с внутримолекулярным переносом заряда (ICT). Зонд показал высокую чувствительность селективность по отношению к NO•/NO<sup>+</sup> и не реагировал с другими активными формами кислорода и азота. Рассчитанный порог определения NO•/NO<sup>+</sup> составил 2,13/0,307 пМ соответственно.

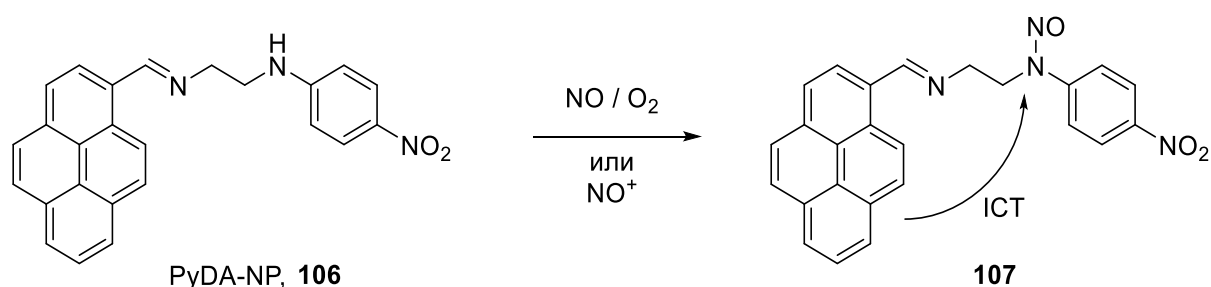


Схема 32. Структура зонда PyDA-NP и его взаимодействие с NO

Маити (Maiti) с соавторами представили флуоресцентный зонд PQPY (**108**) на основе фенантро[1,10-*d*]имидазола [133]. В данном случае усиление флуоресценции наблюдалось при N-нитрозировании имидазолиевого фрагмента в

присутствии кислорода, в следствие чего происходил внутримолекулярный перенос заряда с остова фенантролина на остов пиридоксаля (Схема 33). PQPY показал высокую селективность по отношению к NO и не взаимодействовал с другими активными формами кислорода и азота, а также с различными катионами металлов. Флуоресценция продукта **109** взаимодействия с NO оставалась неизменной в диапазоне биологического pH (от 4 до 9). Порог определения оксида азота (II) составил 78 нМ. Применимость для биологических исследований была подтверждена опытами *in vitro* на клетках HepG2.

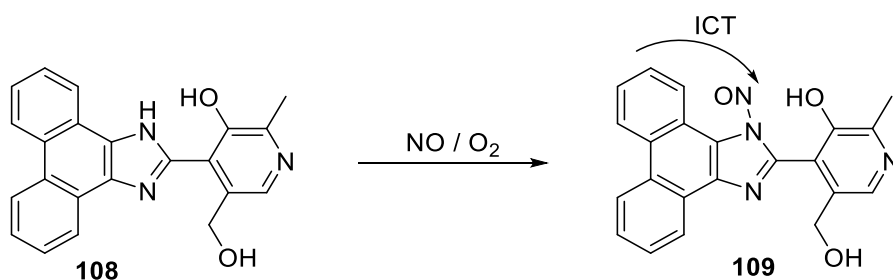


Схема 33. Структура зонда PQPY и его взаимодействие с NO

Мао с коллегами [134] разработали флуоресцентный зонд, работающий в области ближнего инфракрасного диапазона на основе кремний-родамина для визуализации NO *in vitro* и *in vivo*. Зонд SiRNO (**110**) состоял из производного Si-родамина и фрагмента 4-метокси-N-метиланилина. При N-нитрозировании метиламиногруппы NO флуоресценция зонда **110** усиливалась за счет подавления процесса PET. Увеличение интенсивности флуоресценции зонда SiRNO при реакции с избытком NO в зависимости от времени показало, что интенсивность флуоресценции при 672 нм (фосфатный буфер, pH = 7,4, 0,5% ДМСО) достигала плато всего за 90 секунд с 81-кратным усилением эмиссии. Рассчитанный предел обнаружения NO составил 14 нМ. SiRNO показал высокую специфичность по отношению к NO и не реагировал с другими различными биомолекулами и активными формами кислорода и азота. Кроме того, было подтверждено, что зонд нечувствителен к pH в диапазоне 5,5–8,0, обладает низкой цитотоксичностью и локализован в лизосомах. Применимость SiRNO для визуализации экзогенного NO была подтверждена на клетках HeLa, а для эндогенного – на клетках Raw 264.7.

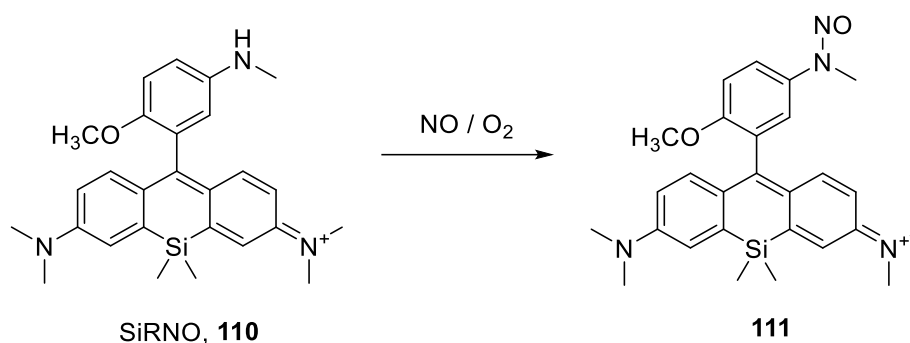


Схема 34. Структура зонда SiRNO и его взаимодействие с NO в присутствии кислорода

Другим способом флуоресцентного определения NO является реакция зонда на основе тиосемикарбазида с его дальнейшим превращением в соответствующий 1,3,4-оксодиазол (Схема 13D). Ислам (Islam) с коллегами [135] синтезировали флуоресцентный зонд QT<sub>490</sub> (**112**) на основе остовов 8-гидроксихинолина и тиосемикарбазида. В результате взаимодействия с NO в присутствии кислорода, интенсивность флуоресценции продукта **113** возросла в 27 раз (Схема 35). Также зонд показал высокую чувствительность к NO, по сравнению с другими активным формам кислорода и азота, метилглиоксалем и глутатионом, на которые зонд не реагировал. Порог определения NO составил 58 нМ. Авторы подтвердили способность зонда детектировать как экзогенный, так и эндогенный оксида азота (II) с помощью экспериментов на клетках Raw 264.7 и клеточной линии HeLa.

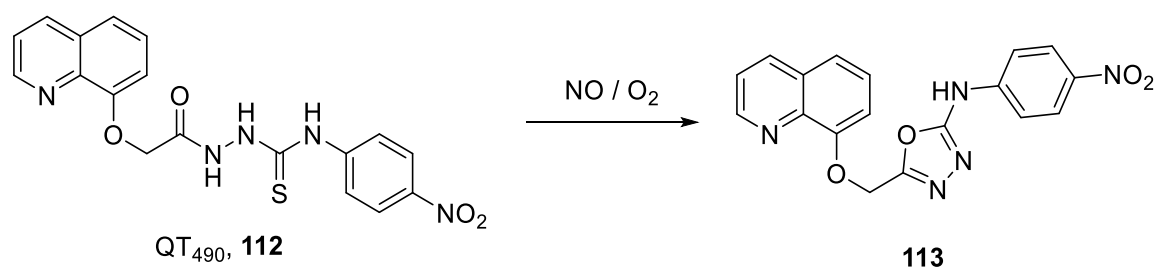


Схема 35. Структура зонда QT<sub>490</sub> и его взаимодействие с NO в присутствии кислорода

Хан (Han) с коллегами [136] синтезировали похожий NO-чувствительный зонд FP-NO (**114**) на основе кумарина. Слабо флуоресцирующий FP-NO реагировал с NO в присутствии кислорода превращаясь в интенсивно флуоресцирующий продукт **115** (5-ти кратное увеличение интенсивности) (Схема 36). Рассчитанный

порог определения NO составил 47,6 нМ. Также зонд показал высокую чувствительность к NO по сравнению к другим активным формам кислорода и азота, а также TEMPO. Авторы успешно подтвердили способность зонда детектировать экзогенный и эндогенный NO на модели рыбок Данио-рерио.

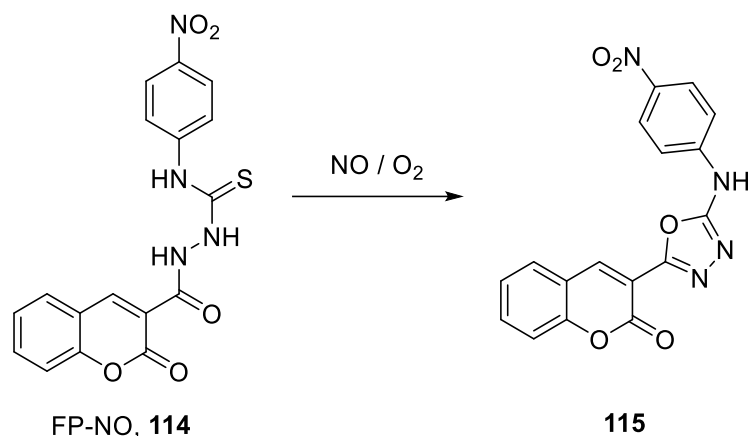


Схема 36. Структура зонда FP-NO и его взаимодействие с NO в присутствии кислорода

Еще одним методом определения NO является реакция диазотирования, с последующей внутримолекулярной реакцией азосочетания (Схема 13С). На основе этого метода Ян (Yang) с коллегами [137] синтезировали зонд NO<sub>550</sub> (**116**). Исследования взаимодействия зонда с NO в фосфатном буфере (20% ДМСО) показали, что NO<sub>550</sub> практически не флуоресцирует, в то время как при добавлении источника NO в присутствии кислорода образуется интенсивно флуоресцирующий продукт AZO<sub>550</sub> (**117**) (1500 кратное увеличение интенсивности) (Схема 37). Флуоресценция продукта не зависела от pH в диапазоне от 4,5 до 9. Авторами был проверен широкий спектр конкурирующих соединений (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ClO<sup>-</sup>, O<sub>3</sub> и др., вплоть до 1000 кратного избытка) с которыми NO<sub>550</sub> не взаимодействовал.

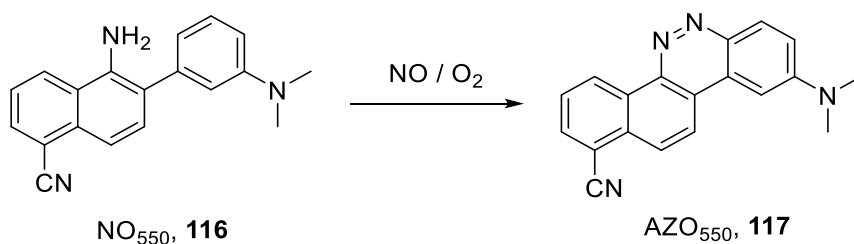


Схема 37. Структура зонда NO<sub>550</sub> и его взаимодействие с NO в присутствии кислорода

Дай (Dai) и коллеги [138] получили зонд NO-QA5 (**118**) на основе 5-аминохинолина. Авторы отмечают, что в результате взаимодействия с NO в присутствии кислорода образуются два изомера, среди которых увеличение интенсивности флуоресценции наблюдалось для *para*-изомера (**119a**) в результате внутримолекулярного переноса заряда, в то время как *o*-изомер (**119b**) практически не флуоресцирует как и исходный зонд (Схема 38). Зонд проявил высокую скорость отклика (в течение ~20 с) и высокую специфичность к NO. Порог определения NO составил 15 нМ. Также авторы заявили, что данный зонд способен детектировать наличие нитрит аниона, однако такой вывод вызывает сомнения, поскольку проводимые ими эксперименты выполнялись в растворе зонда с pH = 0.

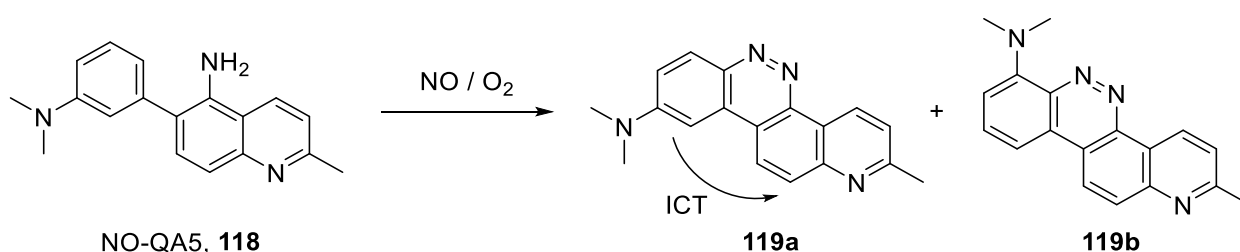


Схема 38. Структура зонда NO-QA5 и его взаимодействие с NO в присутствии кислорода

Реакция дезаминирования также может лежать в основе включения флуоресценции зонда (Схема 13F). Бельтран (Beltrán) и коллеги [139] синтезировали ряд триарилпирриловых солей (**120a-d**). Среди полученных соединений, зонд **120c** обладал наибольшим увеличением интенсивности флуоресценции (83 кратное) при реакции с NO в присутствии кислорода, а предел обнаружения NO составил 2,1 мкМ (Схема 39). Все полученные соединения обладали высокой селективностью по отношению к NO и не реагировали с другими активными формами кислорода и азота, а также с аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислотами. Применимость соединений была показана на клетках Raw 264.7.

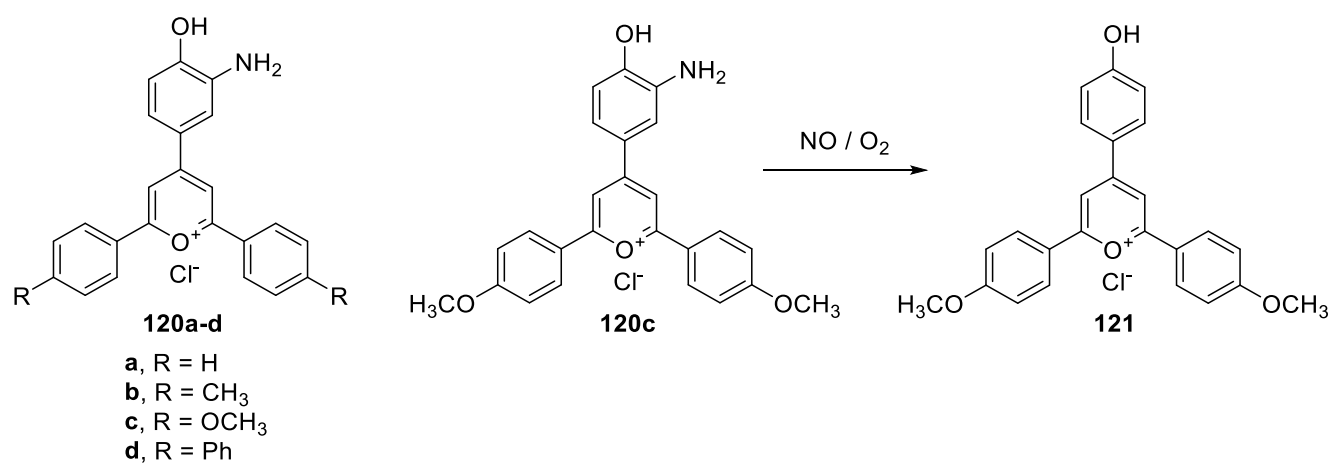


Схема 39. Структуры зондов **120a-d**. Взаимодействие **120c** с *NO* в присутствии кислорода

### Вывод по обзору литературы

Развитие подходов к получению различных фотоактивируемых доноров оксида азота (II) прошло огромный путь начиная от соединений, работающих только при облучении ультрафиолетовым светом (например, BNN), до соединений фотоактивация которых возможна с помощью малоинвазивного красного света. Несмотря на это, недостатком большого числа соединений является то, что для их получения затрачивается большое количество времени, сил и средств, поскольку зачастую синтез таких соединений требует большого количества стадий, включающих реакции кросс-сочетания (реакции Сузуки, Соногаширы, Бухвальда-Хартвига), введение и снятие защитных групп, а также реакции конденсации и восстановления. В связи с этим существует необходимость в разработке упрощенных подходов к их получению с использованием как можно меньшего количества этапов и простых реактивов.

В свою очередь, переход от классических методов определения оксида азота (II) таких как ЭПР спектроскопия, хемилюминисцентный анализ, анализ с использованием реагента Грисса к флуоресцентной микроскопии с использованием NO-чувствительных зондов позволил исследователям наблюдать и детектировать NO в режиме реального времени *in vitro* и *in vivo*, что было продемонстрировано большим числом работ. Более того, такие зонды как DAQ и DAF-2 к настоящему времени уже широко вошли в арсенал исследователей и стали коммерчески доступны. Однако несмотря на успехи этой области, ограничениями зондов по-прежнему зачастую является их подверженность окислению, возможное взаимодействие с различными соединениями, присутствующими в клетках (глутатион, аскорбиновая кислота), «утекание» из клеток, а также растворимость, в связи с чем поиск новых зондов, основанных на различных красителях, по-прежнему является актуальной задачей.

## Глава 2. Получение производных 9-акридона, содержащих *o*-диаминовый фрагмент, в качестве потенциальных NO-чувствительных флуоресцентных зондов (обсуждение результатов)

Как уже упоминалось в обзоре литературы, 1,2-диаминоантрахинон (**DAQ**) является коммерчески доступным и дешевым NO-чувствительным зондом, интенсивность флуоресценции которого значительно увеличивается при реакции с NO [140; 141]. Низкая растворимость **DAQ** и продукта его взаимодействия с NO **DAQ-TZ** в воде и в большинстве органических растворителей, сложность модификации и низкая фотостабильность являются недостатками использования данного зонда. Мы предположили, что использование остова 9-акридона, структурно похожего на антрахинон, поможет обойти эти ограничения зонда **DAQ**.

К настоящему моменту было получено и описано два NO-чувствительных зонда на основе остова акридина [142; 143] (Рисунок 19). Классическим и наиболее доступным методом получения акридонов является реакция внутримолекулярной конденсации *N*-арил-*орто*-аминобензойных кислот [144]. В дальнейшем, полученные акридоны могут быть легко модифицированы по N(10)-атому [145; 146]. Мы предположили, что включение фрагмента *o*-диамина вместе с карбоксильной группой улучшит растворимость в воде.

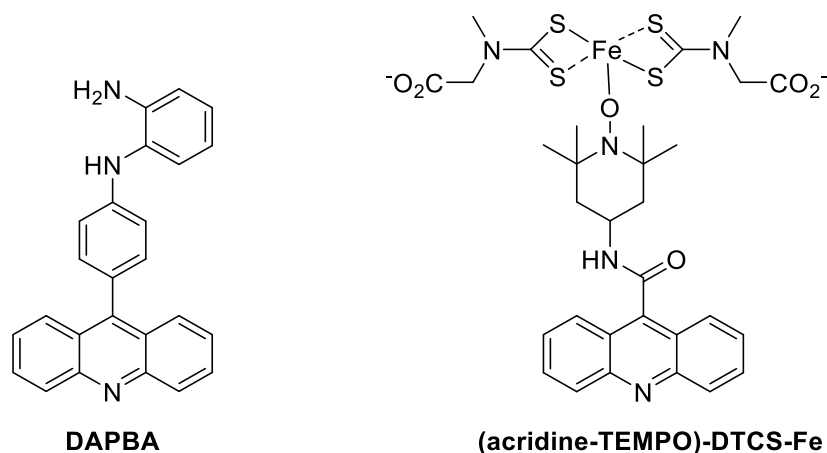


Рисунок 19. Примеры NO-чувствительных зондов на основе 9-акридона

В качестве исходных соединений нами были выбраны 4-карбокси-9(10*H*)акридон (**122**) и 9-акридон (**123**), которые были получены по литературным методикам [147] и [148], соответственно. Предполагалось, что последовательными

реакциями нитрования и восстановления удастся сконструировать *o*-диаминовый фрагмент в остове 9-акридона.

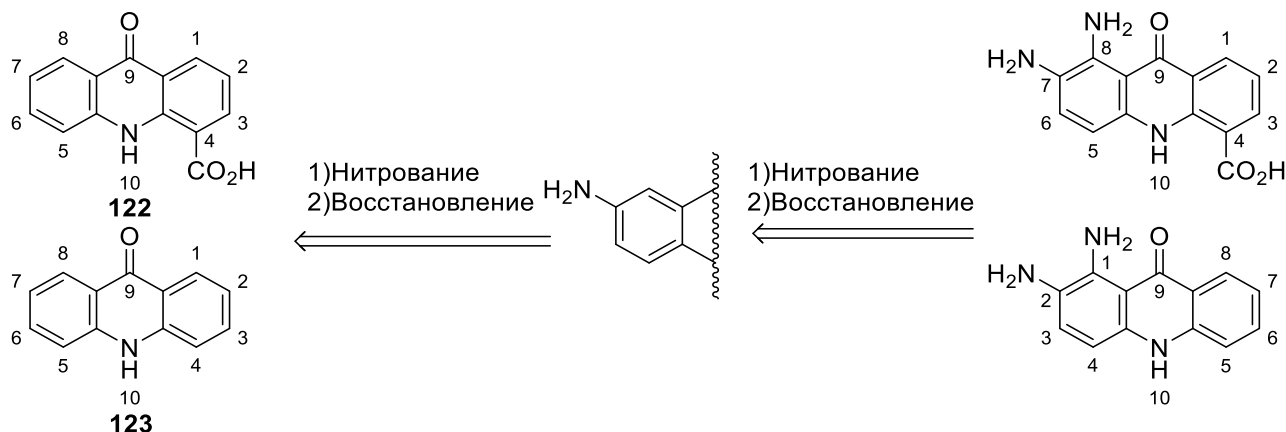


Рисунок 20. Структуры 4-акрбокси-9(10H)акридона (**122**), 9-акридона (**123**) и ретросинтетический подход к целевым соединениям

## 2.1 Синтез 7,8-диамино-4-карбокسي-10-метил-9(10H)акридона

Акридоны **122** и **123** плохо растворяются во многих органических растворителях, в связи с чем зачастую проводят реакции их *N*-алкирования, что значительно улучшает растворимость. Поэтому на первом этапе был получен эфир **124**, путем двойного метилирования **122** йодистым метилом в присутствии гидрида натрия в ДМСО (Схема 40).

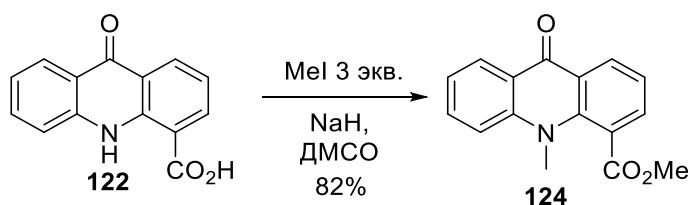


Схема 40

На следующем этапе эфир **124** нитровали концентрированной азотной кислотой в ледяной уксусной кислоте при нагревании. В результате реакции получали основной 7-нитро изомер (**125**), что согласуется с ориентирующей способностью функциональных групп замещаемого кольца, а также наличием сигнала водорода в положении 8 в спектре  $^1\text{H}$  ЯМР на 8,93 м.д. с  $J = 2,84$  Гц, что соответствует мета-взаимодействию водородов 8 и 6. Также в смеси были получены 2-нитро изомер и следовые количества 5-нитро изомера.

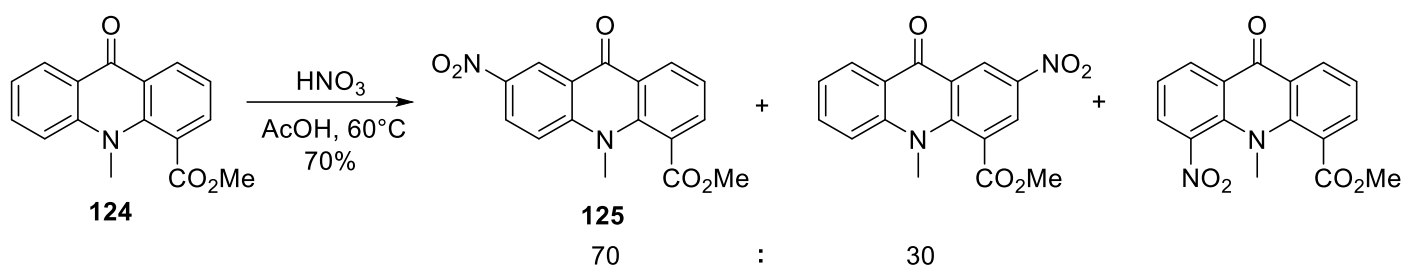


Схема 41

Полученную смесь нитропроизводных восстанавливали с помощью гидразин гидрата в этаноле в присутствии палладия на угле. После обработки реакционной смеси удалось выделить 7-амино производное **126**, содержащее незначительное количество примесей.

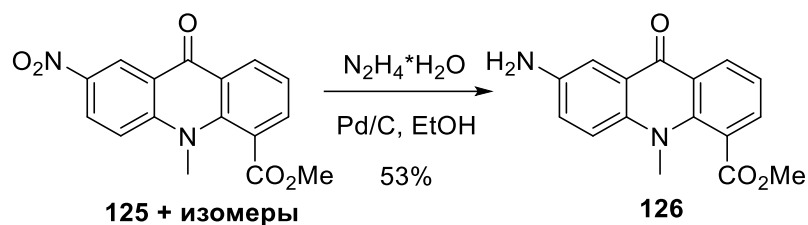


Схема 42

Далее аминогруппу соединения **126** защищали с помощью уксусного ангидрида в уксусной кислоте, с последующим *one pot* нитрованием, путем добавления концентрированной азотной кислоты к реакционной смеси. Выход продуктов за две стадии составил 75%, в составе которых основным продуктом являлось соединение **127** с небольшим количеством примесей. Получение продукта нитрования в 8 положение было подтверждено спектром  $^1\text{H}$  ЯМР, согласно которому присутствовали дублеты от водородов в положениях 5 и 6 с  $J = 7,8$  Гц, что соответствует замещению именно по положению 8. Если же нитрование происходило бы по положению 2, в спектре  $^1\text{H}$  ЯМР также наблюдались бы дублеты, однако величины их константа не превышали бы 3 Гц, чего в спектрах не наблюдалось.

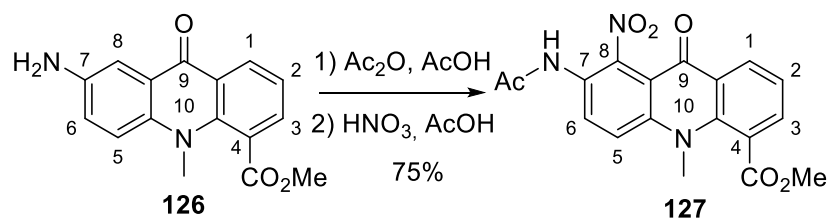


Схема 43

Полученное соединение **127** подвергали гидролизу при кипячении в воде в присутствии 4N NaOH. На этом этапе при осаждении кислоты путем подкисления реакционной смеси удалось выделить чистый продукт **128**, который затем восстанавливали раннее использованной системой  $N_2H_4 \cdot H_2O$  в присутствии Pd/C и получали целевой диамин **129**.

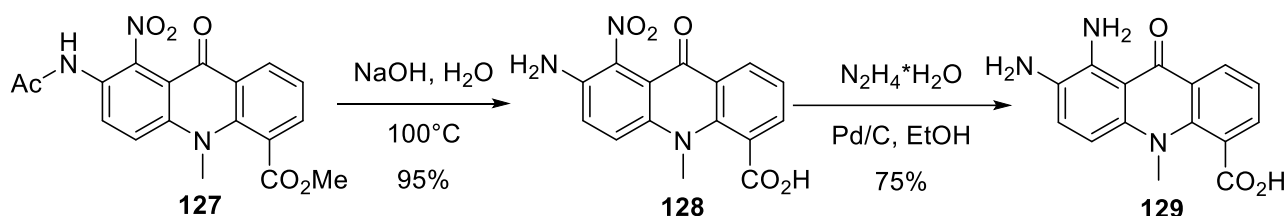


Схема 44

## 2.2 Синтез 1,2-диамино-10-(карбоксиметил)-9(10H)-акридона

В случае акридона **123** в качестве алкилирующего реагента использовали этиловый эфир бромуксусной кислоты в присутствии гидрида натрия в ДМФА. В результате реакции был получен эфир **130**

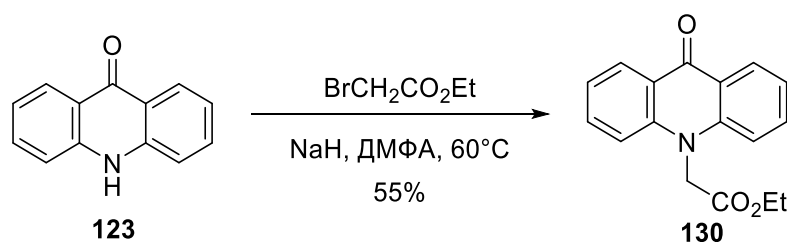


Схема 45

Затем нитровали **130** концентрированной азотной кислотой в ледяной уксусной кислоте в присутствии уксусного ангидрида и получали 2-нитро акридон **131** с количественным выходом.

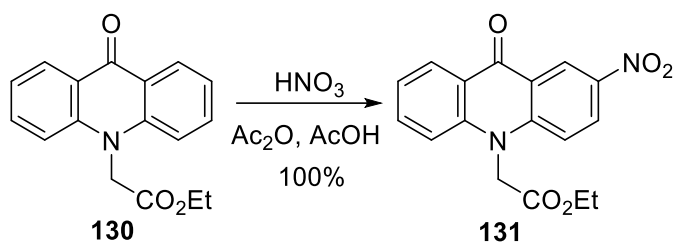


Схема 46

Нитрогруппу восстанавливали с помощью муравьиной кислоты в присутствии триэтиламина и Pd/C в этаноле. При использовании гидразин гидрата в качестве восстановителя в результате реакции в качестве основных продуктов получали гидразиды – продукт замещения по карбоксильной группе.

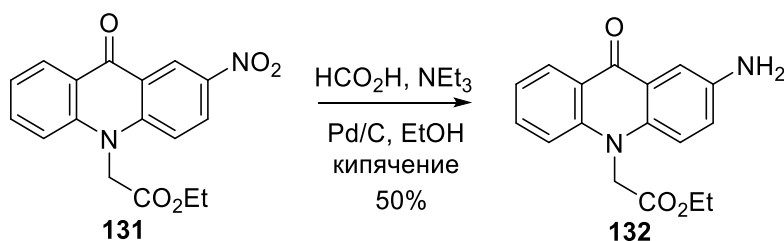


Схема 47

Защита аминогруппы с помощью уксусного ангидрида и дальнейшее нитрование в раннее описанных условиях привели к получению соединения **133** с выходом 23% за две стадии. Региоселективность нитрования была также подтверждена с помощью  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопии. В результате реакции в спектре ЯМР исчез сигнал водорода в положении 1 (7,51 м.д.) и появился сигнал атома водорода NH-группы (9,10 м.д.). Также наблюдались сигналы от атомов водорода в положениях 3 и 4 с константой взаимодействия  $J = 7,9$  Гц, что подтверждает получение соединения **133**.

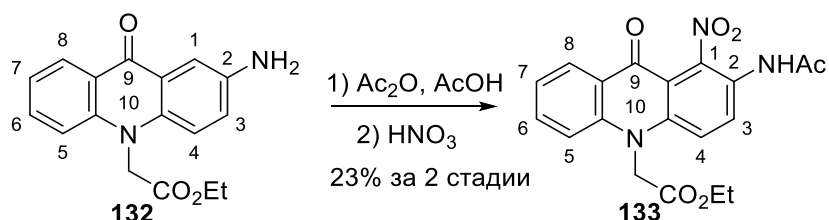


Схема 48

Последовательный гидролиз 4N NaOH и восстановление муравьиной кислотой привели к получению целевого акридона **135**. Согласно спектрам ЯМР  $^1\text{H}$ , после

гидролиза исчезли сигналы, соответствующие этильной и ацильной группам. После реакции восстановления в спектрах не наблюдались сигналы от амино-групп вследствие быстрого обмена с растворителем, однако общий сдвиг сигналов в область сильного поля свидетельствует о получении целевого соединения **135**.

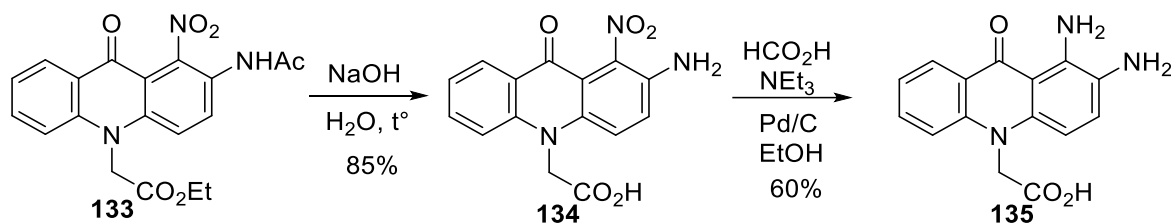


Схема 49

## 2.2 Спектральные характеристики и определение NO

Полученные диаминоакридоны **129** и **135** были охарактеризованы методами UV-Vis и флуоресцентной спектроскопией, а также была изучена их способность взаимодействовать с оксидом азота (II) с усилением флуоресценции.

На рисунке 21 показаны спектры поглощения **135** в 1% водном растворе ДМСО до и после реакции с избытком диэтиламмониевой соли NONO-ат диэтиламина (NONOate) в течение 10 минут. Видно, что зонд **135** обладает низким поглощением в видимой области и спектральные изменения после взаимодействия с NONOate весьма незначительны. Также не наблюдалось значительных изменений положения максимума флуоресценции и ее интенсивности (Рисунок 21B). Более того, попытки получить триазольное производное путем диазотирования соединения **135** не увенчались успехом, и были получены только сложные реакционные смеси (Схема 50).

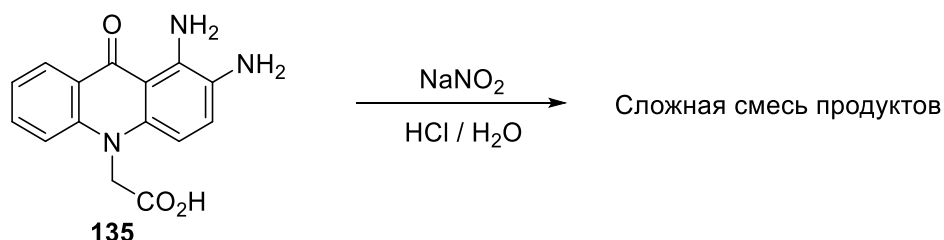


Схема 50

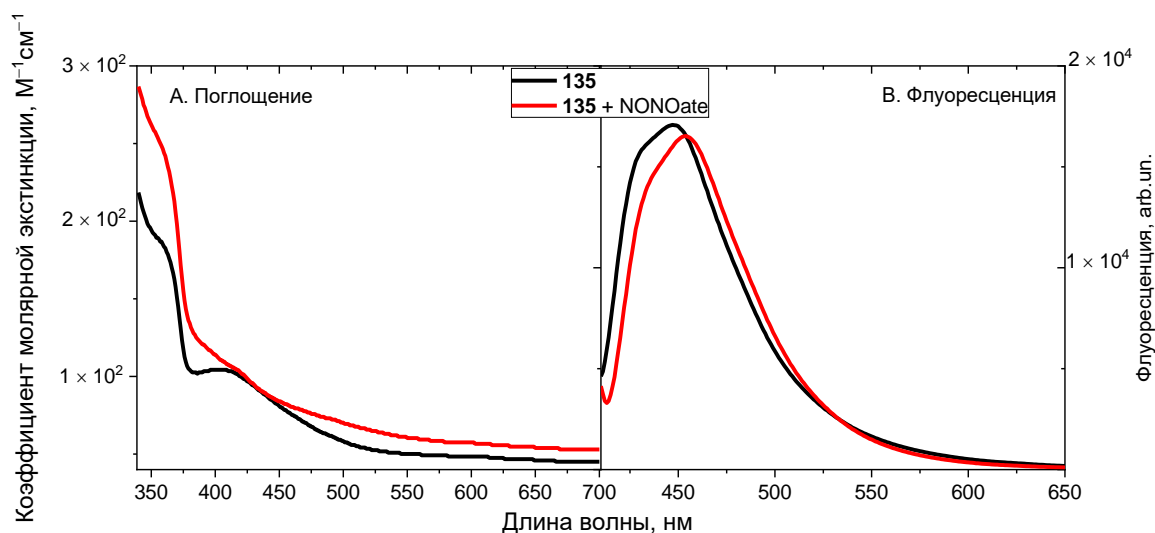


Рисунок 21. Спектры поглощения (А) и флуоресценции (В) соединения **135** до и после реакции с избытком NONOate. Растворитель: вода + 1% ДМСО. Длина волны возбуждения 405 нм

Максимум поглощения соединения **129** находится на 450 нм, что попадает в самый распространенный диапазон возбуждения современных флуоресцентных микроскопов (450 нм - 490 нм). После добавления NONOate кривая поглощения сильно изменилась, что указывает на произошедшие структурные изменения (Рисунок 22А). Как показано на рисунке 22В интенсивность флуоресценции увеличилась в 5 раз после реакции с оксидом азота, причем максимум флуоресценции сдвинулся с 564 нм на 495 нм. Триазол **129а**, который был получен диазотированием соединения **129**, имеет более слабое поглощение в видимой области и 7,6 кратное увеличение квантового выхода флуоресценции по сравнению с диамином **129** (Таблица 1). К сожалению, молекулярный ион  $[129a]^+$  не удалось уловить с помощью HRMS, вероятно из-за быстрого разложения с выделением молекулы  $N_2$ . Поэтому был получен метилированный аналог **129b**, который успешно был охарактеризован с помощью HRMS (Схема 51).

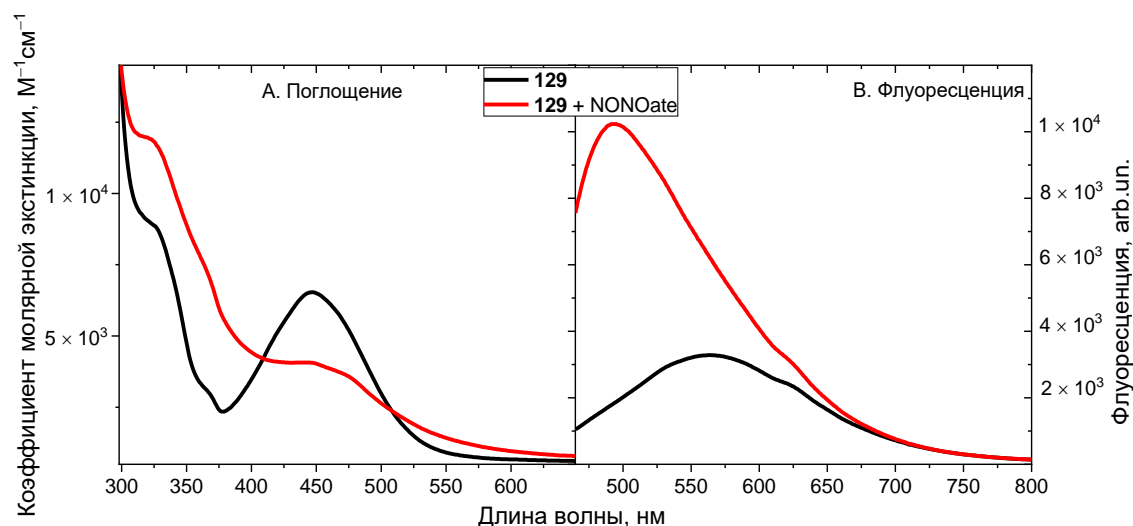


Рисунок 22. Спектры поглощения (А) и флуоресценции (В) соединения **129** до и после реакции с избытком NONOate. Растворитель: вода + 1% ДМСО. Длина волны возбуждения 450 нм

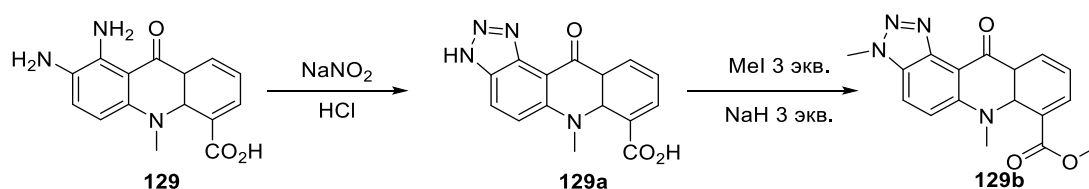


Схема 51

Таблица 1. Спектральные характеристики **129** и **129a**

	Максимум поглощения $\lambda_{\max}$	Коэффициент молярной экстинкции $\epsilon(\lambda_{\max})$	Максимум испускания	Квантовый выход флуоресценции
<b>129</b>	447 nm	$6500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	564 nm	$0.19 \times 10^{-2}$
<b>129a</b>	440 nm	$4100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	494 nm	$1.45 \times 10^{-2}$

### 2.3 Визуализация NO в клетках Jurkat

Возможность использования зонда **129** для визуализации NO в живых клетках была исследована на клеточной линии Jurkat. К культурной линии был добавлен 10  $\mu\text{M}$  раствор **129** в воде + 1% ДМСО. Спустя 15 минут, клетки были исследованы с помощью флуоресцентного микроскопа, с использованием стандартного набора фильтров (возбуждение: 450-490 нм; испускание >515 нм).

На рисунке 23А показано изображение клеток Jurkat с яркой флуоресценцией, что свидетельствует о том, что **129** проник внутрь клеток. Распределение флуоресценции в клетках было неоднородно, что видно на рисунке 23В. После добавления 6 мМ NONOate, наблюдалось усиление флуоресценции; на рисунке 23С показана та же клетка спустя 3 минуты. Это подтверждает, что **129** взаимодействует с NO также и внутри клеток.

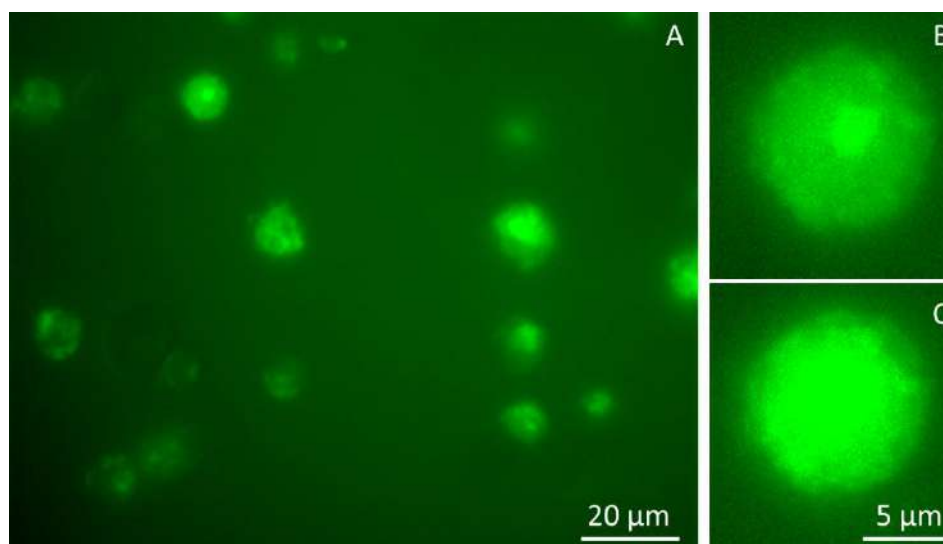


Рисунок 23. (А) Флуоресценция клеток Jurkat, инкубированных **129** в течение 15 минут. (В) Неоднородное распределение флуоресценции. (С) Усиление флуоресценции через 3 минуты после добавления NONOate.

В результате работы был разработан метод получения диамино-замещенных акридонов и получен 7,8-диамино-4-карбокси-10-метил-9-акридон – NO-чувствительный флуоресцентный зонд, спектроскопические свойства которого попадают в самый распространенный диапазон работы современных флуоресцентных микроскопов. Зонд **129** успешно взаимодействует с оксидом азота (II) с усилением флуоресценции. Кроме того, зонд способен улавливать NO в клетках Jurkat. В отличие от коммерческого зонда **DAQ**, **129** способен растворяться в водных средах. Кроме того, предложенный синтетический подход позволяет проводить различные модификации атома азота в 10 положении [149].

Однако по сравнению с такими коммерчески доступными зондами как **DAF-2** ( $QY_{\text{фл. триазольной формы}} = 0,92$  [93]), **DAR-2** ( $QY_{\text{фл. триазольной формы}}$

= 0,92 [99]) квантовый выход триазольной формы **129** составляет всего лишь 0,0145, в связи с чем дальнейшая работа в этом направлении не проводилась.

### Глава 3. Получение производных BODIPY и aza-BODIPY, содержащих стерически напряженный нитро-ароматический фрагмент и *N*-нитрозо фрагмент в качестве потенциальных фотоактивируемых доноров оксида азота (II) (обсуждение результатов)

Среди описанных в литературном обзоре подходов к дизайну фотоактивируемых доноров NO наиболее распространенными являются подходы с использованием *N*-нитрозо соединений, наряду с набирающим популярность в последние годы подходом с использованием фотоактивируемой нитро-нитритной перегруппировки стерически напряженных нитро-ароматических соединений. Поскольку использование ультрафиолетового света для активации доноров нежелательно в связи с вызываемыми побочными процессами, длину волны активации смещают в видимую область путем включения фрагментов, выделяющих NO, в остов красителя. Стоит отметить, что получение фотоактивируемых доноров NO зачастую представляет собой многостадийные синтезы, что значительно усложняет их получение и уменьшает общий выход целевых соединений. В связи с чем актуальной задачей является упрощение подходов к получению доноров и уменьшение числа стадий синтеза.

Одним из часто используемых красителей в подобных работах являются красители BODIPY ( $\lambda_{\text{abs}} = 500\text{-}600$  нм), а в последнее время и их аналоги aza-BODIPY ( $\lambda_{\text{abs}} = 600\text{-}700$  нм).



Рисунок 24. Структуры остовов BODIPY и aza-BODIPY

Изучению бор-дипиррометен (4,4-дифтор-4-бора-3а, 4а-диаза-S-индацен или BODIPY) красителей было посвящено огромное количество работ за последние 20

лет. BODIPY обладают рядом уникальных фотохимических свойств, одними из которых является узкая полоса поглощения с настраиваемой длиной волны и высокий квантовый выход флуоресценции. Благодаря своим свойствам использование этих красителей является перспективным во множестве областей – от оптоэлектроники до различных биологических исследований [150]. Можно отметить также высокую биосовместимость BODIPY. В свою очередь, соединения на основе aza-BODIPY представляют особый интерес, поскольку их длина волны поглощения находится в ближней инфракрасной области.

Одним из основных способов получения мезо-замещенных BODIPY является реакция конденсации альдегидов или хлорангидридов с пирролами, с дальнейшим окислением и взаимодействием с эфиром трехфтористого бора в присутствии органического основания (Схема 52). Недостатком этого метода является то, что BODIPY зачастую получают с маленьким выходом (10-30 %).

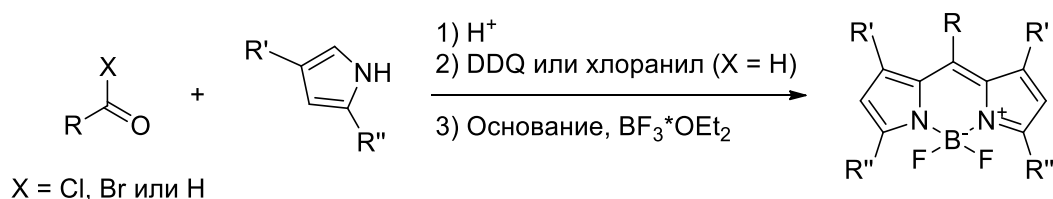


Схема 52. Схема синтеза BODIPY

Удобным способом получения симметричных aza-BODIPY является нагревание продуктов реакции Михаэля различных халконов с нитрометаном с избытком ацетата аммония и дальнейшей реакцией с эфиром трехфтористого бора в присутствии органического основания (Схема 53).

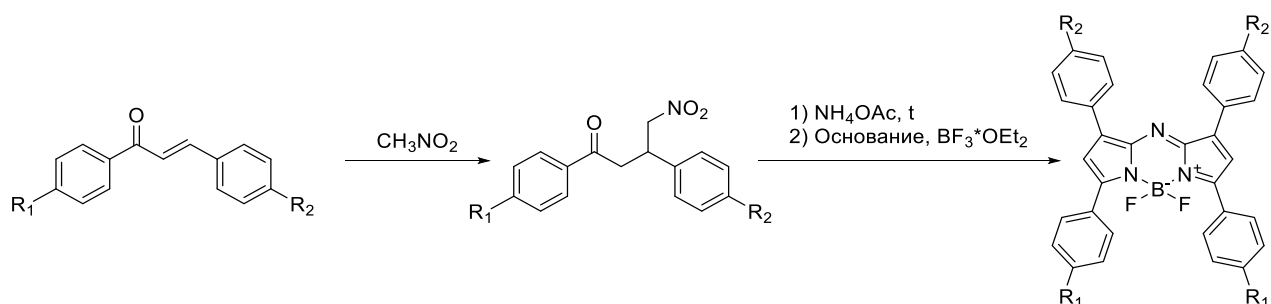


Схема 53. Схема синтеза aza-BODIPY

### 3.1 Получение *мезо*-замещенных производных BODIPY

В литературном обзоре были описаны некоторые примеры сочетания красителей (родамина, флуоресцеина, BODIPY) [57–62] и напряженного стерически нитро-ароматического фрагмента. Однако в их структуре NO-высвобождающий фрагмент и остов красителя были разделены различными линкерами. Было предположено, что, используя ароматические альдегиды с напряженными нитрогруппами можно получить различные BODIPY, в которых NO-высвобождающий фрагмент будет напрямую введен в ядро хромофора без использования линкеров. Для получения таких BODIPY были выбраны 3,5-диметил-4-нитробензальдегид и 3-трифторметил-4-нитробензальдегид.

Соединения **136** и **137** получали путем конденсации соответствующих альдегидов с 2,4-диметил пирролом в присутствии каталитического количества трифторуксусной кислоты, окисления промежуточных продуктов с помощью DDQ и реакции с эфиром трехфтористого бора в присутствии триэтиламина. Целевые продукты выделяли с помощью колоночной хроматографии, и выходы соединений составили 20% и 12% соответственно (Схема 54).

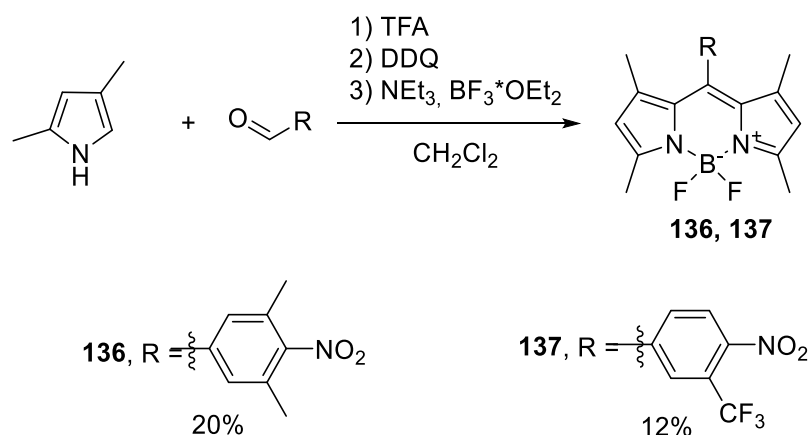


Схема 54. Синтез соединений **136** и **137**

Также было решено получить аналоги соединений **136** и **137**, не содержащие метильные группы в ядре хромофора, что могло обеспечить более эффективное сопряжение нитроарильного фрагмента с ядром хромофора. Для этого, согласно общей методике, соответствующий альдегид смешивали с избытком свежеперегнанного пиррола и добавляли трифторуксусную кислоту в качестве

катализатора. Получаемый продукт конденсации промежуточно выделяли и растворяли в хлористом метиле. Окисление с помощью DDQ и реакция с  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  в присутствии триэтиламина приводило к получению соответствующего BODIPY с выходами 15% (в случае **138**) и 26% (в случае **139**).

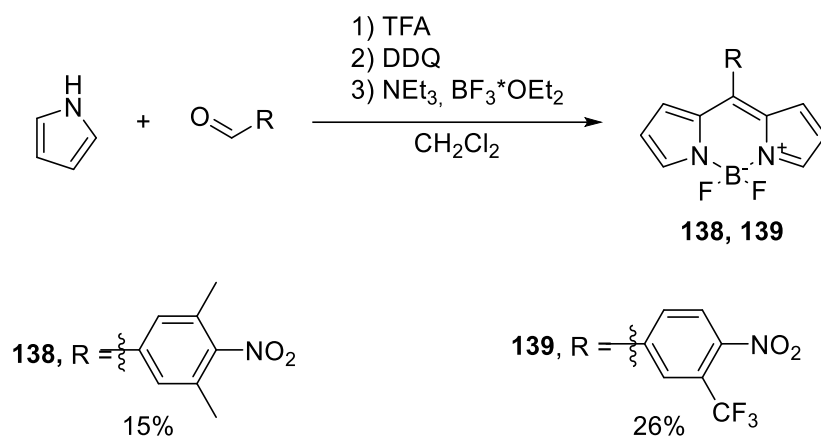


Схема 55. Схема синтеза соединений **138** и **139**

Известно, что тяжелые атомы (Cl, Br, I) способны усиливать спин-орбитальное взаимодействие, тем самым увеличивая скорость интеркомбинационной конверсии, что в свою очередь может увеличивать квантовый выход синглетного кислорода фотосенсибилизаторов. Для соединений BODIPY также характерен эффект тяжелого атома, в связи с чем было решено ввести атомы йода в соединение **136** [151; 152]. Также имело смысл проверить, влияет ли триплетное состояние на эффективность нитро-нитритной перегруппировки. Реакция соединения **136** с N-йодсукцинимидом в хлористом метиле позволила получить дийод производное **140** с выходом 75% (Схема 56).

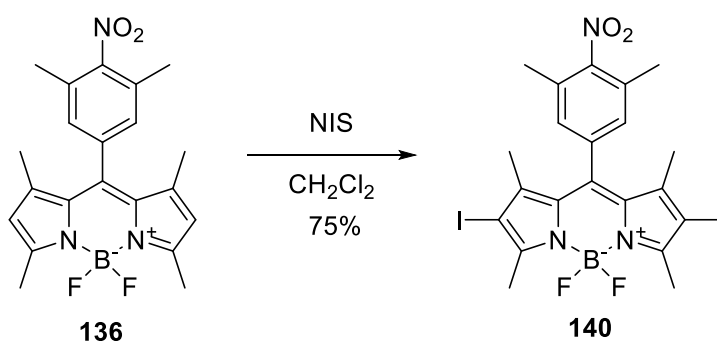


Схема 56. Схема синтеза соединения **140**

### 3.2 Исследование фотохимических свойств BODIPY с пространственно затрудненными нитрогруппами

Для полученных соединений были записаны спектры поглощения и флуоресценции. Так, на рисунке 25 показаны нормализованные спектры поглощения в этаноле соединений **136-140**. Для соединений **136-139** основная полоса поглощения находится около 500 нм, незначительно сдвинутая в красную область для соединений с  $\text{CF}_3$ -группой. Вторая полоса при  $\sim 350$  нм более выражена для соединений **138** и **139** и практически отсутствует для соединений **136** и **137**, что вероятно связано с наличием боковых метильных групп. Полосы поглощения для соединения **140**, содержащего два атома йода, сдвинуты примерно на 30 нм в красную область, что соответствует данным о похожих соединениях [153].

Интересно, что вид спектров в воде (+1% ДМСО, этанол или ацетонитрил) для полученных соединений несколько отличается в зависимости от времени и степени перемешивания, вероятно вследствие образования микроагрегатов (Приложение 8). Образование агрегатов уже изучалось и было описано в литературе в более ранних работах [154; 155]. Тем не менее, нами были измерены коэффициенты молярной экстинкции в воде. В таблице 2 собраны длины волн основных полос поглощения и соответствующие коэффициента молярной экстинкции полученных соединений.

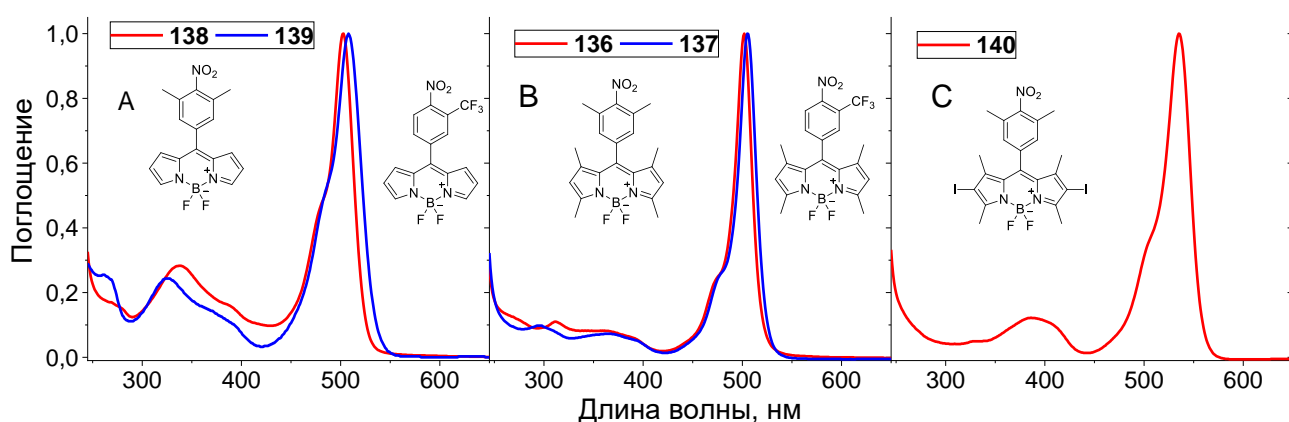


Рисунок 25. Нормализованные спектры поглощения соединений **136-140**

Таблица 2. Максимальные длины волн поглощения и коэффициенты экстинкции для 136-140

		138	136	139	137	140
Этанол	$\lambda_{\max}$	502	502	507	505	535
	$\varepsilon(\lambda_{\max})$ , $M^{-1}cm^{-1}$	47520	47040	33330	80250	81700
Вода (99%) + 1% ДМСО	$\lambda_{\max}$	502	508	506	508	516/541
	$\varepsilon(\lambda_{\max})$ , $M^{-1}cm^{-1}$	18580	23200	24670	24610	33180/34060

Для спектров флуоресценции каждого из веществ характерна своя картина. На рисунке 26А показаны спектры флуоресценции соединений, возбужденных при  $\lambda_{\max}$ . Среди продуктов с одинаковыми мезо-заместителями, наибольшая интенсивность флуоресценции характерна соединениям с четырьмя метильными группами в ядре хромофора (**136** и **137**). Это явление подтверждается литературными данными [156; 157]. Безызлучательные процессы связаны с вращением фенильной группы вокруг С-С связи. Боковые метильные группы препятствуют этому вращению, в результате чего большая часть энергии излучается в виде света. В свою очередь интенсивность флуоресценции выше для соединений с диметил-нитробензольный заместителем **136** и **138**, по сравнению с соединениями с трифторметил-нитробензольным заместителем **137** и **139**. Это может быть связано с облегченным фотоиндуцированным переносом заряда к трифторметил-нитробензольной группе благодаря ее акцепторной природе.

Был определен квантовый выход флуоресценции (QY) с использованием родамина 6G, в качестве стандарта. Ранее было показано, что похожие соединения могут проявлять различную фотохимию при возбуждении в видимом и УФ-диапазоне (эффекты анти-Каша) [158]. Поэтому были измерены спектры излучения для возбуждения при 375 нм, которые оказались идентичными (Рисунок 26В), без проявлений необычной фотохимии. Квантовые выходы для 375 нм также были определены с использованием кумарина 153 в качестве стандарта.

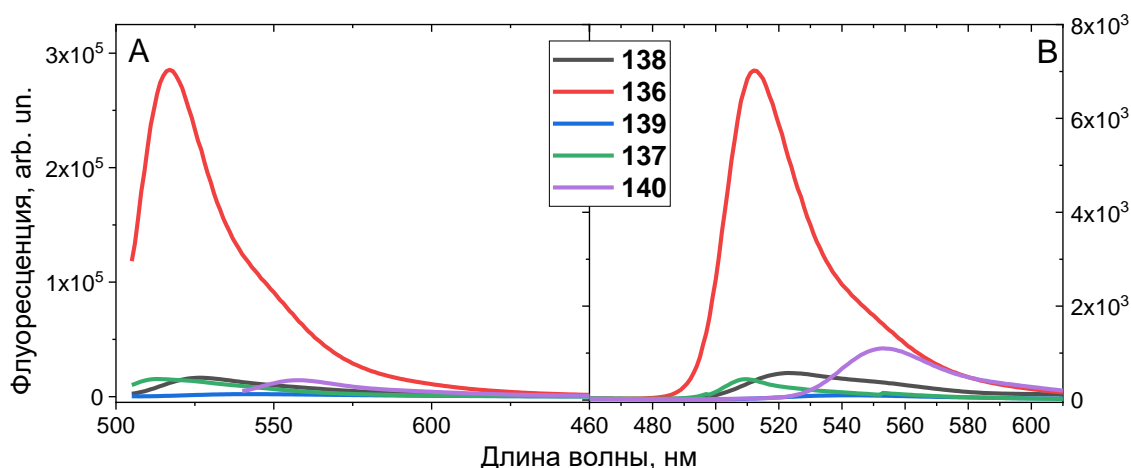


Рисунок 26. Спектры флуоресценции **136-140** при возбуждении  $\lambda_{max}$  (A) и 375 нм (B)

Таблица 3. Квантовый выход флуоресценции для **136-140**

		<b>138</b>	<b>136</b>	<b>139</b>	<b>137</b>	<b>140</b>
	$\lambda_{фл}$	523	512	542	513	553
QY Флуоресценции	$\varphi(\lambda_{max})$	0.016	0.116	0.003	0.005	0.019
	$\varphi(375 \text{ нм})$	0.004	0.045	0.002	0.003	0.011

Разница квантовых выходов флуоресценции для соединений **136-140** может объясняться присутствием других фотохимических и фотофизических процессов. Например, известно, что процесс интеркомбинационной конверсии происходит легче для соединения **140** благодаря эффекту тяжелого атома [159]. Однако эффект гашения флуоресценции трифторметил-нитрофенильной группой был неожиданным, в связи с чем были проведены квантово-химические расчеты для объяснения этого эффекта. На рисунке 27 изображены оптимизированные геометрии **136** и **137**, а также орбитали HOMO и LUMO. В то время как для **136** LUMO находится полностью на остоле BODIPY, LUMO для **137** практически полностью смещена на мезо-заместитель. Такой перенос электрона объясняет слабую флуоресценцию, наблюдаемую для соединений **137** и **139**. Результаты

расчетов для соединений **136-140**, включая энергии триплетных и синглетных возбужденных состояний, HOMO и LUMO орбитали представлены в приложениях (Приложение 1-Приложение 3)

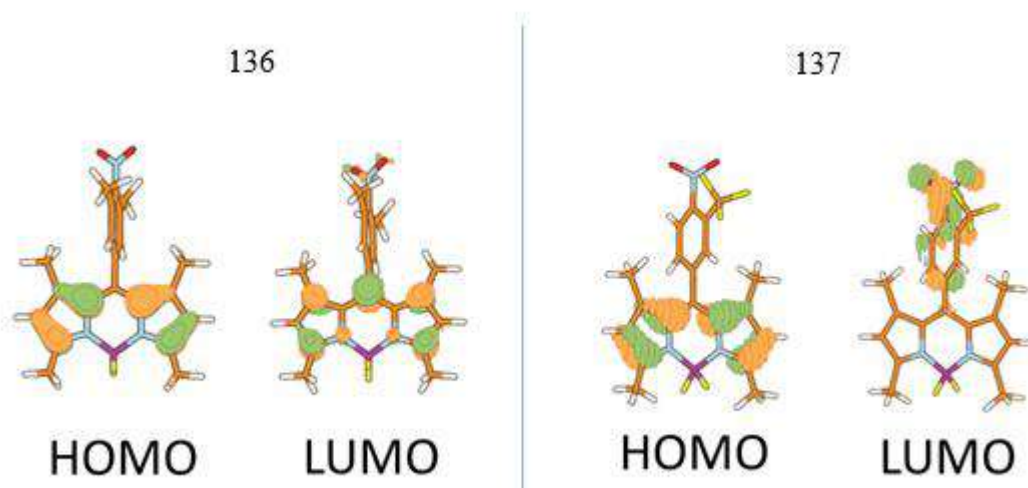


Рисунок 27. Визуализация квантово-химических расчетов, объясняющих разницу в *QY* флуоресценции для **136** и **137**

Фотоиндуцированное разделение заряда и последующая рекомбинация могут приводить к заселению триплетного состояния и генерации синглетного кислорода [160]. Для того чтобы изучить эффективность этого процесса для полученных соединений, была измерена люминесценция синглетного кислорода ( $^1\text{O}_2$ ) в насыщенном кислородом растворе  $\text{CCl}_4$ . Был использован ранее описанный метод [161] с длиной волны возбуждения 500 нм. Для соединения **140** был получен хорошо-разрешенный спектр люминесценции с максимумом 1268 нм (Рисунок 28А). Для всех остальных соединений сигнал люминесценции не превышал уровень шума при тех же параметрах. Чтобы сравнить эффективность генерации  $^1\text{O}_2$ , была увеличена интенсивность освещения и значение поглощения образцов было доведено до  $D \sim 2$ , в это же время уменьшив поглощение **140** до  $D \sim 0,006$ . В этих условиях интенсивность спектров люминесценции были сопоставимы для соединения **140** и для соединений **136** и **137** с четырьмя метильными группами, однако для соединений **138** и **139** все также не превышала уровень шума (Рисунок 28В). Это позволило нам оценить квантовый выход синглетного кислорода: для **136**

$\approx 0,3$ , для **137**  $\approx 0,1$  и меньше для **138** и **139** (предполагая, что квантовый выход для **140**  $\approx 1$ ).

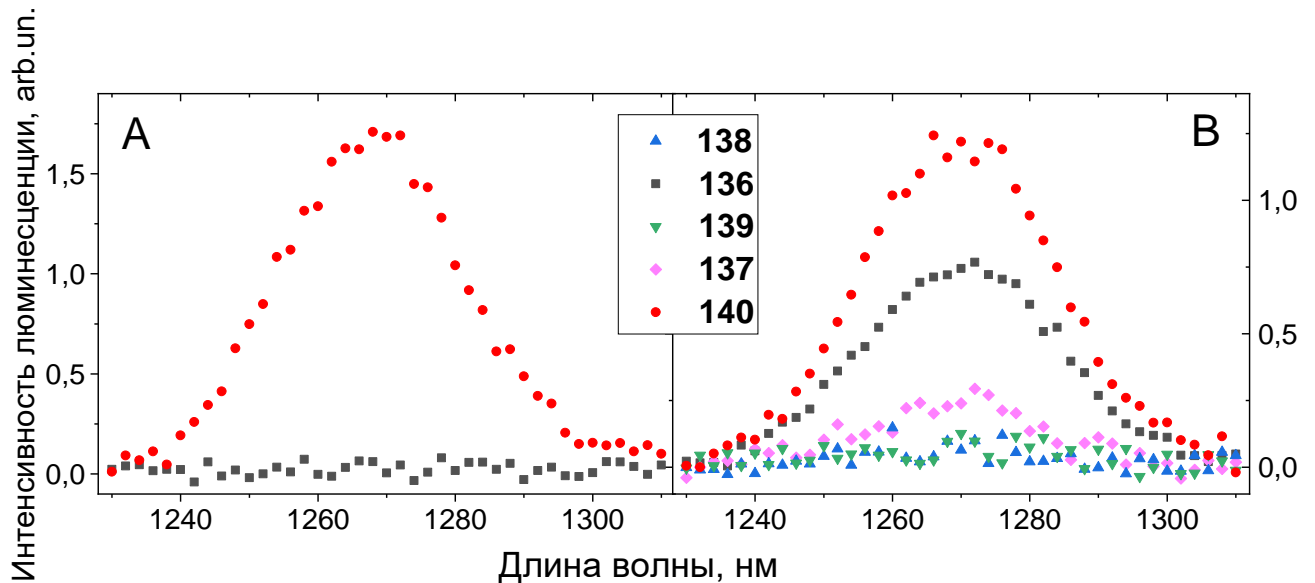


Рисунок 28. Спектр люминесценции синглетного кислорода для соединений **136-140** в  $CCl_4$  ( $\lambda_{exc} = 500$  нм). (А): Спектр люминесценции **136** и **140** с одинаковым поглощением при 500 нм; (В): спектры для **136-139** с одинаковым поглощением, поглощение **140**  $\sim 0,006$ .

Применение красителей для биологических исследований предполагает их использование в водных растворах. Ранее сообщалось, что многие красители на основе BODIPY являются гидрофобными и образуют агрегаты в воде [154; 155]. В связи с этим были исследованы спектроскопические свойства соединений **136-140** в водном растворе. Как упоминалось ранее, спектры поглощения в водном растворе менее интенсивны и шире по сравнению с этанольным раствором. На рисунке 29А показаны спектры поглощения для различных концентраций **136**. Образование агрегатов отчетливо видно в спектрах излучения (Рисунок 29В), где с увеличением концентрации красителя появляется дополнительная полоса с максимумом при 650 нм, отмеченная красным прямоугольником. Эта полоса отсутствует в органических растворителях, где присутствует только основная полоса при  $\sim 500$  нм (отмечена зеленым прямоугольником на рисунке 29В). Такая ситуация характерна для всех соединений **136-140** (интересно, что основная полоса для **138** практически

отсутствует в воде, остается только дополнительная полоса при 650 нм; все спектры приведены в приложении 6). Эти полосы также имеют разные спектры возбуждения (Приложение 7).

Чтобы получить дополнительное представление о природе дополнительной длинноволновой полосы излучения, были выполнены измерения с временным разрешением. Кинетические кривые затухания флуоресценции были измерены для обеих полос (Рисунок 29С). Затухание флуоресценции при 508 нм имеет экспоненциальную зависимость со временем жизни 5,78 нс, тогда как затухание при 650 нм является биэкспоненциальным с  $\tau_1 = 1,19$  нс,  $\tau_2 = 4,36$  нс. Гетерогенность и быстрое затухание характерны для самогашения флуоресценции в агрегатах.

В целом, агрегационно-индуцированная эмиссия довольно распространена для производных BODIPY [162; 163], однако обычно при этом не происходит сдвига полосы испускания в красную область. Примеры агрегации со сдвигом флуоресценции в красную область известны для производных BODIPY, содержащих парациклофановый [164] или трифенилэтильный [165] заместители, а для простых мезо-арил производных – в литературе не описана.

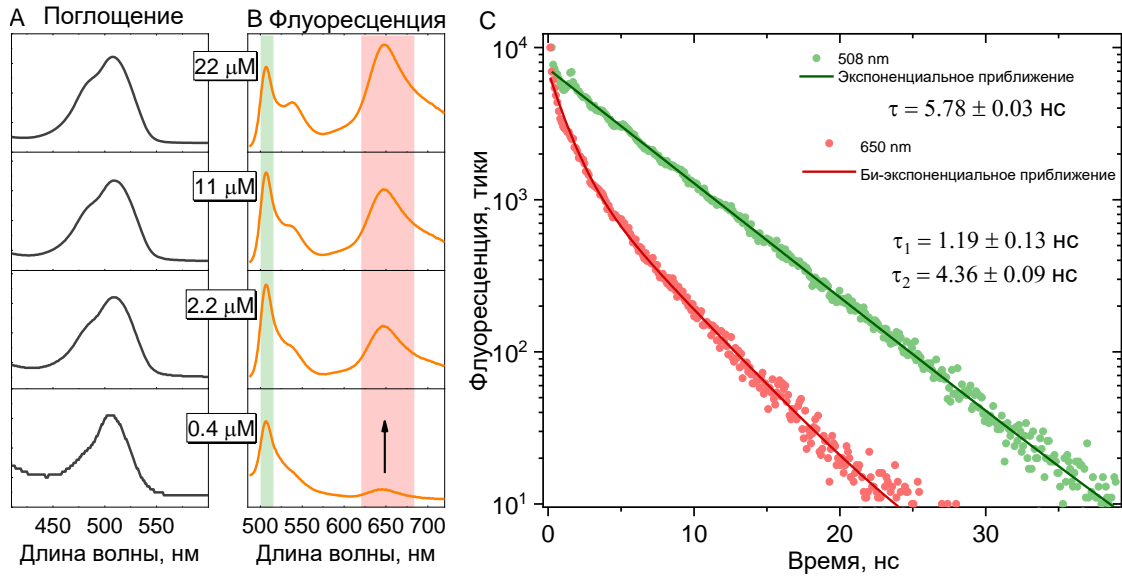


Рисунок 29. Спектры поглощения (А) и флуоресценции (В) для различных концентраций **136** в воде (+1% ДМСО). Дополнительные полосы испускания (предположительно относящиеся к агрегатам) отмечены красным прямоугольником; зеленым прямоугольником отмечены полосы излучения в органических растворителях; (С) измерение временно-разрешенного гашения флуоресценции для двух длин волн излучения

Был проведен стационарный фотолиз, используя светодиод с мощностью 3 Ватт и длиной волны 500 нм. Все полученные соединения были фотостабильны в этаноле – не наблюдалось изменений спектров поглощения после 10 минут освещения (например, зеленая линия на рисунке 30, данные для всех соединений приведены в приложении 8). Напротив, наблюдалось обесцвечивание (уменьшение поглощения) водных растворов всех соединений, кроме **138**. Это процесс быстрее всего происходил для соединения **140**, поглощение которого уменьшилось более чем вдвое после 5 минут освещения (Рисунок 30В). Такой эффект может указывать на роль синглетного кислорода в этом процессе.

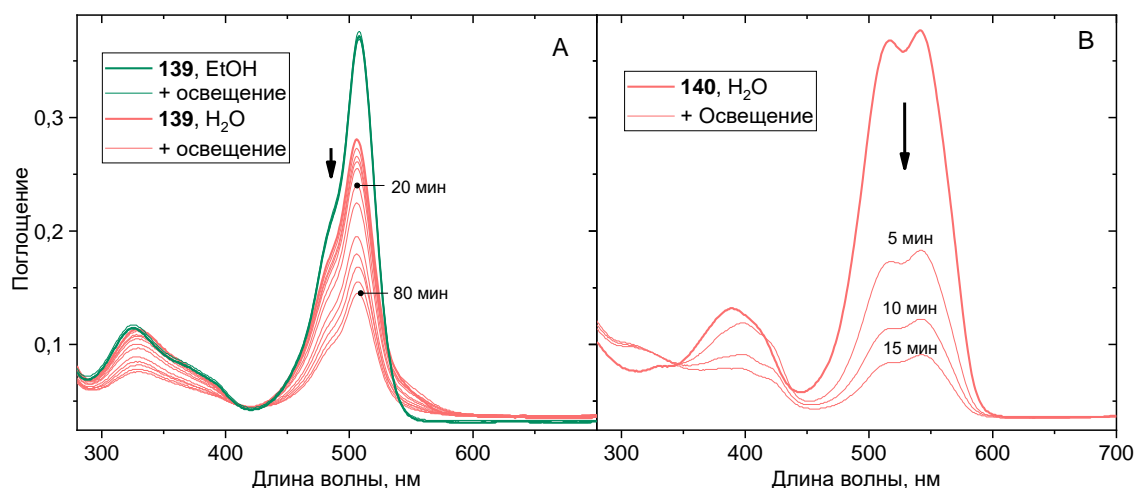


Рисунок 30. (А) Спектр поглощения **139** в этаноле и воде (+1% ДМСО); (В) Уменьшение спектра поглощения **140** в водном растворе (+1% ДМСО)

Тем не менее, наблюдаемые эффекты могут быть связаны с изменениями в структуре молекулы при воздействии со светом, что могло бы соотноситься с высвобождением NO. Возможное высвобождение NO было измерено, используя флуоресцентный зонд DAR-2 [166]. Зонд добавляли в раствор полученных соединений, где он должен был взаимодействовать с выделяемым NO с образованием флуоресцентной триазольной формы. Однако изменения интенсивности флуоресценции в этанольном растворе не наблюдалось (за исключением небольшого увеличения интенсивности в случае соединения **136**; Приложение 4) Также наблюдалось небольшое увеличение флуоресценции в водных растворах, однако, как было показано ранее, это может быть скорее связано с окислением DAR-2 чем с фотовысвобождением NO [167]. Более того, деградация DAR-2 в растворах подтверждалась уменьшением поглощения ловушки, что коррелировало с увеличением флуоресценции (Приложение 5). Чтобы напрямую оценить присутствие триазольной формы DAR-2 был проведен ВЭЖХ анализ смеси, согласно которому следов триазольной формы не было обнаружено (Приложение 9). Таким образом, был сделан вывод, что полученные соединения **136-140** хоть и являются фотохимически активными, но не выделяют NO при облучении видимым светом, по крайней мере в детектируемых количествах [168].

### 3.3 Получение соединений BODIPY с N-нитрозо фрагментом и исследование их фотохимических свойств

В литературном обзоре были описаны несколько примеров *N*-нитрозо доноров, в которых группа, несущая N-NO фрагмент прикреплена к остову хромофора через CH<sub>2</sub>-фрагмент. В работе [33] авторы установили, что эффективность выделения NO зависит от расстояния между фрагментом, несущим N-NO группу и остовом хромофора, а также возможностью реализации π-π стэкинга между ними, что может приводить к более эффективному фотоиндуцируемому переносу электрона. Из литературы известно, что *мезо*-CH<sub>2</sub>-Cl BODIPY (**141**) вступает в реакции замещения с различными аминами. Было предположено, что использование такой реакции позволит нам получить соединения BODIPY, в которых, благодаря малому расстоянию между N-NO группой и возможности вращения C-N связи, сможет реализовываться вышеописанный принцип. Более того, использование одного общего исходного соединения позволит получить серию целевых доноров с различными заместителями и сравнить их эффективность.

На начальном этапе был получен *мезо*-CH<sub>2</sub>-Cl BODIPY (**141**) с выходом 60% путем конденсации хлорацетил хлорида с 2,4-диметилпирролом, окислением DDQ и реакцией с эфиром трехфтористого бора в присутствии триэтиламина (Схема 57).

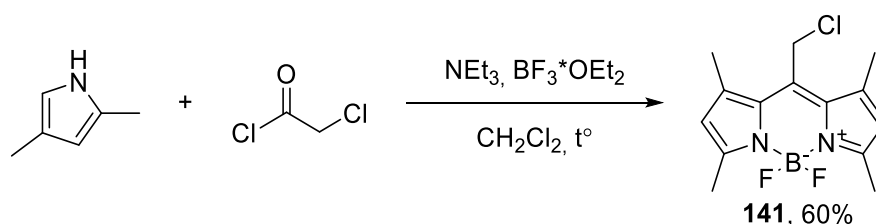


Схема 57. Синтез BODIPY **141**

Полученное соединение **141** нагревали с йодидом калия, а затем вводили в реакцию с изопропиламином и анилином в ацетонитриле в присутствии поташа в качестве основания. Выходы соединений **142** и **143** составили 54% и 32% соответственно (Схема 58). При проведении реакции без предварительного

нагревания с йодидом калия увеличивается выход побочного соединения **136b** и продукта замещения по боковой метильной группе **142a**. Строение получаемых вторичных аминов доказывали с помощью спектров  $^1\text{H}$  ЯМР. Получение целевых продуктов подтверждалось появлением в спектре характерных сигналов в ароматической области (в случае анилина) или в диапазоне 1-3 м.д., соответствующие сигналам изопропильного заместителя (дублет 1,10 м.д. с интенсивностью 6 и гептет 2,90 с интенсивностью 1).

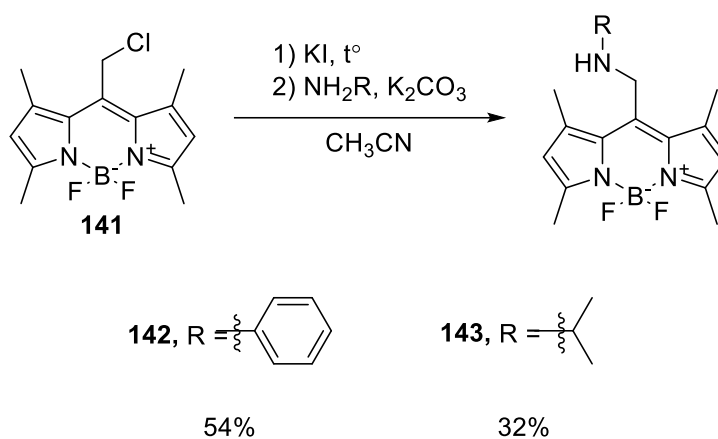


Схема 58. Синтез BODIPY **142** и **143**

Стоит отметить, что при проведении реакции между анилином и **141** были также использованы другие условия: смесь **141**, анилина и гидрида натрия перемешивали при нагревании в ацетонитриле ночь. В результате реакции были выделены два соединения: соединения **142a** и **142b**. Получение соединения **142a** подтверждается спектром  $^1\text{H}$  ЯМР, в котором присутствуют сигналы от четырех неэквивалентных метильных групп с интегральными интенсивностями 3 (2,34 м.д., 2,40 м.д., 2,53 м.д., 2,55 м.д.). Ранее, подобное превращение было отмечено в литературе [169]. При взаимодействии **141** с *n*-пропиламином в безводном DCM в присутствии  $\text{K}_2\text{CO}_3$  авторы получили продукт замещения в метильной группе в положении 3, а не в *мезо*-положении, как ожидалось. Вероятно, получение такого производного может объясняться следующим механизмом:

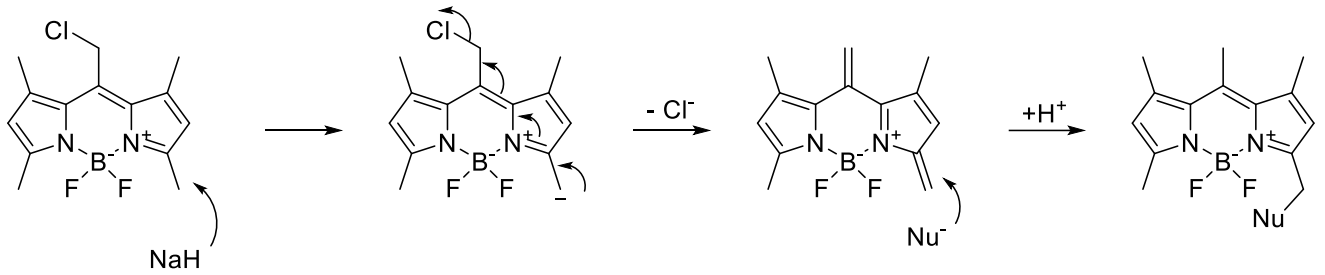


Схема 59

Данный метод, вероятно, может быть использован для получения соединений, в которых аминогруппа находится в боковой метильной группе, однако выход данной реакции весьма незначительный, учитывая получение побочного продукта.

(Схема 60)

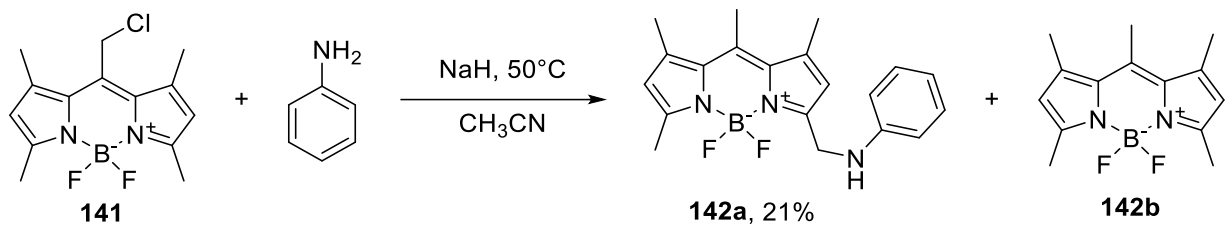
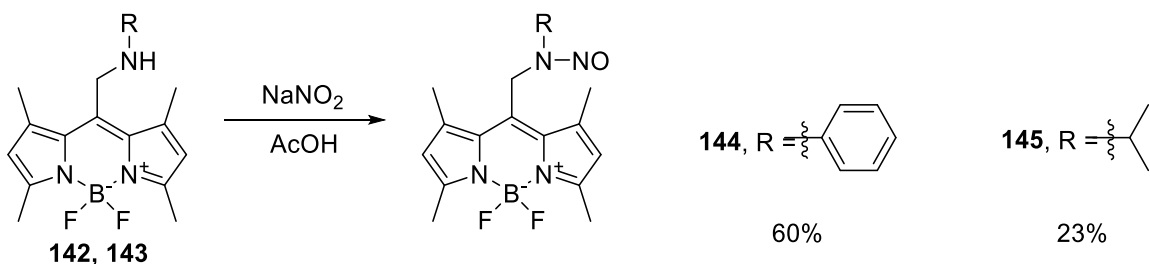


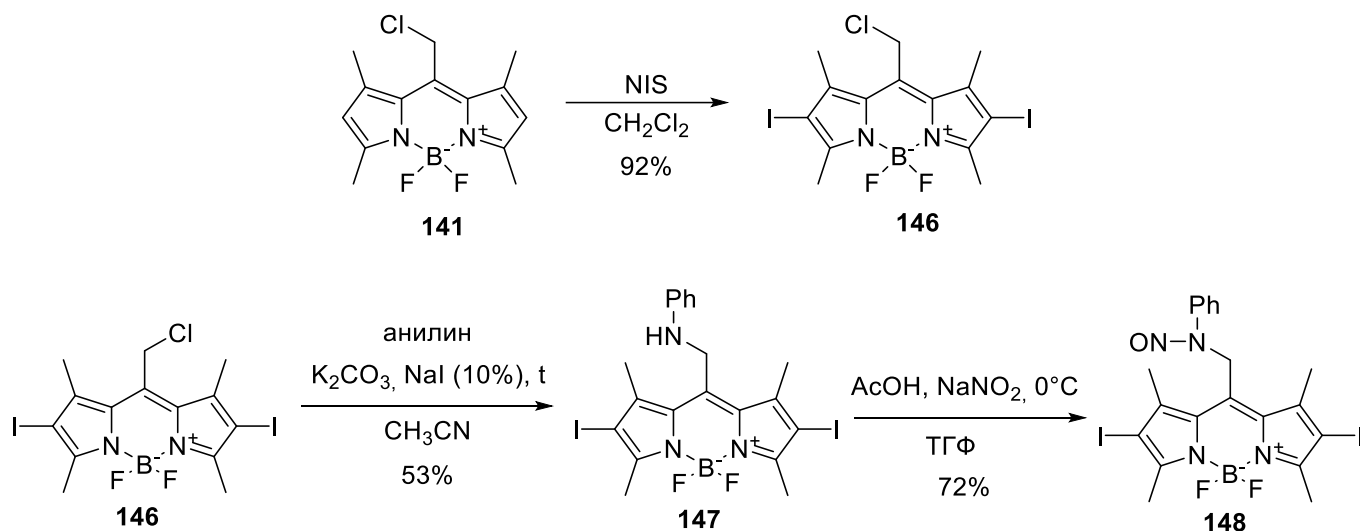
Схема 60

Полученные вторичные амины затем вводили в реакцию нитрозирования при охлаждении в ледяной уксусной кислоте с помощью раствора  $\text{NaNO}_2$ . Выходы N-нитрозо соединений **144** и **145** составили 60% и 23% соответственно (Схема 61). Строение продуктов подтверждали с помощью физико-химических методов: получение N-NO фрагмента сдвигает сигнал от  $\text{CH}_2$  фрагмента примерно на 1 м.д. в слабую область спектра.

Схема 61. Синтез BODIPY **144** и **145**

Интересной особенностью некоторых фотоактивируемых доноров NO BODIPY является способность генерировать синглетный кислород ( $^1\text{O}_2$ ) под действием света. Эту способность можно «усилить» введением атомов йода в ядро

VODIPY [170]. Одновременное образование NO и  $^1\text{O}_2$  оказывает синергетический эффект и приводит к повышению фототоксичности. Кроме того, введение атомов иода увеличивает скорость синглет-триплетной конверсии, и было интересно посмотреть, оказывает ли влияние переход молекулы в триплетное состояние на выделение NO. В связи с этим, мы решили синтезировать диод-аналог соединения **144**. Сначала было получено соединение **146** взаимодействием вещества **141** с *N*-йодсукцинимидом в хлористом метиле с выходом 92% после колоночной хроматографии. Затем, соединение **147** получали взаимодействием хлорида **146** с анилином в ацетонитриле в присутствии поташа и каталитического количества йодида натрия (10% мол.). Выход вторичного амина составил 53%. Дальнейшее нитрозирование в смеси ТГФ/ледяная кислота при охлаждении привело к получению целевого соединения **148** с выходом 72% (Схема 62). Строение полученных соединений **147** и **148** подтверждали спектрами  $^1\text{H}$  ЯМР: наблюдали аналогичные изменения в спектре ЯМР, как и для соединений **142** и **144**, а также наблюдалось появление сигнала водорода фрагмента NH (триплет), который исчезал после проведения реакции нитрозирования.



Как было показано ранее, замена атомов фтора в  $\text{BF}_2$ -фрагменте на  $\text{CH}_3$ -группы в фотоудаляемой группе *мезо*- $\text{CH}_2$ -VODIPY приводит к увеличению эффективности фотолиза [66]. Было решено проверить, окажет ли замена F на  $\text{CH}_3$

влияние на эффективность выделения NO в нашем случае. Поэтому были получены соединения **150** и **152**. Соединения **142** и **147** реагировали с избытком свежеприготовленного MeMgI с образованием продуктов **149** и **151** соответственно. После этого полученные соединения нитрозировали нитритом натрия в смеси CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ТГФ/АсОН с получением конечных N-нитрозосоединений **150** и **152**. При работе с йодированными и/или диметилборированными соединениями приходилось использовать более мягкие условия из-за склонности исходных и целевых соединений к разложению при нагревании. Строение соединений **149** и **151** подтверждалось отсутствием характерного сигнала от атомов фтора в спектре <sup>19</sup>F ЯМР, и появлением сигнала с интенсивностью 6 на 0 м.д. от двух метильных групп при атоме бора.

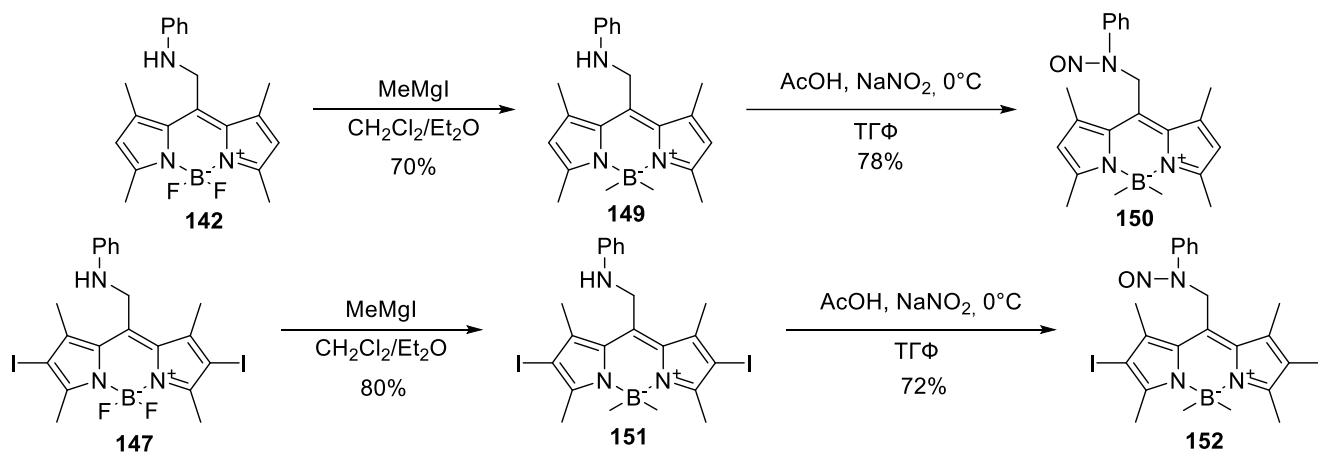


Схема 63

Далее были исследованы фотофизические свойства полученных соединений и их способность выделять NO, при облучении светом. На рисунке 31 показаны нормализованные спектры поглощения N-нитрозо соединений **144**, **145** и **150** в

этаноле. Все соединения имеют высокий коэффициент молярной экстинкции на длине волны ~510-520 нм (Таблица 4).

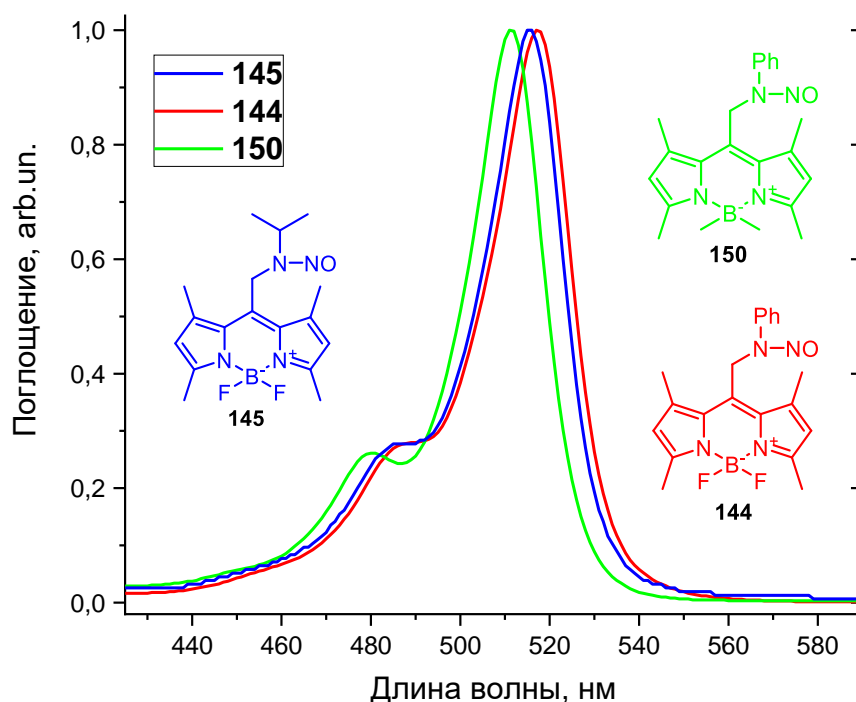


Рисунок 31. Нормализованные спектры поглощения соединений **144**, **145** и **150**

Таблица 4. Коэффициенты экстинкции и максимумы поглощения в этаноле

	<b>145</b>	<b>144</b>	<b>150</b>
$\lambda_{\max}$ , нм	515	517	511
$\varepsilon(\lambda_{\max})$ , $M^{-1}cm^{-1}$	$7.75 \times 10^4$	$7.2 \times 10^4$	$8.2 \times 10^4$

Был проведен стационарный фотолиз раствора соединений в этаноле в кварцевой кювете диаметром 1 см с использованием светодиода с длиной волны 500 нм. Спектр поглощения быстро менялся в первые минуты фотолиза, а затем приобретал стационарный вид. Пример для **144** показан на рисунке 32А. Окончательный спектр имеет ту же форму, что и спектр **142**, который показан на рисунке 32В. В связи с этим был сделан вывод, что при фотооблучении **144** выделяет NO и превращается в свой предшественник **142**. Такое же превращение наблюдалось для соединения **150**. Напротив, спектр фотопродукта **145** не совпадает со спектром его предшественника **143**: он имеет дополнительный смещенный в красную область пик около 550 нм. Однако образование амина **143** во время

фотолиза наблюдалось с помощью ВЭЖХ, тогда как неизвестный фотопродукт, поглощающий при 500 и 550 нм, имеет гораздо меньшее время удерживания.

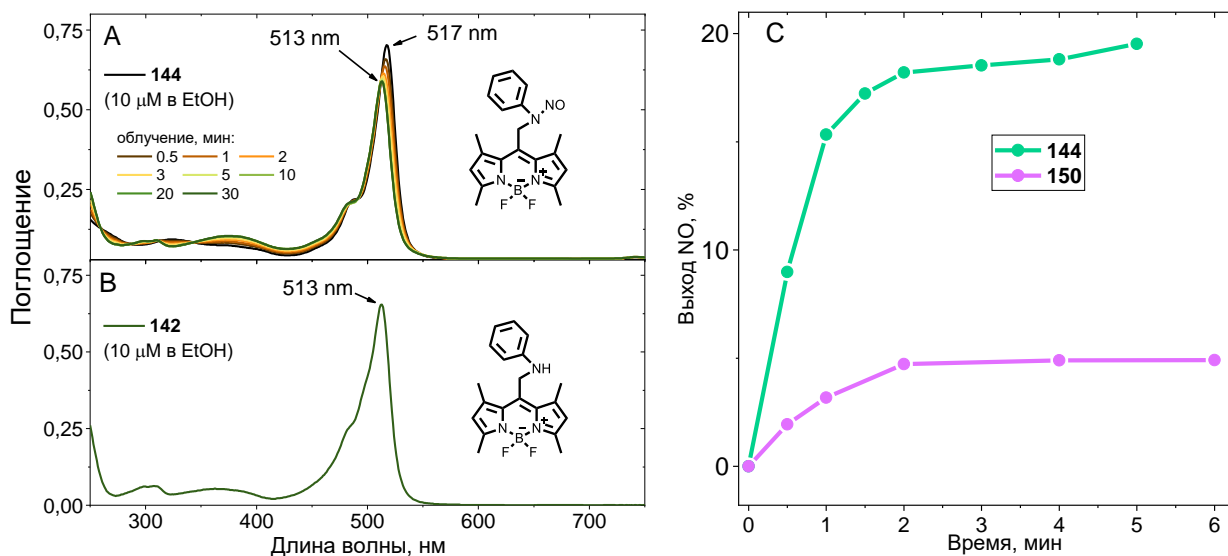


Рисунок 32. (A) Изменение спектра поглощения **144** в процессе облучения 500 нм; (B) Спектр поглощения **142**; (C) Фотоактивированное выделение NO, наблюдаемое с помощью флуоресцентного зонда DAR-2, представленное в виде отношения [NO] к начальной концентрации фотодонора (%)

Чтобы определить выход фотовыделения NO был использован флуоресцентный зонд DAR-2. На рисунке 32С показана кинетика выделения NO, полученная путем измерения флуоресценции зонда с использованием уравнения, описанного в экспериментальной части. Результат представлен в виде отношения концентрации NO к концентрации фотодонора (%). Самым быстрым и эффективным донором оказался донор **144** (~20% за 2 минуты), в то время как донор **150** показал схожую скорость, но более низкий конечный выход (~4% за 2 минуты). Соединение **142** («фотопродукт» разложения **144**) был фотостабилен в этаноле, и флуоресценция зонда DAR-2 не менялась в ходе эксперимента. Измерения для вещества **145** были осложнены тем, что спектр поглощения «фотопродукта» перекрывается со спектром зонда DAR-2. Это привело к фоновому увеличению флуоресценции во время фотолиза, при том, что флуоресценция DAR-2 незначительно превышала фоновый уровень флуоресценции. Из этого был сделан вывод, что соединение **145**, вероятно, способно выделять NO при фотолизе с

относительно низкой эффективностью. Очевидно, что незначительный выход NO связан с необратимыми фотопревращениями структуры, несвязанными с выделением NO.

Мы предполагаем, что механизм фотовыделения NO связан с фотоиндуцированным переносом электрона, как и в случае ранее описанного донора NOBL-1 [31]. Согласно авторам, при облучении донора происходит фотоиндуцированный перенос электрона с фрагмента, «несущего» N-NO фрагмент, к ядру хромофора BODIPY с образованием радикальной пары, которая в дальнейшем претерпевает превращения с выделением молекулы NO и отрывом атома водорода от растворителя (Схема 64).



Схема 64. Предположительный механизм выделения NO

Фотоиндуцированная генерация синглетного кислорода ( $^1\text{O}_2$ ) является неотъемлемым свойством многих красителей, включая BODIPY. Одновременное образование  $^1\text{O}_2$  и NO представляет интерес для разработки гибридной фотодинамической терапии [171]. Нами были синтезированы производные дийод **148** и **152** для усиленной генерации синглетного кислорода за счет эффекта тяжелого атома. На рисунке 33А показаны нормализованные спектры поглощения и фотофизические свойства йодированных соединений. Спектры поглощения смещены в красную область примерно на  $\sim 30$  нм для дийод замещенных BODIPY, что соотносится с ранее опубликованными результатами для схожих соединений. Вещества обладают слабой флуоресценцией (QY 0,015 и 0,003, соответственно), что вероятно обуславливается увеличенной конверсией в триплетное состояние. Стоит отметить, что **148** способен выделять NO при облучении, как показано на рисунке 33В. В свою очередь, для **152** не было обнаружено фотовыделение NO.

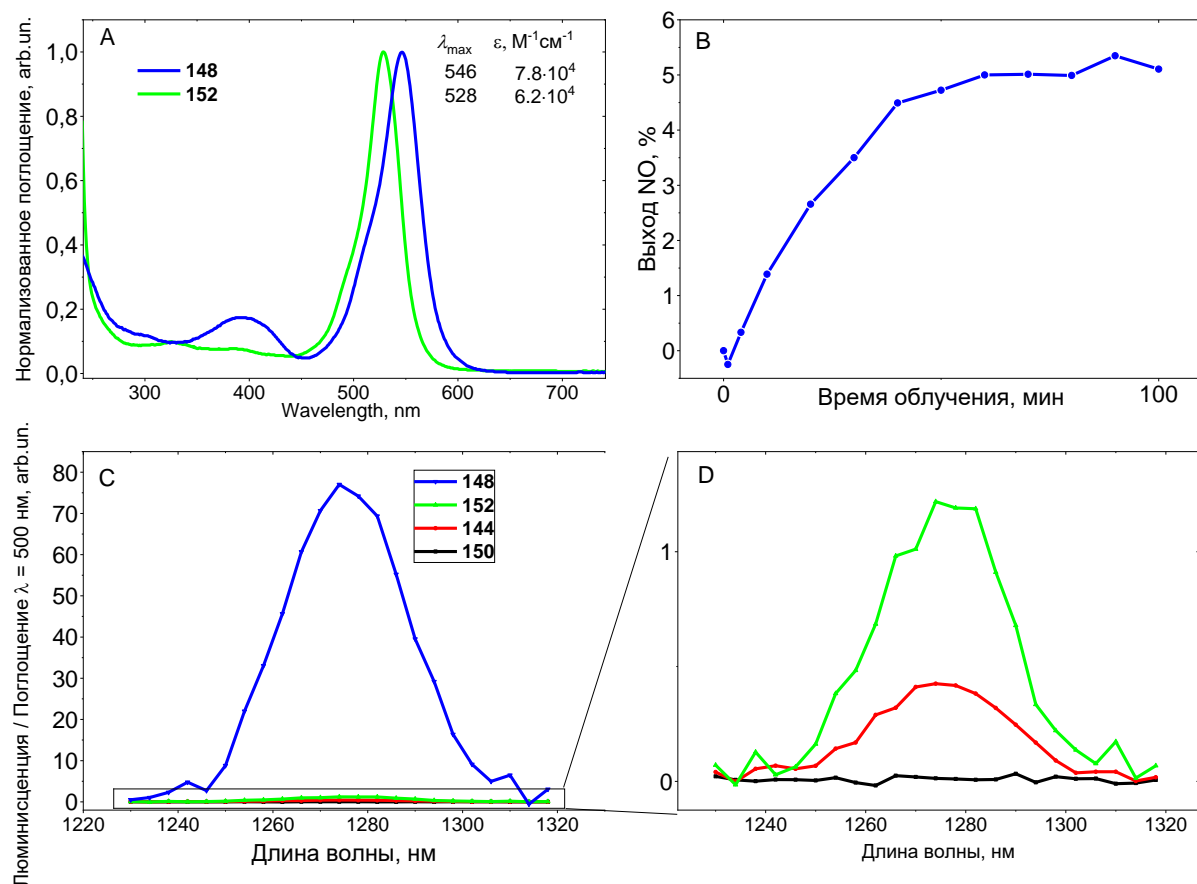


Рисунок 33. (A) Спектр поглощения и фотофизические свойства дийод-замещенных **148** и **152**; (B) Выделение NO из **148**; (C, D) Люминесценция синглетного кислорода, измеренная во время фотовозбуждения соединений ( $\lambda_{exc} = 500$  нм)

Чтобы оценить эффективность генерации синглетного кислорода, был записан спектр его люминесценции на длине волны 1270 нм. На рисунке 33C,D показана интенсивность люминесценции по отношению к поглощению при облучении 500 нм. Как ожидалось, относительная интенсивность люминесценции **148** примерно в 200 раз выше интенсивности **144**, который не содержит тяжелых атомов. Необычным оказалось то, что относительная люминесценция бор-алкилированного аналога **152** примерно в 100 раз ниже, по сравнению с **148**. Соответственно, сигнал для соединения **150** не был обнаружен. QY генерации <sup>1</sup>O<sub>2</sub> определяли путем сравнения с 2I-мезо-фенил-BODIPY, для которого QY составляет 0,81 (соединение **I2-BDP** в [153]). Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5. Квантовый выход синглетного кислорода в  $CCl_4$  (500 нм)

	<b>144</b>	<b>148</b>	<b>150</b>	<b>152</b>
<b>QY, %</b>	0,5	90	—/—	1,4

### 3.4 Применение к исследованию активации тромбоцитов

Тромбоциты являются основой гемостаза, а также принимают участие во множестве других нормальных и патологических процессах, включая тромбоз, воспаление и развитие опухолей [172; 173]. Гемостатическая функция тромбоцитов тесно связана с их способностью изменять физические свойства в ответ на повреждение стенки сосуда [174]. Первым этапом этого процесса является активация тромбоцитов, которая включает серию протромботических состояний, запускаемых увеличением концентрации внутриклеточного кальция [175]. Аномальная активация тромбоцитов считается причиной патогенеза атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний [176], которые являются основной причиной смерти во всем мире. Таким образом, ожидается, что углубленное изучение активации тромбоцитов и разработка передовых методов ее оценки могут способствовать дальнейшему прогрессу в сердечно-сосудистой медицине.

Несмотря на то, что разрабатываются новые методы исследований [177], они, как правило, основаны на измерениях *in vitro*, что далеко от физиологических условий: в нормальных сосудах активация тромбоцитов постоянно ингибируется низкими концентрациями NO (3–90 нМ), постоянно выделяемым эндотелиальными клетками, в связи с чем и были предприняты попытки изучения дезактивации тромбоцитов с использованием экзогенных доноров NO [178]. Весьма перспективными инструментами для этого являются активируемые светом доноры NO, поскольку они обеспечивают устойчивое и контролируемое высвобождение. Донор **144** был исследован на способность к дезактивации тромбоцитов.

Тромбоциты, выделенные согласно процедуре, описанной в экспериментальной части, были инкубированы флуоресцентным кальциевым зондом Fluo-4. Этот зонд (спектр возбуждения 450-490 нм, эмиссия >515 нм)

накапливается в клетках, и активация тромбоцитов становится видимой под флуоресцентным микроскопом в виде резких вспышек интенсивности флуоресценции из-за волнообразного выделения внутриклеточного кальция. Измерения проводили в 96-луночной планшете для адгезивных клеточных культур. В этих условиях тромбоциты активировались спонтанно за счет взаимодействия с нижней поверхностью лунок, в связи с чем сохранялась высокая активность клеток (рисунок 34А, В). Аналогичная картина наблюдается для образца, инкубированного с 150 нМ амина **142** в качестве контрольного эксперимента (рисунок 34С, D). Напротив, в тромбоцитах, инкубированных с **144**, после облучения интенсивность флуоресценции намного ниже, что видно по отсутствию значительных сигналов кальция (рисунок 34Е, F). Тот же эффект наблюдался в экспериментах с более высокой концентрацией соединений. Однако в образцах с концентрацией **144**  $\geq$  600 нМ наблюдение сигнала Fluo-4 затруднено из-за собственной флуоресценции фотодонора, которая быстро снижается при фотовыделении NO и тем самым изменяет уровень фоновой флуоресценции. В случаях, когда тромбоциты утрачивают жизнеспособность, наблюдается медленное затухание интенсивности сигналов кальциевого зонда до полного исчезновения флуоресценции.

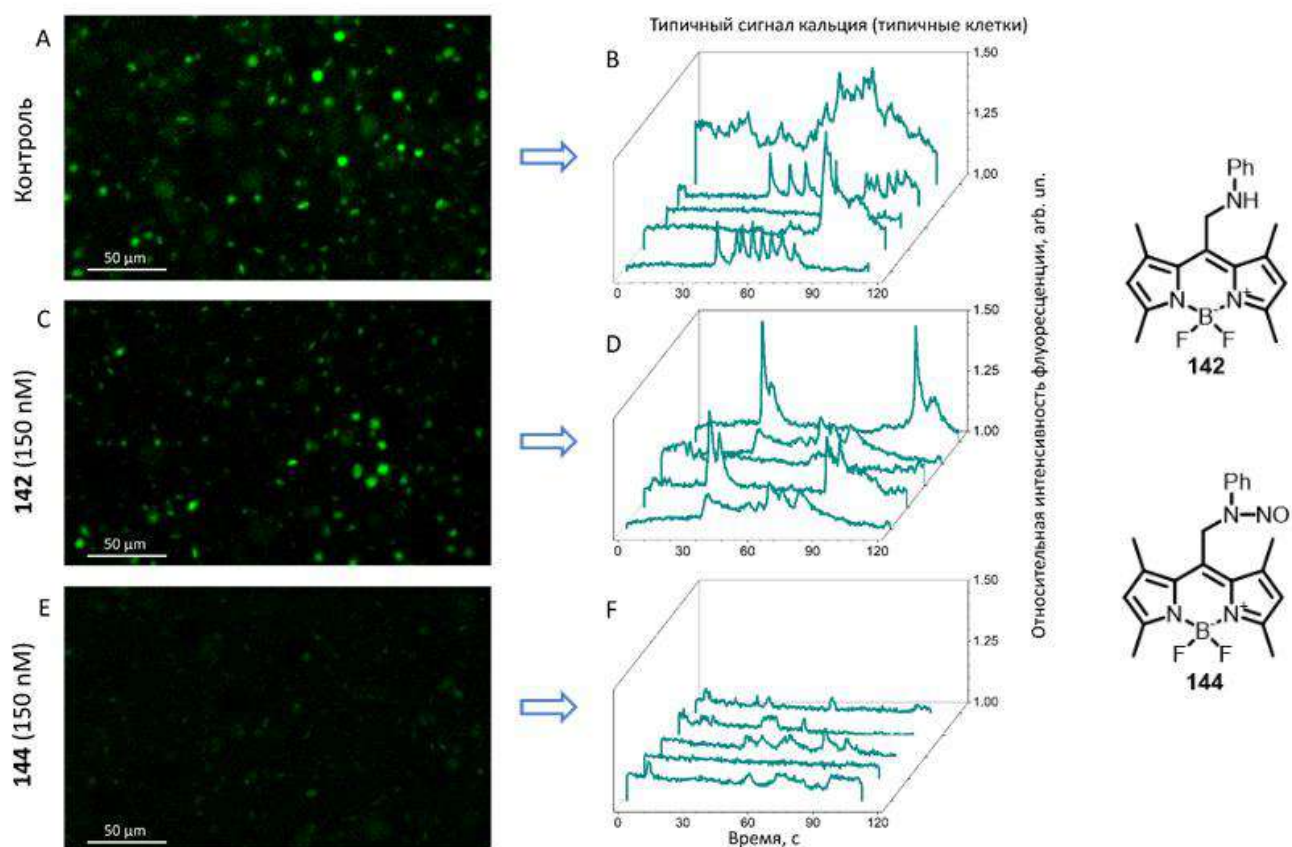


Рисунок 34. Изображения тромбоцитов (A) контроль; клетки инкубированные **142** (C) и **144** (E). Динамика кальция для каждого образца представлена на рисунка B,D и F

Таким образом, был получен ряд новых красителей BODIPY, содержащих N-нитрозо фрагмент, для которых была исследована возможность фотовысвобождения NO. Было показано, что среди соединений, содержащих фенильный заместитель (**144**, **148**, **150**, **152**), максимальный выход NO наблюдается для BODIPY **144** с фрагментом BF<sub>2</sub> и без атомов йода, в то время как алкилирование по атому бора и введение атомов йода в ядро хромофора уменьшает эффективность выделения NO, но влияет на способность к генерации синглетного кислорода. QY высвобождения NO был оценен с использованием лазера с длиной волны 488 нм. Полученное значение  $QY_{NO} = 5.5 \times 10^{-4}$  сопоставимо со значениями для фотоактивируемых доноров NO, описанных ранее в литературе (**NOBL-1**  $QY_{NO} = 1.9 \times 10^{-3}$  [31], **NO-Rosa5**  $QY_{NO} = 1.01 \times 10^{-3}$  [33]), которые успешно были использованы для фотоуправляемой вазодилатации. В отличие от литературных

примеров, полученные в данной работе доноры были синтезированы всего в несколько стадий, что значительно увеличивает общий выход целевых соединений и упрощает их получение. Для соединения **145** фотовыделение NO не было зафиксировано. Было показано, что донор **144** способен эффективно ингибировать активацию тромбоцитов *in vitro* при облучении светом.

### **3.5 Синтез производных aza-BODIPY, содержащих N-нитрозо фрагмент**

Как упоминалось в литературном обзоре, использование красного и ближнего инфракрасного света представляет особую ценность для биологических исследований, поскольку такой свет способен проникать в ткани организма на глубину 4-5 мм, при этом минимизируя возникновение побочных процессов [43]. В связи с этим, привлекательным подходом к дизайну фотоактивируемых доноров является использование красителей, поглощающих в красной и ближней инфракрасной областях спектра. Аналогами соединений BODIPY являются производные aza-BODIPY, которые благодаря своим свойствам (спектр поглощения начинается от 600 нм и высокий коэффициент молярной экстинкции) хорошо себя зарекомендовали в различных исследованиях, таких как флуоресцентная биовизуализация и детектирование, фотоакустическая визуализация и детектирование, а также применение в качестве фотосенсибилизаторов в фотодинамической терапии [179]. Мы обратили наше внимание на получение N-нитрозо производных с использованием данного остова. Ранее в литературе был показан подход к получению фотоактивируемого донора NO на основе остова aza-BODIPY [42], который был использован в фотоакустических приложениях.

По литературной методике был получен ацетофенон **153** с количественным выходом в две стадии из *n*-аминоацетофенона путем введения Вос-защиты аминогруппы и дальнейшего метилирования с помощью йодистого метила в присутствии гидрида натрия (Схема 65).

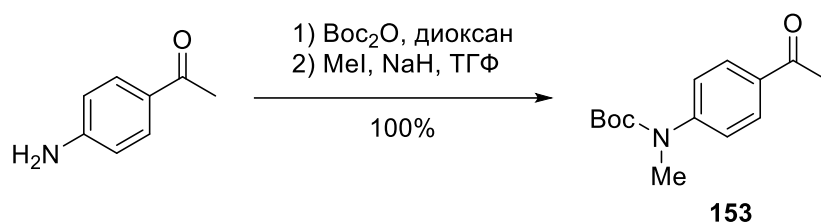


Схема 65. Синтез ацетофенона **153**

Затем полученный по литературной методике ацетофенон вводили в реакцию конденсации с бензальдегидом с последующей реакцией Михаэля с нитрометаном. Выход реакции за две стадии составил 80% (Схема 66).

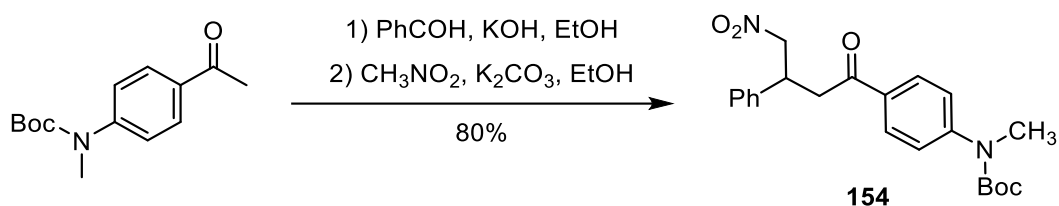


Схема 66. Синтез соединения **154**

Полученное соединение **154** кипятили в этаноле с избытком ацетата аммония в течение 72 часов, и было получено вещество **155** темно-синего цвета с выходом 10% (Схема 67).

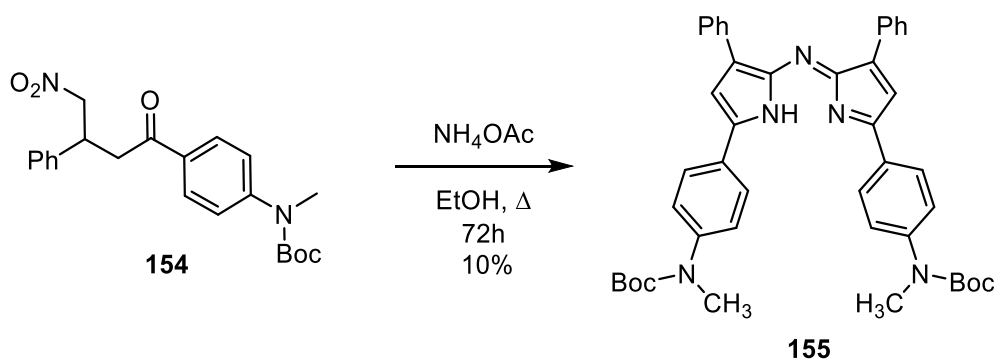


Схема 67. Синтез соединения **155**

После этого, вещество **155** вводили в реакцию с эфиром трехфтористого бора в присутствии триэтиламина. Полученный промежуточный aza-BODIPY **156** очищали колоночной хроматографией и вводили в реакцию нитрозирования нитритом натрия в смеси DCM/ТГФ/АсОН. Выход продукта реакции **157** за две стадии составил 38%. Строение полученных соединений подтверждали с помощью спектров ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{19}\text{F}$ . Для соединения **155** характерно появление сигналов водородов в ядре aza-BODIPY на 7.15 м.д. (синглет) с интенсивностью 2 и

широкого сигнала на 12.5 от фрагмента NH с интенсивностью 1. Для соединения **157** характерно появление характерного сигнала в спектре  $^{19}\text{F}$  ЯМР и отсутствие сигналов от Boc-группы и фрагмента NH в спектре  $^1\text{H}$  ЯМР.

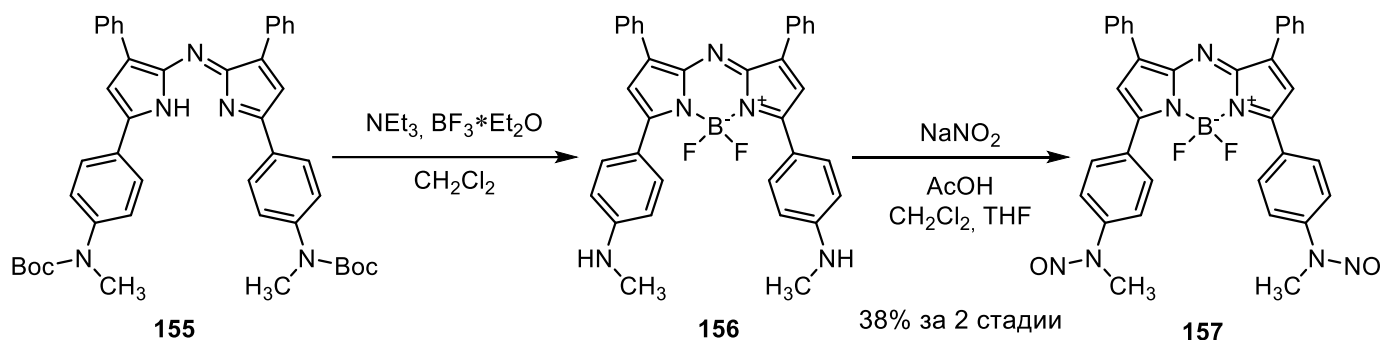


Схема 68

Также было интересно получить водорастворимые соединения-доноры на основе aza-BODIPY. Предполагалось использовать альдегиды **158** и **159** для получения соединений предшественников, чтобы в дальнейшем на финальном этапе получить четвертичные аммонийные соли (Схема 69).

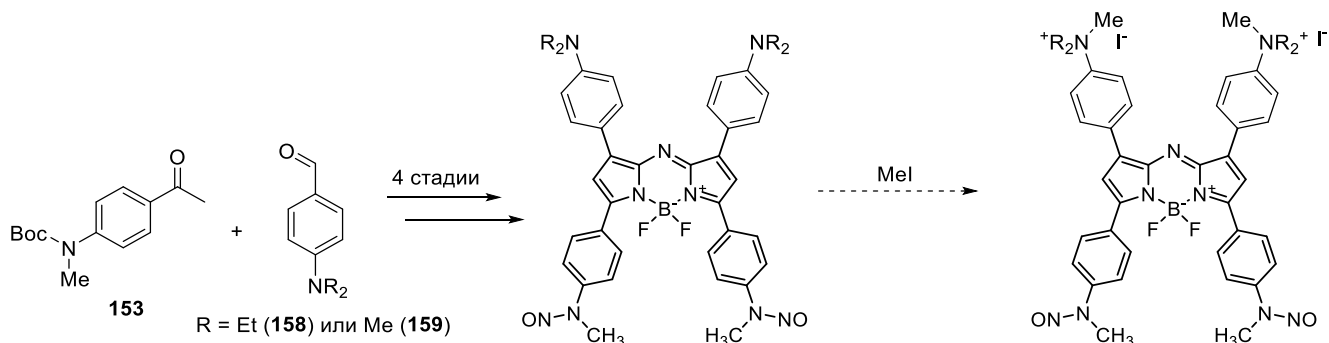
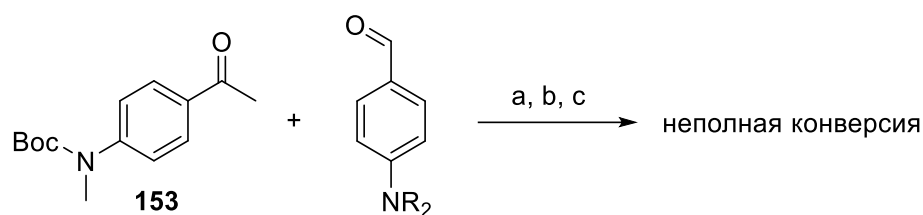


Схема 69. Предполагаемая схема получения четвертичных аммонийных солей aza-BODIPY

Сначала, полученный ацетофенон **153** вводили в реакции конденсации с **158** или **159**. Было обнаружено, что проведение реакции конденсации в спиртовом растворе (а), водно-спиртовом растворе (б), а также в условиях твердофазного синтеза (с) не позволило получить продукт с полной конверсией реагентов, что крайне осложняло очистку целевого продукта (Схема 70). Кроме того, в отличие от получения более простых халконов, получаемых из бензальдегида или акцепторнозамещенных ароматических альдегидов, когда целевой продукт

выпадает в осадок при обработке реакционной смеси, в нашем случае при обработке реакционной смеси получалось масло, что также затрудняло выделение целевых продуктов.



R = Et или Me

a = EtOH, b = EtOH/H<sub>2</sub>O, c = без растворителя

Схема 70

Далее была испробована методика конденсации с использованием енолята кетона, генерируемого с помощью эфирата трехфтористого бора в диоксане [180]. Однако, в результате реакции были выделены исходный альдегид, а также продукт снятия Boc-защиты с ацетофенона **153**. (Схема 71)

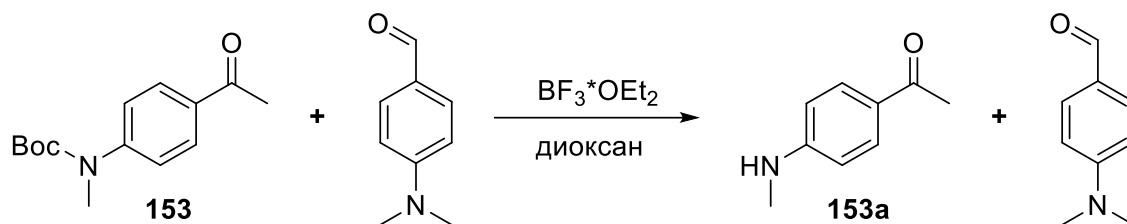


Схема 71

Следующим шагом стали попытки получить силиловые эфиры ацетофенона **153**, для последующего введения в реакцию Мукаямы. Однако, при проведении реакций соединения **153** как с TMS-Cl, так и с TBDMS-Cl согласно литературным методикам, был выделен лишь исходный ацетофенон [181; 182] (Схема 72).

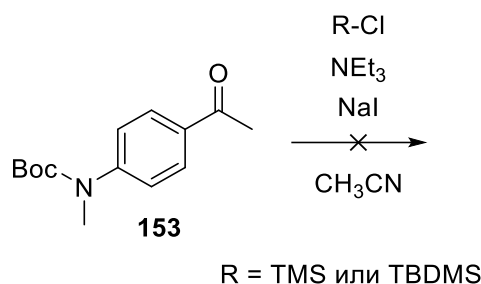


Схема 72

Наконец, было решено провести альдольную конденсацию с использованием титановых енолятов, генерируемых *in-situ* с использованием  $\text{TiCl}_4$ . Для этого, колбу с раствором вещества **153** в сухом хлористом метиле продували аргоном и охлаждали до  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ . Затем последовательно добавляли раствор  $\text{TiCl}_4$  в DCM, DIPEA в качестве основания и раствор соответствующего альдегида. В результате реакции получался флуоресцирующий продукт **160** и непрореагировавший альдегид, который отделялся с помощью колоночной хроматографии с использованием неполярного элюента (Hex:EtOAc = 10:1). (Схема 73)

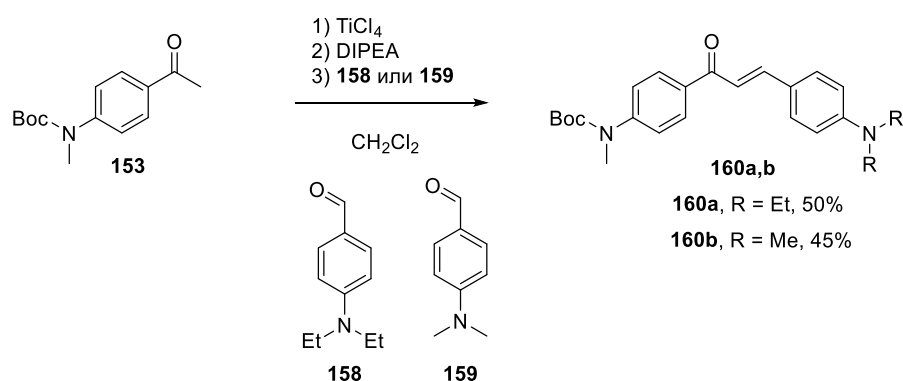


Схема 73. Синтез халконов **160a,b**

В связи с тем, что выделение целевых халконов оказалось нетривиальной задачей, мы сосредоточились на работе с веществом **160a**, который вводили в реакцию Михаэля с нитрометаном в этаноле в присутствии каталитического количества поташа. В результате реакции получали продукт **161** с практически количественным выходом, который в дальнейшем использовали без дополнительной очистки (Схема 74).

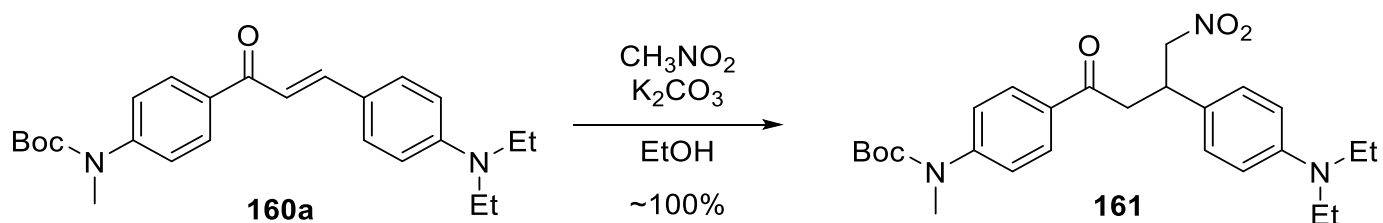


Схема 74. Синтез соединения **161**

Продукт **162** получали по стандартной литературной методике – кипячение субстрата в спирте с избытком ацетата аммония. Однако в нашем случае, вероятно

из-за наличия аминогрупп, при кипячении в течение 5 дней в этаноле продукт **162** был получен с выходом лишь 7%.

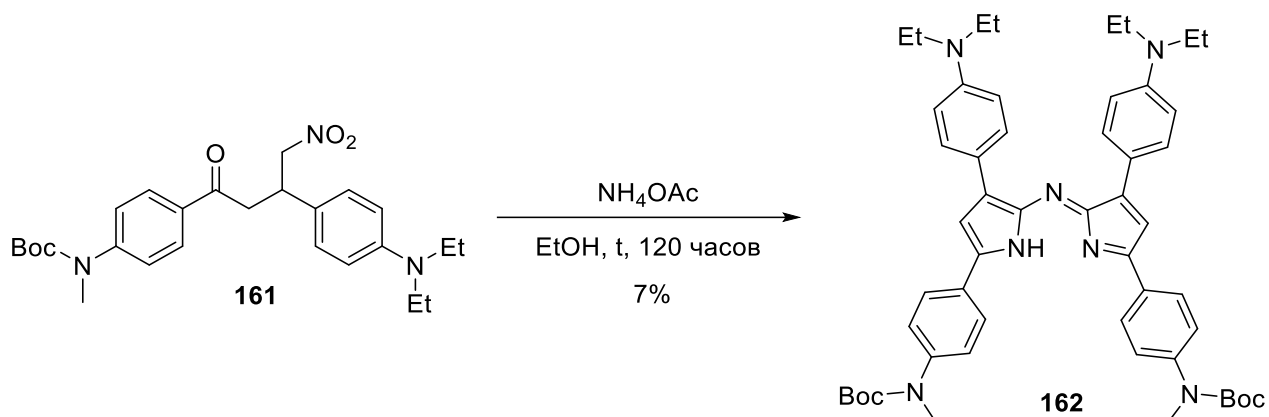


Схема 75. Синтез соединения **162**

Мы также провели реакцию в расплаве ацетата аммония, однако, в результате была получена сложная смесь продуктов, не содержащих Boc-группу согласно данным ЯМР. Далее продукт **162** вводили в реакцию с эфиром трехфтористого бора в присутствии DIPEA в безводном хлористом метиле. В результате реакции был получен продукт **163** с выходом 92%. Однако при проведении реакции нитрозирования с помощью  $\text{NaNO}_2$  в системе ТГФ/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /AcOH была получена сложная смесь веществ, из которой не удалось выделить целевой продукт N-нитрозирования. По-видимому, реакция нитрозирования также пошла по ароматическим фрагментам, которые содержат сильные донорные заместители.

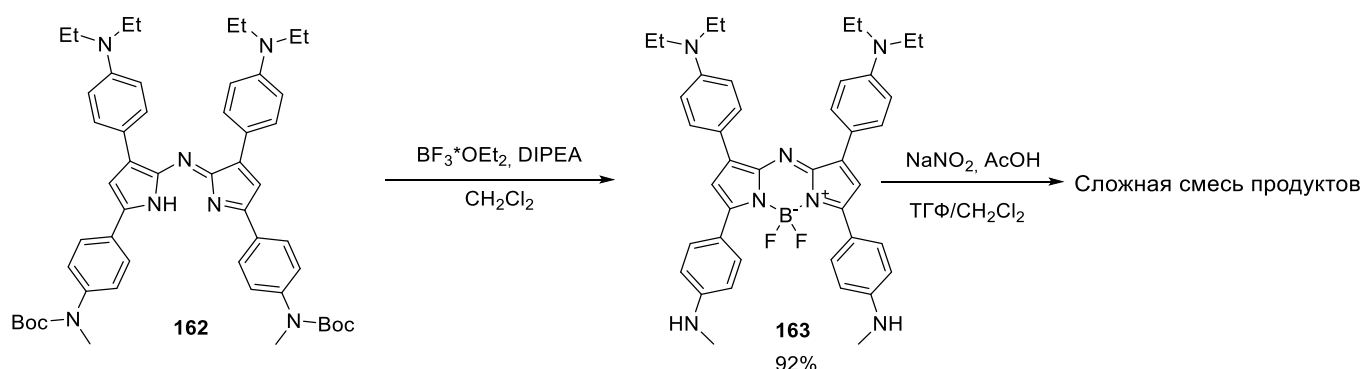


Схема 76. Синтез aza-BODIPY **163**

Также нам было интересно получить aza-BODIPY, содержащий карбоксильные группы в боковых заместителях, чтобы иметь возможность в

дальнейшем получить различные сложные эфиры. Для этого халкон **166** получали реакцией конденсации между ацетофеноном (**158**) и 4-карбоксивензальдегидом (**159**) в метаноле (Схема 77).

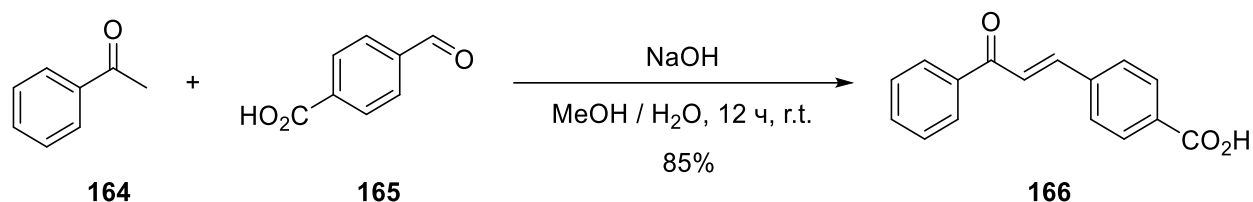


Схема 77

Полученный халкон **166** вводили в реакцию Михаэля с нитрометаном в этаноле, в присутствии поташа в качестве основания (Схема 78). Продукт **161** использовали без дополнительной очистки.

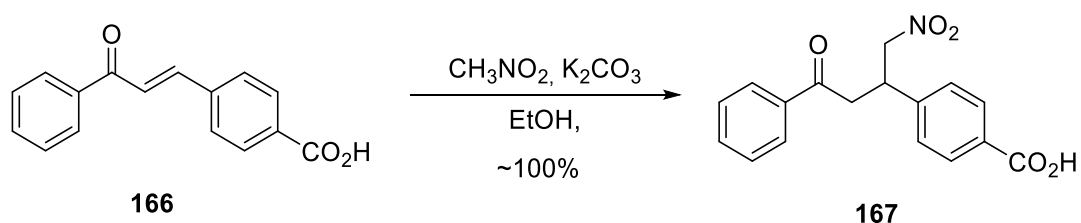


Схема 78

Кипячение соединения **167** в этаноле с избытком ацетата аммония в течение суток позволило получить продукт **168** с выходом 12% (Схема 79).

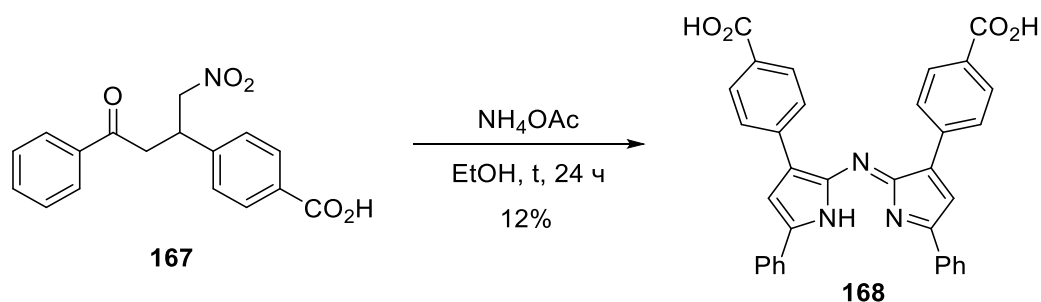


Схема 79

Однако реакцию соединения **168** с эфиром трехфтористого бора в присутствии DIPEA не удалось осуществить ни в хлористом метиле, ни при кипячении в толуоле (Схема 80).

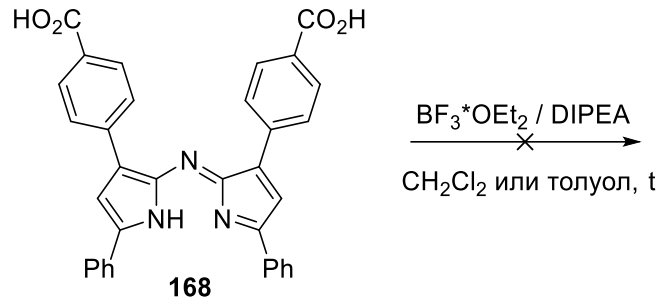


Схема 80

Также были опробованы несколько альтернативных подходов к получению аналогов соединения **162**. Было получено соединение **171** из 4-формилбензойной кислоты в несколько стадий из по следующей схеме (Схема 81).

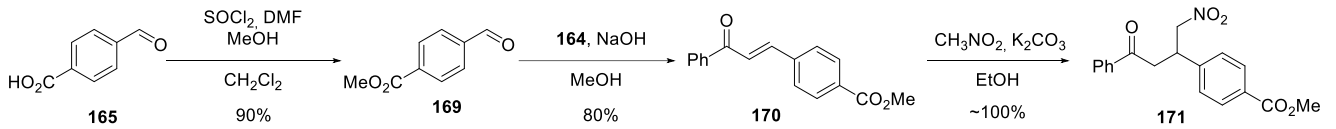


Схема 81

Полученное соединение **171** вводилось в реакцию с избытком ацетата аммония, однако выделить чистый продукт реакции нам не удалось (Схема 82).

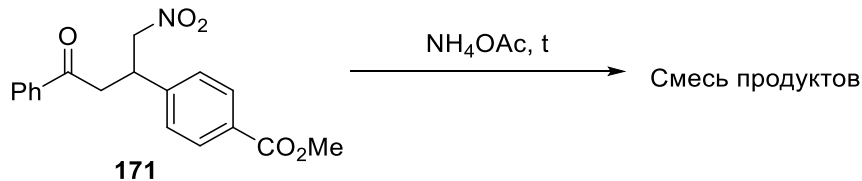


Схема 82

### 3.6 Фотохимические исследования aza-BODIPY **157**

Спектр поглощения aza-BODIPY **157** и его изменения при облучении показаны на рисунке 35А. Максимум полосы поглощения в этаноле находится на 672 нм (красная линия). При облучении светом с длиной волны 660 нм происходит превращение **157** в «другую форму», что сопровождается появлением новой полосы поглощения на длине волны 736 нм, при этом наблюдается изобестическая точка на 700 нм. Это явление согласуется с литературными данными о похожих соединений, в которых превращение связано с выделением NO [42; 183]. Вероятно, благодаря внутримолекулярному переносу электрона от фрагмента N-NO к остову aza-BODIPY флуоресценция соединения **157** незначительна.

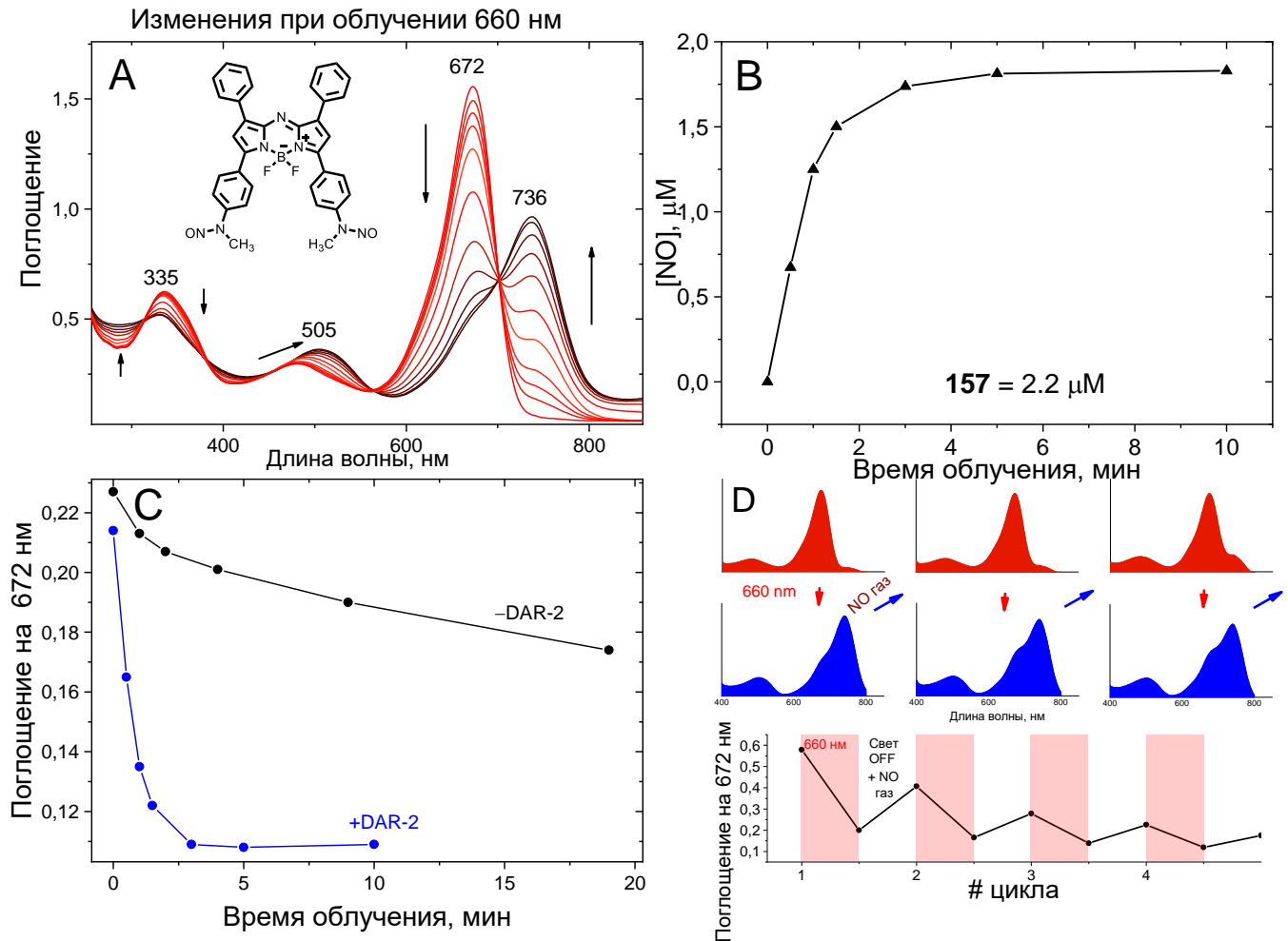


Рисунок 35. (А) Структура фотодонора **157** и изменения его спектра поглощения при освещении светодиодами с длиной волны 660 нм; (В) Выделение NO, измеренное с помощью флуоресцентного зонда DAR-2; (С) Сравнение динамики изменения спектра поглощения (уменьшение пика поглощения 672 нм) в присутствии DAR-2 и без него; (D) Демонстрация обратимости фотовысвобождения NO с использованием четырех циклов применения света/газа NO.

Бао (Бао) и коллеги сообщили о схожей структуре [183] и описали образование J-агрегатов как интересный подход к сдвигу полосы поглощения в инфракрасную область. Были проведены опыты в смеси вода/ДМСО с целью исследовать степень агрегации **157**. Однако, в результате увеличения содержания воды в растворе (Рисунок 36) наблюдалось лишь уширение спектра поглощения и уменьшение флуоресценции, что свидетельствует об отсутствии J-агрегатов [184].

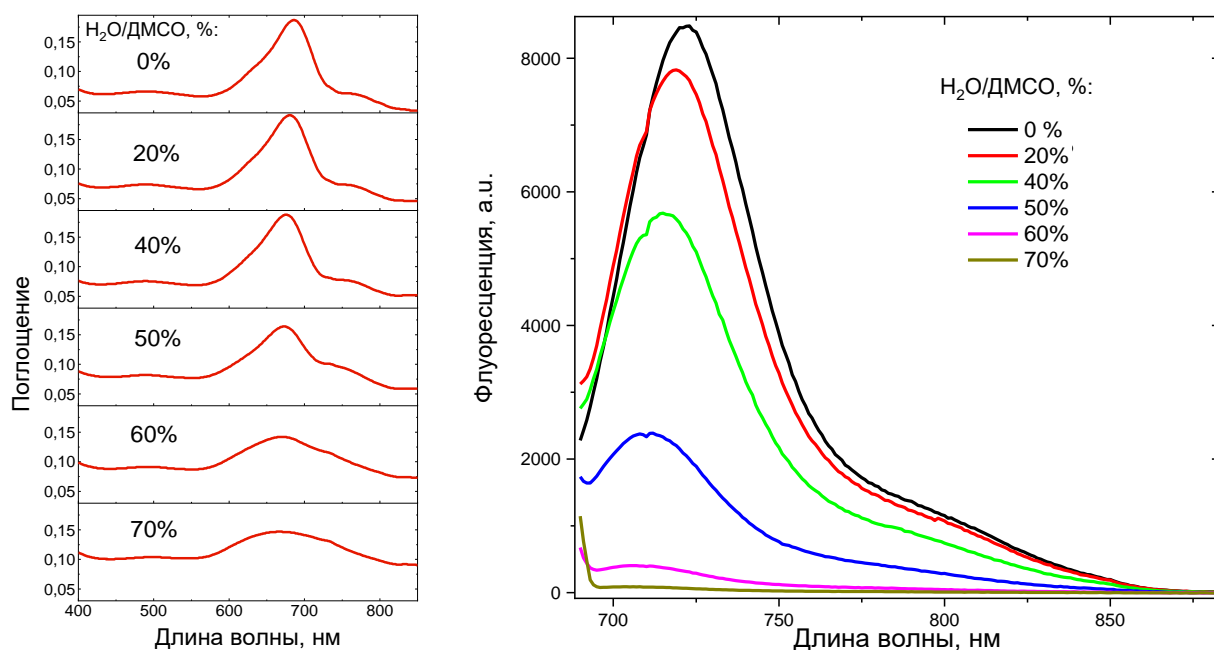


Рисунок 36. (А): изменения спектра поглощения **157** с увеличением соотношения вода/ДМСО. (В): влияние содержания воды на флуоресценцию (возбуждение 672 нм)

Выход высвобождения NO из **157** был оценен с помощью флуоресцентного зонда DAR-2 [99; 185]. Двухкратный избыток DAR-2 добавляли к раствору **157** в этаноле, и измеряли интенсивность флуоресценции ( $\lambda_{\text{exc}} = 540$  нм) каждую минуту фотолиза. Наблюдалось 20-ти кратное увеличение интенсивности флуоресценции (флуоресценция донора незначительна при данной длине возбуждения). Концентрация NO была вычислена из измеренной флуоресценции согласно методу, описанному в экспериментальной части. Результаты представлены на рисунке 35В. Количество зафиксированного NO соответствует ~80% количеству от начальной концентрации **157**, в то время как теоретический максимальный выход должен быть равен 200% (две молекулы NO могут быть выделены одной молекулой **151**). Однако, можно предположить, что не каждая молекула NO улавливается ловушкой DAR-2 из-за других конкурирующих реакций. При использовании реагента Грисса удалось зафиксировать практически двухкратную концентрацию нитритов по отношению к **157** (Приложение 10).

Интересной особенностью является то, что изменения спектра поглощения происходят намного быстрее в присутствии ловушки DAR-2 или реагента Грисса

(Рисунок 35С). Очевидно, что это происходит из-за необратимого «удаления» NO из системы. Это привело нас к выводу, что NO может обратно присоединяться к продукту фоторазложения значительно замедляя высвобождение. Такое N-нитрозирование уже было описано в литературе [186]. Чтобы напрямую установить возможность обратной реакции, мы добавили NO донор (NONO-ат) к реакционной смеси и наблюдали обратное изменение спектра поглощения. Последующее облучение привело к «прямому» эффекту. Для более детального изучения этого эффекта мы провели серию опытов, чередуя облучение и пропускание газообразного NO через раствор в кювете (Рисунок 35D). Пропускание NO через бесцветный раствор после фотолиза (содержащий диамин **157**) восстанавливало изначальный бриллиантово-зеленый цвет раствора исходного донора. Последующее облучение приводило к тому же изменению спектра поглощения, но сопровождалось уменьшением интенсивности полосы поглощения. Стоит отметить, что уменьшение интенсивности полосы поглощения соотносилось с длительностью пропускания NO, что может быть связано с побочными реакциями **157** с избытком NO, приводящими к фотонестабильным соединениям.

Таким образом, было установлено, что фотолиз **157** является обратимым процессом и происходит согласно схеме 83. Это является интересной особенностью, которая позволяет использовать это соединение не только в качестве источника NO, но и в качестве буферной системы, способной улавливать NO в темноте для дальнейшего фотовысвобождения при облучении.

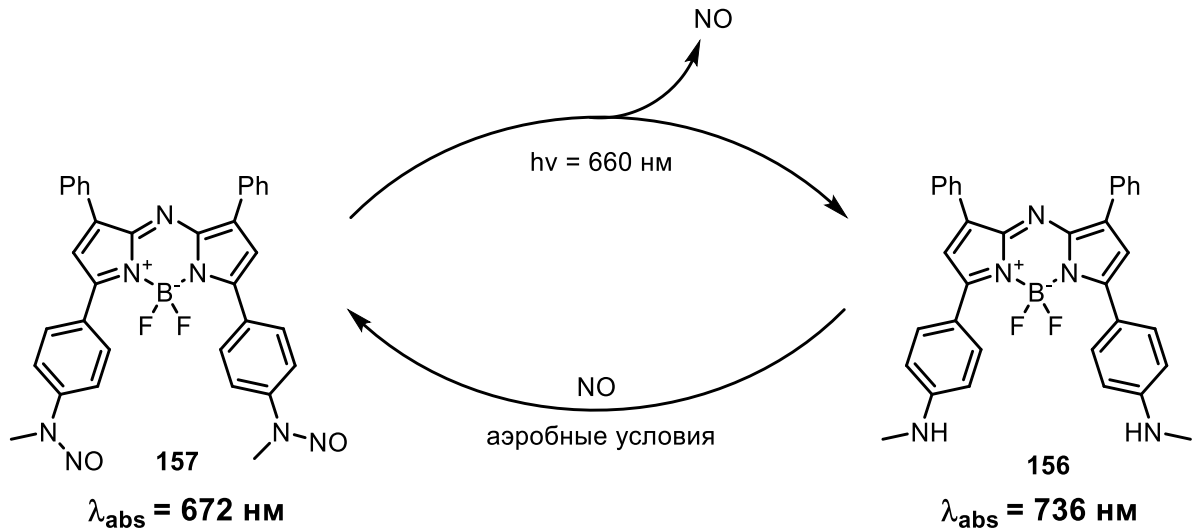


Схема 83. Схема фотоиндуцированных реакций **157**

Нашими коллегами из лаборатории оптики и динамики биологических систем НГУ была разработана установка с системой обратной связи с использованием донора **157**, позволяющая поддерживать постоянную заданную концентрацию NO в растворе *in vitro*.

На рисунке 37 представлена схема экспериментальной установки для фотоиндуцированной генерации NO. Луч лазера с длиной волны 660 нм и мощностью 50 мВт (CrystaLaser DL660-050) пропускали через 1 мМ раствор **157** в ДМСО. Мощность лазера модулируется ШИМ-выходом микроконтроллера Arduino, подключенным к TTL-входу лазерного контроллера. Для измерения концентрации NO использовался электрохимический датчик ISO-NOP. Диаметр датчика (2 мм) совпадал с размером лазерного луча, поэтому он был использован без дополнительной фокусировки. Датчик помещали в клетку Фарадея, чтобы избежать влияния внешних электрических полей. В правой части рисунка 36 показана схема датчика и его окружения. Датчик погружен в капилляр, заполненный водным раствором серной кислоты (0,1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в H<sub>2</sub>O). Кислотная среда необходима для увеличения времени жизни NO. Слой пленки Parafilm®, играющий роль газопроницаемой мембраны, разделяет содержимое капилляра и органическую фазу. Луч лазера вызывает высвобождение NO, который определяется датчиком, что приводит к увеличению тока. Ток преобразуется в

напряжение с помощью анализатора WPI TBR 1025. В свою очередь, напряжение измеряется аналогово-цифровым преобразователем и считывается микроконтроллером Arduino. Микроконтроллер передает данные на персональный компьютер и получает обратно команды для управления мощностью лазера. Стоит отметить, что сенсор имеет собственную NO-селективную мембрану, несовместимую с органическими растворителями. По этой причине мы использовали другую мембрану для защиты сенсора от ДМСО.

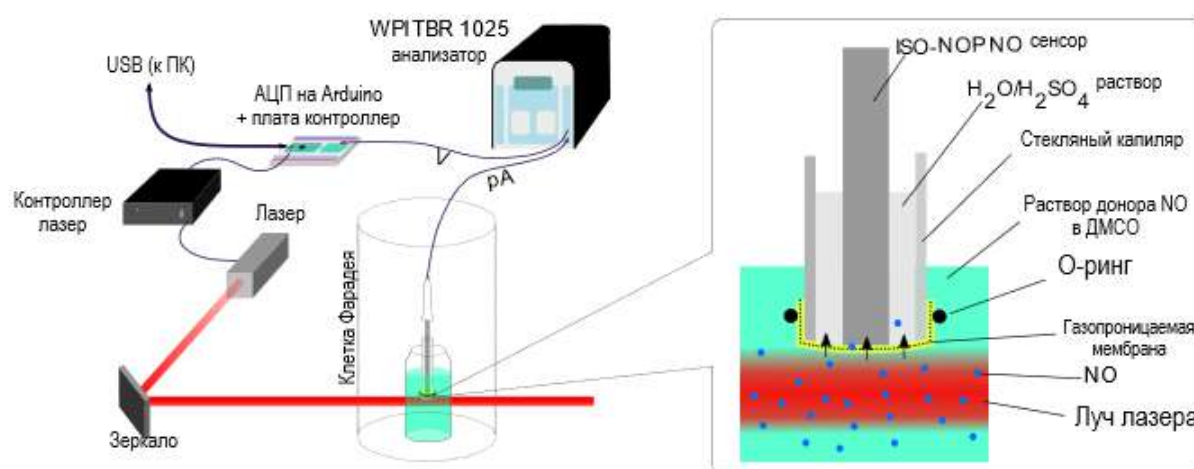


Рисунок 37. Экспериментальная установка для фотоиндуцированной генерации NO. Слева: общая схема; справа: схема сенсора, отделенного от раствора фотодонора NO газопроницаемой мембраной.

В результате работы был получен донор **157**, способный выделять NO под воздействием ближнего инфракрасного света в зависимости от интенсивности используемого излучения. В отсутствии света вещество способно обратимо присоединять NO, работая как буферная система. Также на основе полученного вещества была реализована система с обратной связью, позволяющая активно поддерживать заданную концентрацию оксида азота в образце, управляя интенсивностью лазерного излучения [187].

### Выводы

- 1) Предложены подходы к синтезу 1,2-диамино-10-(карбоксиметил)-9(10*H*)-акридона и 7,8-диамино-4-карбокси-10-метил-9(10*H*)акридона. Было показано, что 7,8-диамино-4-карбокси-10-метил-9(10*H*)акридон способен успешно взаимодействовать с оксидом азота (II) с образованием флуоресцирующего продукта и визуализировать NO *in vitro* в клеточной культуре Jurkat;
- 2) Получен ряд производных BODIPY, содержащих в *мезо*-положении арильный заместитель со стерически напряженной нитрогруппой и исследовано влияние заместителей на фотофизические и фотохимические свойства. Показано, что изменения заместителей могут приводить к изменению интенсивности флуоресценции вплоть до двух порядков, а йодированное производное характеризуется высокой эффективностью генерации синглетного кислорода. Также показано, что для полученных соединений характерна агрегационно-индуцируемая эмиссия с появлением дополнительной полосы флуоресценции в красной области;
- 3) Исходя из легкодоступного *мезо*-хлорметил-1,3,5,7-тетраметил-BODIPY были получены производные BODIPY, содержащие CH<sub>2</sub>N(NO)R-группу (R = Ph, *i*-Pr) в *мезо*-положении. Показано, что наибольшую эффективность фотовысвобождения NO проявляют соединения с R = Ph и группой BF<sub>2</sub> в остове BODIPY. Замена BF<sub>2</sub> на BMe<sub>2</sub> приводит к снижению эффективности генерации NO, а введение атомов йода в остов BODIPY приводит к дополнительной генерации синглетного кислорода. С помощью донора *N*-((5,5-дифтор-1,3,7,9-тетраметил-5*H*-4λ<sup>4</sup>,5λ<sup>4</sup>-дипирроло[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]диазаборинин-10-ил)метил)-*N*-фенилнитрозида была продемонстрирована возможность фотодезактивации тромбоцитов *in vitro*;
- 4) Получен *N,N'*-((5,5-дифтор-1,9-дифенил-5*H*-4λ<sup>4</sup>,5λ<sup>4</sup>-дипирроло[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,5,2]триазаборинин-3,7-диил)бис(4,1-фенилен))бис(*N*-

метилнитрозоамид), сочетающий остов aza-BODIPY и два фрагмента N-NO. Показано, что данное вещество обратимо выделяет NO при облучении светом с длиной волны 660 нм. На основе полученного NO-донора было разработано устройство с системой обратной связи, позволяющее поддерживать заданную концентрацию оксида азота (II) в растворе.

#### Глава 4. Экспериментальная часть

Все вещества были приобретены из коммерческих источников и использовались без дополнительной очистки, если не указано иное. За ходом реакций следили с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на силикагеле Silica gel 60 F254 закрепленного на алюминиевой подложке. Спектры ЯМР записаны на спектрометрах Bruker Avance-300 (300,13 МГц для  $^1\text{H}$ ) и Avance-400 (400,13 МГц для  $^1\text{H}$ , 100,62 МГц для  $^{13}\text{C}$ ); химические сдвиги  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  { $^1\text{H}$ } даны в м.д., сигналы растворителя служат в качестве внутреннего стандарта ( $^1\text{H} = 7,24$  м.д. и  $^{13}\text{C} = 77,16$  м.д. для Хлороформ-d). Массы молекулярных ионов определяли масс-спектрометрией высокого разрешения (HRMS) с помощью прибора DFS Thermo Scientific (EI, 70 эВ).

Спектры поглощения регистрировались на спектрометре Shimadzu UV-1900. Спектры флуоресценции регистрировались с помощью флуориметра Shimadzu RF-6000. Квантовые выходы определяли с использованием родамина 6G ( $10^{-6}$  М раствор в  $\text{H}_2\text{O}$ ) в качестве стандарта. Для определения в других растворителях учитывалась разница показателей преломления с помощью коэффициента  $(n_{\text{solvent}}/n_{\text{EtOH}})^2$ .

Люминесценцию синглетного кислорода измеряли с помощью ранее описанного метода [161].

Фотолиз проводили в кварцевых кюветах используя светодиоды (500 нм, 520 нм и 660 нм в зависимости от соединения). Светодиоды, на которые подавался ток 0,25А, закреплялись непосредственно напротив кюветы.

##### Синтез акридонов:

**Метил-10-метил-9-оксо-9,10-дигидроакридин-4-карбоксилат (124).** 2,3 г (9,6 ммоль) 4-карбокси-9(10*H*)-акридона растворяли в 30 мл ДМСО. Затем медленно добавляли 1,52 г (28,8 ммоль) NaH при непрерывном перемешивании. После добавления NaH к смеси по каплям добавляли 4,1 г (28,8 ммоль) MeI. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре до исчезновения исходного вещества по ТСХ. Реакционную смесь разбавляли

водой до образования осадка. Полученный осадок отфильтровали и несколько раз промывали водой. Зеленое твердое вещество. Выход 2,1 г (82%). Т.пл. 164.8°C.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d)  $\delta$  = 3.69 (с, 3H), 3.98 (с, 3H), 7.29 (м, 2H), 7.44 (д, J=8.5, 1H), 7.71 (ддд, J=8.7, 7.0, 1.7, 1H), 8.02 (дд, J=7.4, 1.8, 1H), 8.44 (дд, J=8.0, 1.7, 1H), 8.63 (дд, J=7.9, 1.8, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц, Хлороформ-d)  $\delta$  41.6, 52.6, 116.4, 120.4, 121.4, 122.1, 122.9, 124.6, 127.1, 131.1, 134.0, 136.0, 143.0, 144.2, 168.3, 177.7. HRMS: расч  $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{N}_1$  267.0890 m/z, найдено 267.0892 m/z.

**Метил 10-метил-7-нитро-9-оксо-9,10-дигидроакридин-4-карбоксилат (125).** 2 г (7,5 ммоль) **124** суспендировали в 45 мл ледяной уксусной кислоты. Смесь нагревали до 60°C и добавляли смесь 6,67 мл азотной кислоты и 6,67 мл уксусной кислоты. Реакцию перемешивали до завершения по результатам ТСХ. Реакционную смесь выливали в воду со льдом. Полученный осадок отфильтровали и тщательно промывали водой. Полученное твердое вещество содержало 2-нитро-изомер и следовые количества 5-нитро-изомера. Желтое твердое вещество, используемое без очистки. Выход 1,68 г (72%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  = 3.72 (д, J=3.4, 3H), 3.98 (с, 3H), 7.49 (м, 1H), 7.91 (д, J=9.3, 1H), 8.12 (дд, J=7.4, 1.8, 1H), 8.44 (дд, J=8.0, 1.8, 1H), 8.55 (дд, J=9.4, 2.8, 1H), 8.93 (д, J=2.8, 1H).

**Метил 7-амино-10-метил-9-оксо-9,10-дигидроакридин-4-карбоксилат (126).** Смесь 1,25 г (0,004 моль) **125**, 0,43 г Pd/C и 2 мл (0,04 моль)  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  в 75 мл EtOH кипятили с обратным холодильником при перемешивании в течение 1 часа. Затем реакционную смесь фильтровали в горячем состоянии и несколько раз промывали Pd/C горячим этанолом. Объем фильтрата уменьшали при пониженном давлении приблизительно до 20 мл и убирали в морозилку. Выпавший осадок отфильтровали. Собирали фильтрат и упаривали при пониженном давлении. Остаток высушивали на воздухе. Оранжевое твердое вещество, использовали без дополнительной очистки. Выход 0,595 г (53%).  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  = 3.60 (с, 3H), 3.93 (с, 3H), 7.21 (м, 1H), 7.28 (д, J=7.5, 1H), 7.42 (д, J=2.8, 1H), 7.50 (д, J=9.1, 1H), 7.99 (дд, J=7.3, 1.8, 1H), 8.43 (дд, J=7.9, 1.8, 1H).

**Метил 7-ацетидамо-10-метил-8-нитро-9-оксо-9,10-дигидроакридин-4-карбоксилат (127).** К раствору 0,6 г (2,13 ммоль) **126** в 12 мл ледяной уксусной кислоты добавляли 1 мл  $\text{As}_2\text{O}_3$ . Реакционную смесь перемешивали при 60 °С в течение 1 часа, а затем добавляли смесь 1,9 мл азотной кислоты и 1,9 мл ледяной уксусной кислоты. За реакцией следили с помощью ТСХ до исчезновения исходного соединения. По окончании реакции реакцию смесь выливали в воду со льдом, выпавший осадок отфильтровывали и тщательно промывали водой. Желтое твердое вещество с примесями (примерно 20%), использовали без очистки. Выход 0,58 г (74%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  = 2.05 (с, 3H), 3.71 (с, 3H), 3.97 (с, 3H), 7.46 (т,  $J=7.7$ , 1H), 8.00 (м, 2H), 8.12 (д,  $J=6.8$ , 2H), 8.35 (д,  $J=7.8$ , 1H), 9.97 (с, 1H).

**7-амино-10-метил-8-нитро-9-оксо-9,10-дигидроакридин-4-карбоновая кислота (128).** 0,56 г соединения **127** добавляли к 37,5 мл 4N раствора NaOH и кипятили с обратным холодильником до полного растворения начального осадка. Смесь охлаждали до комнатной температуры и нейтрализовали концентрированной HCl до pH ~ 7. Выпавший осадок фильтровали и тщательно промывали водой. Твердое вещество темно-коричневого цвета, полученное в чистом виде. Выход 0.46 г (97%). Разлагается при нагревании в диапазоне 40°-350°С.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  = 3.80 (с, 3H), 7.43 (т,  $J=7.6$ , 1H), 7.67 (д,  $J=9.3$ , 1H), 7.94 (д,  $J=9.4$ , 1H), 8.15 (д,  $J=7.1$ , 1H), 8.37 (д,  $J=7.8$ , 1H), 11.18 (с, 1H), 13.54 (с, 2H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  42.6, 113.7, 120.9, 121.3, 123.3, 123.7, 125.0, 129.2, 134.6, 135.8, 137.2, 141.5, 144.3, 168.9, 173.5.

**7,8-диамино-10-метил-9-оксо-9,10-дигидроакридин-4-карбоновая кислота (129).** Смесь 0,432 г (1,38 ммоль) **128**, 0,15 г Pd/C и 0,7 мл (0,0138 моль)  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  в 50 мл EtOH кипятили с обратным холодильником при перемешивании в течение 1 часа. Затем реакцию смесь фильтровали в горячем состоянии и несколько раз промывали Pd/C горячим этанолом. Фильтрат упаривали на роторном испарителе при пониженном давлении, полученный осадок разбавляли 5 мл воды и подкисляли с помощью концентрированного раствора HCl до pH ~ 7.

Образовавшийся осадок отфильтровывали и промывали водой. Коричневое твердое вещество, полученное в чистом виде. Выход 0,291 г (74%). <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ = 3.54 (с, 3H), 6.47 (д, J=8.7, 1H), 7.11 (д, J=8.6, 1H), 7.21 (т, J=7.6, 1H), 7.96 (дд, J=7.3, 1.8, 1H), 8.35 (дд, J=7.9, 1.8, 1H), 9.37 (с, 1H); <sup>13</sup>C ЯМР (75 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 42.2, 100.0, 108.1, 119.3, 119.7, 122.2, 123.3, 129.2, 135.0, 137.2, 138.6, 140.0, 142.0, 169.2, 179.5.

**6-метил-11-оксо-6,11-дигидро-3H-[1,2,3]триазоло[4,5-а]акридин-7-карбоновая кислота (129a).** К 3 мл охлажденной концентрированной соляной кислоты добавляли 0,015 г (0,21 ммоль) NaNO<sub>2</sub>. После образования бледно-желтого раствора добавляли 0,06 г (0,21 ммоль) **129**. Раствор перемешивали до образования оранжевого осадка. Реакционную смесь разбавляли водой, твердое вещество отфильтровывали и промывали водой. Оранжевое твердое вещество, полученное в чистом виде. Выход 0,048 г (77%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ = 3.79 (с, 3H), 7.07 (д, J=10.1, 1H), 7.43 (т, J=7.6, 1H), 8.07 (м, 2H), 8.32 (дд, J=8.0, 1.7, 1H); <sup>13</sup>C ЯМР (75 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 42.1, 74.9, 112.9, 122.5, 122.9, 124.5, 128.5, 130.5, 131.3, 135.1, 135.6, 140.4, 168.8, 171.1, 177.0.

**Метил 3,6-диметил-11-оксо-6,11-дигидро-3H-[1,2,3]триазоло[4,5-а]акридин-7-карбоксилат (129b).** 0,090 г (0,31 ммоль) **129a** суспендировали в 5 мл ДМФ. При охлаждении и перемешивании к реакционной смеси добавляли 0,035 г (0,92 ммоль) NaN. Смесь перемешивали в течение 15 минут, а затем по каплям добавляли 0,130 г (0,92 ммоль) MeI. Реакционную смесь перемешивали еще 3 часа, разбавляли водой и образовавшийся осадок отфильтровывали и промывали водой. Темное твердое вещество, полученное в чистом виде. Выход 0,010 г (10%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ = 3.30 (с, 3H), 3.74 (с, 3H), 3.96 (с, 3H), 7.10 (д, J=10.1, 1H), 7.47 (т, J=7.6, 1H), 8.08 (м, 2H), 8.41 (дд, J=8.1, 1.8, 1H). HRMS: рас C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, 322.1060 m/z; найдено 322.1066 m/z.

**Этиловый эфир 10-(карбоксиметил)-9(10H)акридона (130).** К перемешиваемому раствору **123** 1,87 г (9,57 ммоль) в 10 мл ДМФ при 60 °C добавляли 0,57 г (14,4 ммоль) NaN. Смесь перемешивали еще 15 минут, а затем

добавляли 2,07 г (12,5 ммоль) этилового эфира бромуксусной кислоты. Реакционную смесь перемешивали 3 часа, охлаждали до комнатной температуры и выливали в воду. Полученный осадок отфильтровывали и несколько раз промывали водой. Полученное твердое вещество перекристаллизовывали из этанола. Бледно-желтое твердое вещество. Выход 1,48 г (55%).  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  1.20 (т, J = 7.1 Гц, 3H), 4.18 (кв, J = 7.1 Гц, 2H), 5.40 (с, 2H), 7.33 (т, J = 7.4 Гц, 2H), 7.62 (д, J = 8.7 Гц, 2H), 7.78 (т, J = 8.7 Гц, 2H), 8.32 (дд, J = 8.0, 1.7 Гц, 2H). Спектр ЯМР соответствует литературному [188].

**Этиловый эфир 2-нитро-10-(карбоксиметил)-9(10H)акридоны (131).** 0,670 мл (15 ммоль) азотной кислоты добавляли к смеси 1,4 г (5 ммоль) **130**, а затем 3,3 мл (35 ммоль) уксусного ангидрида в 15 мл уксусной кислоты. Смесь перемешивали 1,5 часа при 60 °С. Полученную смесь охлаждали до комнатной температуры и нейтрализовали 10% раствором NaOH. Выпавший осадок отфильтровывали и несколько раз промывали водой. Желтое твердое вещество. Выход 1,63 г (100%). Т.пл. 196.5-201.4 °С.  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  1.22 (т, J = 7.1 Гц, 3H), 4.20 (кв, J = 7.1 Гц, 2H), 5.50 (с, 2H), 7.44 (т, J = 7.5 Гц, 1H), 7.70 (д, J = 8.7 Гц, 1H), 7.82 – 7.91 (м, 2H), 8.33 (дд, J = 8.0, 1.7 Гц, 1H), 8.48 (дд, J = 9.5, 2.9 Гц, 1H), 9.01 (д, J = 2.9 Гц, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  14.1, 47.6, 61.4, 115.8, 117.4, 120.5, 121.1, 121.6, 121.8, 126.0, 126.7, 133.5, 134.4, 140.9, 142.1, 168.7, 176.8. HRMS: рас  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_5\text{N}_2$  326.0897 m/z, найдено 326.0901 m/z.

**Этиловый эфир 2-амино-10-(карбоксиметил)-9(10H)акридоны (132).** Смесь 0,75 г (23 ммоль) **131**, 0,080 г Pd / C, 1,3 мл (0,035 моль) муравьиной кислоты и 4,2 мл (34,5 моль)  $\text{NEt}_3$  в 20 мл этанола кипятили с обратным холодильником в течение 2 часов. Полученную смесь отфильтровывали горячей и промывали Pd/C горячим этанолом. Этанол упаривали при пониженном давлении. Остаток перекристаллизовывали из этанола. Оранжевое твердое вещество. Выход 0,34 г (50%). Т.пл. 241.4-244.3 °С.  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  1.23 (т, J = 7.1 Гц, 3H), 4.20 (кв, J = 7.0 Гц, 2H), 5.34 (с, 2H), 7.15 (дд, J = 9.1, 2.9 Гц, 1H), 7.25 (т, J = 7.4 Гц,

1H), 7.42 (д, J = 9.2 Гц, 1H), 7.49 (д, J = 2.8 Гц, 1H), 7.55 (д, J = 8.7 Гц, 1H), 7.71 (т, J = 7.9 Гц, 1H), 8.30 (д, J = 8.3 Гц, 1H).

**Этиловый эфир 2-ацетамид-1-нитро-10-(карбоксиметил)-9(10H)акридон (133).** Соединение **132** 0,34 г (1,27 ммоль) добавляли к смеси 10 мл уксусной кислоты и 0,6 мл уксусного ангидрида. Реакционную смесь перемешивали 1,5 часа при 60 °С. По окончании реакции смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли водой до образования осадка. Выпавший осадок отфильтровали, промыли водой. Желтое твердое вещество, использовали без очистки. Выход 55% (0,237 г). <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 1.24 (т, J = 7.1 Гц, 3H), 2.08 (с, 2H), 4.21 (q, J = 7.1 Гц, 2H), 5.42 (д, J = 3.2 Гц, 2H), 7.29 – 7.38 (м, 1H), 7.58 – 7.68 (м, 2H), 7.75 – 7.84 (м, 1H), 8.01 (дд, J = 9.3, 2.7 Гц, 1H), 8.34 (дд, J = 8.0, 1.7 Гц, 1H), 8.55 (д, J = 2.6 Гц, 1H), 10.20 (с, 1H); <sup>13</sup>C ЯМР (75 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 14.4, 24.3, 47.83, 61.7, 115.5, 115.91, 116.7, 121.4, 121.8, 122.1, 126.7, 127.0, 134.1, 134.4, 138.5, 142.1, 168.7, 169.0, 176.8.

Смесь 0,2 г (0,59 ммоль) полученного ацетамида, 0,3 мл (3 ммоль) уксусного ангидрида и 0,06 мл (1,18 ммоль) азотной кислоты в 5 мл уксусной кислоты перемешивали при 60° С до завершения реакции с помощью ТСХ. Полученную смесь охлаждали до комнатной температуры, выливали в воду и нейтрализовали раствором гидроксида натрия. Выпавший осадок отфильтровывали и несколько раз промывали водой. Полученное твердое вещество перекристаллизовывали из этанола. Желтое твердое вещество. Выход 0,097 г (40%). <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, Хлороформ-*d*) δ 0.99 (т, J = 7.1 Гц, 3H), 1.84 (с, 3H), 3.98 (q, J = 7.2 Гц, 2H), 4.87 (с, 2H), 6.95 – 7.11 (м, 2H), 7.19 – 7.27 (м, 1H), 7.44 (с, 1H), 7.75 (д, J = 9.4 Гц, 1H), 8.02 (д, J = 7.7 Гц, 1H), 9.09 (с, 1H); <sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, Хлороформ-*d*) δ 13.3, 22.4, 38.6, 38.8, 39.0, 39.2, 39.4, 39.6, 39.8, 47.9, 61.4, 76.6, 76.9, 77.2, 112.0, 114.0, 116.2, 121.4, 122.0, 123.5, 126.5, 132.5, 134.0, 139.2, 140.6, 142.0, 166.8, 169.6, 173.6.

**2-амино-1-нитро-10-(карбоксиметил)-9(10H)-акридон (134).** Раствор 1 г (25,3 ммоль) гидроксида натрия в 7 мл воды добавляли к 0,097 г (0,253 ммоль) соединения **133**. Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником до

растворения исходного осадка. Полученный раствор охлаждали до комнатной температуры, подкисляли концентрированной соляной кислотой до образования осадка. Осадок отфильтровывали и несколько раз промывали водой. Темно-коричневое твердое вещество. Выход 0,75 г (95%). Разлагается при нагревании в диапазоне 40°-350 °С. <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ = 5.29 (с, 2H), 7.36 (т, J=7.6, 1H), 7.58 (д, J=9.5, 1H), 7.68 (д, J=8.8, 1H), 7.81 (м, 2H), 8.23 (д, J=8.0, 1H). <sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 48.0, 113.0, 115.8, 119.1, 120.9, 122.0, 124.9, 126.3, 134.6, 135.1, 135.4, 141.4, 144.0, 169.7, 173.6.

**1,2-диамино-10-(карбоксиметил)-9(10H)-акридон (135).** Смесь 0,040 г (0,13 ммоль) соединения **134**, 0,072 мл (1,92 ммоль) муравьиной кислоты, 0,230 мл NEt<sub>3</sub> и 0,02 г Pd/C в 10 мл этанола кипятили с обратным холодильником в течение 2 часов. Полученную смесь отфильтровывали горячей, Pd/C промывали горячим этанолом. Растворитель упаривали при пониженном давлении. Остаток разбавляли 5% раствором соляной кислоты и нейтрализовали 5% раствором NaHCO<sub>3</sub>. Выпавший осадок отфильтровали и промыли водой. Темное твердое вещество. Выход 0,021 г (60%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 5.05 (с, 2H), 6.34 (д, J = 8.8 Гц, 1H), 7.07 (д, J = 8.7 Гц, 1H), 7.20 (т, J = 7.5 Гц, 1H), 7.47 (д, J = 8.7 Гц, 1H), 7.67 (т, J = 7.9 Гц, 1H), 8.25 (д, J = 8.0 Гц, 1H); <sup>13</sup>C ЯМР (75 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 47.8, 97.9, 107.9, 114.8, 119.7, 120.1, 121.0, 126.3, 133.5, 136.7, 137.0, 140.1, 141.8, 170.2, 179.9.

#### Синтез BODIPY:

Общая методика (А) для BODIPY **138** и **139**:

Альдегид (1 экв.) добавляли к свежеперегнанному и продутому аргоном пирролу (50 экв) и прибавляли несколько капель трифторуксусной кислоты (TFA). Реакционную смесь перемешивали 40 минут при комнатной температуре. Избыток пиррола удаляли на роторном испарителе при пониженном давлении. Остаток растворяли в 20 мл дихлорметана (DCM) и промывали 30 мл 10% раствора NaOH. Органическую фазу сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали под уменьшенным давлением. Полученное масло растворяли в 50 мл сухого DCM и добавляли DDQ (1,5 экв). Реакционную смесь перемешивали 1 час при комнатной температуре. Затем

добавляли  $\text{NEt}_3$  (8 экв.), перемешивали 15 минут и добавляли  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  (8 экв.), после чего перемешивали еще 1 час. По окончании реакции, органическую фазу промывали несколько раз водой, сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали. Остаток очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле, используя в качестве элюента систему  $\text{DCM}:\text{Гексан} = 2:1$ .

**Общая методика (В) для BODIPY 136 и 137:**

К смеси альдегида (1 экв.) и 2,4-диметилпиррола (2,2 экв.) в заполненной аргоном колбе в 50 мл сухого  $\text{DCM}$  добавляли 3 капли TFA. Реакционную смесь анализировали методом ТСХ и перемешивали до исчезновения исходных продуктов. Смесь охлаждали и добавляли порциями DDQ (1,2 экв.) и перемешивали 2 часа при комнатной температуре. Затем добавляли  $\text{NEt}_3$  (8 экв.), перемешивали 15 минут и добавляли  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  (8 экв.), после чего оставляли смесь перемешиваться на ночь. На следующий день упаривали растворитель и растворяли остаток в колбе в 30 мл  $\text{EtOAc}$ . Органическую фазу промывали раствором соды, водой и рассолом, после чего высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали. Остаток очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле, используя в качестве элюента  $\text{DCM}$ .

**Общая методика (С) для BODIPY 142 и 143:**

Соединение **141** (1 экв.) и KI (2 экв.) кипятили 2 часа в 40 мл ацетонитрила. После чего, смесь охлаждали до комнатной температуры, добавляли  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (2 экв.) и первичный амин (2 экв.) и оставляли на ночь перемешиваться при  $50^\circ\text{C}$ . На следующий день упаривали растворитель, добавляли 20 мл  $\text{EtOAc}$ . Органический слой промывали насыщенным раствором тиосульфата натрия, хлористого аммония и водой, после чего сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали при пониженном давлении на роторном испарителе. Остаток очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле, используя в качестве элюента  $\text{DCM}$ .

**Общая методика (D) для BODIPY 144 и 145:**

BODIPY-вторичный амин (1 экв.) в 30 мл ледяной  $\text{AcOH}$  охлаждали и добавляли  $\text{NaNO}_2$  (10 экв.). Реакционную смесь перемешивали 30 минут при

охлаждении и 1,5 часа при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавляли водой и экстрагировали 50 мл EtOAc. Органическую фазу промывали водой, раствором соды и рассолом, после чего сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Остаток очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле, используя в качестве элюента DCM.

**Общая методика (E) для BODIPY 149 и 151:**

К раствору amino-BODIPY (1 экв.) в безводном DCM добавляли MeMgI (10 экв.) в Et<sub>2</sub>O. Реакционную смесь перемешивали в течение 2,5 часов при комнатной температуре, затем гасили водой и экстрагировали EtOAc. Органическую фазу промывали водой и рассолом, затем сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали.

**Общая методика (F) для BODIPY 150 и 152:**

К охлажденному раствору amino-BOBIPY (1 экв.) в смеси 5 мл DCM и 5 мл ТГФ порциями добавляли 5 мл AcOH и NaNO<sub>2</sub> (5 экв.). Реакционную смесь перемешивали в течение 30 минут на бане со льдом и в течение 2,5 часов при комнатной температуре. Смесь гасили водой и экстрагировали EtOAc. Органическую фазу промывали водой и рассолом, затем сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали на роторном испарителе при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с силикагелем, используя в качестве элюента DCM:Hex = 1:1.

**10-(хлорметил)-5,5-дифтор-1,3,7,9-тетраметил-5H-4λ<sup>4</sup>,5λ<sup>4</sup>-дипирроло[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]диазаборинин (141).** Смесь хлорацетилхлорида (0,5 мл, 6,3 ммоль) и 2,4-диметилпиррола (1 г, 10,5 ммоль) кипятили с обратным холодильником в DCM (5 мл) в течение 2 часов. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и добавляли NEt<sub>3</sub> (2,9 мл, 21 ммоль). Смесь перемешивали 15 минут, охлаждали колбу льдом и добавляли VF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> (4,6 мл, 21 ммоль). Реакционную смесь перемешивали еще 30 минут. После завершения реакции растворитель упаривали при пониженном давлении, остаток разбавляли 24 мл метанольного раствора (MeOH:H<sub>2</sub>O = 2:1) и кипятили с обратным холодильником в течение 20

минут. Реакционную колбу охлаждали в морозильной камере, твердый осадок отфильтровывали и несколько раз промывали водой до тех пор, пока вода не становилась относительно бесцветной. Блестящее зеленое твердое вещество, выход 0,943 г (60%).  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d)  $\delta$  2.52 (с, 12H), 4.76 (с, 2H), 6.08 (с, 2H).  $^1\text{H}$  ЯМР соответствует литературному [66].

**10-(хлорметил)-5,5-дифтор-2,8-дийод-тетраметил-5H-4 $\lambda^4$ ,5 $\lambda^4$ -дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,2]диазаборинин (146).** Смесь **141** (0,1 г, 0,34 ммоль) и NIS (0,341 г, 1,5 ммоль) перемешивали в 10 мл безводного DCM в темноте в течение ночи. На следующий день органический слой промывали насыщенным раствором  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , водой и рассолом, затем сушили над сульфатом натрия и упаривали растворитель при низком давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, используя DCM в качестве элюента. Твердое вещество темно-фиолетового цвета, выход 170 мг (92%).  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d)  $\delta$  2,57 (с, 6H), 2,61 (с, 6H), 4,78 (с, 2H).  $^1\text{H}$  ЯМР соответствует литературному [66].

**10-(3,5-диметил-4-нитрофенил)-5,5-дифтор-5H-4 $\lambda^4$ ,5 $\lambda^4$ -дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,2]диазаборинин (138).** 3,5-диметил-4-нитробензальдегид (250 мг, 1.4 ммоль) и пиррол (4,9 мл, 70 ммоль) вводили в реакцию согласно общей методике А. Темно-оранжевый порошок, выход 72 мг (15%).  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d)  $\delta$  2.39 (с, 6H), 6.56 (д, J = 3.1 Гц, 2H), 6.87 (д, J = 4.2 Гц, 2H), 7.31 (с, 2H), 7.95 (с, 2H).  $^{19}\text{F}$  ЯМР (282 МГц, Хлороформ-d)  $\delta$  -148.18 (м).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, Хлороформ-d)  $\delta$  17.4, 118.9, 129.9, 130.5, 131.2, 134.6, 135.3, 144.5, 144.9, 152.7. HRMS: расчетное значение  $m/z = 341.1142$  ( $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_2\text{N}_3^{11}\text{B}_1\text{F}_2$ )<sup>+</sup>, измеренное значение  $m/z = 341.1140$ .

**5,5-дифтор-10-(4-нитро-3-(трифторметил)фенил)-5H-4 $\lambda^4$ ,5 $\lambda^4$ -дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,2]диазаборинин (139).** 4-нитро-3-(трифторметил)бензальдегид (376 мг, 1.7 ммоль) и пиррол (8 мл, 115 ммоль) вводили в реакцию согласно общей методике А. Темно-оранжевый порошок, выход 168 мг (26%).  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d)  $\delta$  6.61 (д, J = 4.4 Гц, 2H), 6.80 (д, J = 4.3 Гц, 2H), 7.91 (дд, J = 1.9, 8.3 Гц, 1H), 7.97 – 8.09 (м, 4H).  $^{19}\text{F}$  ЯМР (282 МГц,

Хлороформ-d)  $\delta$  -147.78 – -153.53 (м), 101.75 (с).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц, Хлороформ-d)  $\delta$  119.8, 125.2, 129.3, 129.4, 130.9, 134.3, 134.4, 138.1, 141.5, 146.1. **HRMS**: расчетное значение  $m/z = 381.0702$  ( $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{O}_2\text{N}_3^{11}\text{B}_1\text{F}_5$ )<sup>+</sup>, измеренное значение  $m/z = 381.0698$

**10-(3,5-диметил-4-нитрофенил)-5,5-дифтор-1,3,7,9-тетраметил-5H-4 $\lambda^4$ ,5 $\lambda^4$ -дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,2]диазаборинин (136).** 3,5-диметил-4-нитробензальдегид (200 мг, 1,12 ммоль) и 233 мг 2,4-диметилпиррола вводили в реакцию согласно общей методике В. Оранжевый осадок, выход 55 мг (12%).  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d): 1.41 (с, 6H), 2.34 (с, 6H), 2.50 (с, 6H), 5.97 (с, 2H), 7.07 (с, 2H).  $^{19}\text{F}$  ЯМР (282 МГц, Хлороформ-d):  $\delta$  -149.22 (м).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц, Хлороформ-d):  $\delta$  14.4, 14.6, 17.2, 29.5, 121.4, 128.4, 130.7, 136.8, 138.8, 142.5, 151.9, 155.9. **HRMS**: расчетное значение  $m/z = 396.1804$  ( $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{N}_3^{10}\text{B}_1\text{F}_2$ )<sup>+</sup>, измеренное значение  $m/z = 396.1805$ .

**5,5-дифтор-1,3,7,9-тетраметил-10-(4-нитро-3-(трифторметил)фенил)-5H-4 $\lambda^4$ ,5 $\lambda^4$ -дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,2]диазаборинин (137).** 4-нитро-3-(трифторметил)бензальдегид (100 мг, 0,46 ммоль) и 88 мг 2,4-диметилпиррола вводили в реакцию согласно общей методике В. Оранжево-красный осадок, выход 25 мг (13%).  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d)  $\delta$  1.36 (с, 6H), 2.55 (с, 6H), 6.03 (с, 2H), 7.72 (дд,  $J = 1.8, 8.2$  Гц, 1H), 7.83 (д,  $J = 1.9$  Гц, 1H), 8.05 (д,  $J = 8.2$  Гц, 1H).  $^{19}\text{F}$  ЯМР (282 МГц, Хлороформ-d)  $\delta$  -64.02 (с, 3F), -149.34 (м).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц, Хлороформ-d)  $\delta$  14.6, 14.9, 76.6, 76.9, 77.2, 122.2, 124.7, 125.0, 125.8, 128.4 (кв,  $J_{\text{C-F}} = 5.2$  Гц), 130.5, 133.3, 136.0, 140.2, 142.1, 148.1, 157.3. **HRMS**: расчетное значение  $m/z = 437.1328$  ( $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{O}_2\text{N}_3\text{B}_1\text{F}_5$ )<sup>+</sup>, измеренное значение  $m/z = 437.1337$ .

**10-(3,5-диметил-4-нитрофенил)-5,5-дифтор-2,8-дийод-1,3,7,9-тетраметил-5H-4 $\lambda^4$ ,5 $\lambda^4$ -дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,2]диазаборинин (140).** Соединение **136** (30 мг, 0,076 ммоль) и N-йодсукцинимид (76,5 мг, 0,34 ммоль) перемешивали в 10 мл DCM ночь. На следующий день, реакционную смесь промывали насыщенным раствором тиосульфата натрия и водой. Органический слой отделяли, высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали. Остаток очищали методом

колоночной хроматографии на силикагеле, используя DCM в качестве элюента. Темной-фиолетовый порошок, выход 37 мг (75%). <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 1.44 (с, 6H), 2.37 (с, 6H), 2.62 (с, 6H), 7.07 (с, 2H). <sup>19</sup>F ЯМР (282 МГц, Хлороформ-d) δ -148.82 (м). <sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, Хлороформ-d) δ 16.0, 17.4, 17.4, 128.3, 128.4, 130.7, 131.2, 136.6, 138.5, 144.8, 152.3, 157.4. HRMS: расчетное значение m/z = 648.9701 (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub><sup>11</sup>B<sub>1</sub>F<sub>2</sub><sup>127</sup>I<sub>2</sub>)<sup>+</sup>, Измеренное значение m/z = 648.9700

**N-((5,5-дифтор-1,3,7,9-тетраметил-5H-4λ<sup>4</sup>,5λ<sup>4</sup>-дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,2]диазаборинин-10-ил)метил)анилин (142).** Соединение **141** (0,2 г, 0,68 ммоль) и анилин (0,124 г, 1,36 ммоль) вводили в реакцию, согласно общей методике, С. Оранжевый порошок, выход 120 мг (50%). <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 2.31 (с, 6H), 2.51 (с, 6H), 3.85 (с, 1H), 4.36 (с, 2H), 6.04 (с, 2H), 6.63 (д, J = 7.9 Гц, 2H), 6.78 (т, J = 7.3 Гц, 1H), 7.20 (т, J = 6.6 Гц, 2H). <sup>19</sup>F ЯМР (282 МГц, Хлороформ-d) δ -149.27 – -149.75 (м). <sup>13</sup>C ЯМР (75 МГц, Хлороформ-d) δ 14.5, 15.2, 40.1, 112.3, 118.3, 121.9, 129.4, 132.1, 137.0, 141.7, 147.2, 155.9. HRMS: расчетное значение m/z = 353.1869 (C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub><sup>11</sup>B<sub>1</sub>F<sub>2</sub>)<sup>+</sup>, измеренное значение m/z = 353.1875

**N-((5,5-дифтор-1,3,7,9-тетраметил-5H-4λ<sup>4</sup>,5λ<sup>4</sup>-дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,2]диазаборинин-10-ил)метил)пропан-2-амин (143).** Соединение **141** (0,1 г, 0,34 ммоль) и изопропиламин (0,04 г, 0,68 ммоль) вводили в реакцию, согласно общей методике С. Оранжевый порошок, выход 34 мг (32%). <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 1.12 (д, J = 6.2 Гц, 6H), 2.46 (с, 6H), 2.49 (с, 6H), 2.84 – 3.01 (м, 1H), 3.90 (с, 2H), 4.89 (д, J = 4.6 Гц, 1H), 6.04 (с, 2H). <sup>19</sup>F ЯМР (282 МГц, Хлороформ-d) δ -149,55 – -150,06 (м). <sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, Хлороформ-d) δ 14.4, 15.5, 22.7, 43.3, 50.1, 121.6, 132.1, 140.5, 140.9, 154.9. HRMS: расчетное значение m/z = 319.2026 (C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub><sup>11</sup>B<sub>1</sub>F<sub>2</sub>)<sup>+</sup>, измеренное значение m/z = 319.2031

**N-((5,5-дифтор-1,3,7,9-тетраметил-5H-4λ<sup>4</sup>,5λ<sup>4</sup>-дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,2]диазаборинин-10-ил)метил)-N-фениламид азота (144).** Вещество **142** (50мг, 0,14 ммоль) и NaNO<sub>2</sub> (100 мг, 1,4ммоль) вводили в реакцию согласно общей методике D. Оранжевый порошок, выход 32 мг (60%). <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц,

Хлороформ-*d*)  $\delta$  2.16 (с, 6H), 2.45 (с, 6H), 5.99 (с, 2H), 7.12 (дд,  $J = 2.2, 7.6$  Гц, 2H), 7.21 – 7.34 (м, 3H).  $^{19}\text{F}$  ЯМР (282 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  149.66 – -150.11 (м).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (151 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  14.5, 15.9, 43.7, 122.40, 125.0, 128.9, 129.2, 132.6, 132.8, 138.1, 140.6, 156.3. **HRMS**: расчетное значение  $m/z = 382.1771$  ( $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_1\text{N}_4^{11}\text{B}_1\text{F}_2$ )<sup>+</sup>, измеренное значение  $m/z = 382.1773$ .

**N-((5,5-дифтор-1,3,7,9-тетраметил-5*H*-4 $\lambda^4$ ,5 $\lambda^4$ -дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,2]диазаборинин-10-ил)метил)-*N*-изопропиламид азота (145)**. Вещество **143** (45 мг, 0,14 ммоль) и  $\text{NaNO}_2$  (100 мг, 1,4 ммоль) вводили в реакцию согласно общей методике **D**. Оранжевый порошок, 38 мг (23%).  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  1.45 (д,  $J = 6.6$  Гц, 6H), 2.13 (с, 6H), 2.53 (с, 6H), 4.06 (гепт,  $J = 6.7$  Гц, 1H), 5.01 (с, 2H), 6.08 (с, 2H).  $^{19}\text{F}$  ЯМР (282 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  -149,10 – -149.6 (м).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  14.6, 15.7, 23.9, 43.3, 52.5, 122.7, 132.4, 133.0, 141.0, 156.7. **HRMS**: расчетное значение  $m/z = 348.1927$  ( $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{O}_1\text{N}_4^{11}\text{B}_1\text{F}_2$ )<sup>+</sup>, измеренное значение  $m/z = 348.1922$

**N-((5,5-дифтор-2,8-дийод-1,3,7,9-тетраметил-5*H*-4 $\lambda^4$ ,5 $\lambda^4$ -дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,2]диазаборинин-10-ил)метил)анилин (147)**. Смесь **146** (0,05 г, 0,09 ммоль),  $\text{NaI}$  (1,4 мг, 10% мол.), анилина (0,009 г, 0,1 ммоль) и  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0,015 г, 0,1 ммоль) в 10 мл ацетонитрила перемешивали при 50 °С в течение ночи. На следующий день реакционную смесь разбавляли водой и экстрагировали  $\text{EtOAc}$ . Органическую фазу промывали водой и рассолом, затем сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с силикагелем, используя в качестве элюента смесь  $\text{DCM}:\text{Hex}=1:1$ . Твердое вещество темно-фиолетового цвета, выход 29 мг (53%).  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  2.38 (с, 6H), 2.62 (с, 6H), 3.71 (т,  $J = 4.5$  Гц, 1H), 4.40 (д,  $J = 4.2$  Гц, 2H), 6.65 (д,  $J = 7.9$  Гц, 2H), 6.82 (т,  $J = 7.4$  Гц, 1H), 7.22 (м, 2H, перекрывается с  $\text{CHCl}_3$ ).  $^{19}\text{F}$  ЯМР (282 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  -145.72 (м).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  16.1, 17.6, 40.8, 86.7, 112.4, 118.7, 129.5, 132.1, 136.4, 143.7, 146.6, 157.3.

**N-((5,5-дифтор-2,8-дидод-1,3,7,9-тетраметил-5*H*-4 $\lambda^4$ ,5 $\lambda^4$ -дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,2]диазаборинин-10-ил)метил)-*N*-фениламид азота (148).** К охлажденному до 0°C раствору **147** (0,03 г, 0,05 ммоль) в 5 мл ледяной AcOH и 10 мл ТГФ порциями добавляли нитрит натрия (0,017 г, 0,25 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 20 минут при 0 °C и 2 часа при комнатной температуре. После завершения реакцию смесь разбавляли водой и экстрагировали EtOAc. Органическую фазу промывали водой и рассолом, затем сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с силикагелем, используя в качестве элюента смесь DCM:Hex=1:1. Твердое вещество темно-оранжевого цвета, выход 22 мг (72%). <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  2.20 (с, 6H), 2.56 (с, 6H), 5.30 (с, 2H), 7.09 (м, 2H), 7.32 (м, 3H). <sup>19</sup>F ЯМР (282 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  -145.95 (м). <sup>13</sup>C ЯМР (151 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  16.2, 18.5, 44.6, 87.4, 124.8, 129.3, 129.5, 132.6, 132.7, 138.1, 142.6, 157.8. HRMS: расчетное значение (C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>BF<sub>2</sub>I<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O)<sup>+</sup> m/z = 633,9709, измеренное значение m/z = 603.9729 (вероятно это связано с отрывом NO во время анализа)

**N-((1,3,5,5,7,9-гексаметил-5*H*-4 $\lambda^4$ ,5 $\lambda^4$ -дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,2]диазаборинин-10-ил)метил)анилин (149).** Соединение **142** (0,085 г, 0,24 ммоль) и свежеприготовленный MeMgI (полученный из 0,1 г Mg и 0,57 г MeI в 15 мл Et<sub>2</sub>O) вводили в реакцию в соответствии с общей методикой E. Остаток очищали колоночной хроматографией с силикагелем, используя DCM:Hex=1:1 в качестве элюента. Порошок темно-оранжевого цвета, выход 57 мг (70%). <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  0.19 (с, 6H), 2.35 (с, 6H), 2.45 (с, 6H), 3.81 (т, J = 4.3 Гц, 1H), 4.42 (д, J = 4.5 Гц, 2H), 6.05 (с, 2H), 6.65 (м, 2H), 6.76 (т, J = 7.4 Гц, 1H), 7.22 (м, 2H). <sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  15.5, 16.4, 40.4, 112.2, 117.9, 122.3, 129.3, 130.6, 137.2, 137.3, 147.5, 152.5. HRMS: расчетное значение (C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub><sup>11</sup>B<sub>1</sub>)<sup>+</sup> m/z = 345.2371, измеренное значение m/z = 345.2369.

**N-((2,8-дидод-1,3,5,5,7,9-гексаметил-5*H*-4 $\lambda^4$ ,5 $\lambda^4$ -дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,2]диазаборинин-10-ил)метил)анилин (151).** Соединение **147** (0,1 г, 0,17 ммоль) и свежеприготовленный MeMgI (полученный из 0,068 г Mg и 0,4 г MeI

в 15 мл Et<sub>2</sub>O) вводили в реакцию в соответствии с общей методикой **Е**. Целевое соединение использовали без очистки. Порошок темно-оранжевого цвета, выход 80 мг (80%). <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, Хлороформ-*d*) δ 0.22 (с, 6H), 2.43 (с, 6H), 2.56 (с, 6H), 3.79 (т, J = 4.5 Гц, 1H), 4.45 (д, J = 4.4 Гц, 2H), 6.68 (м, 2H), 6.82 (т, J = 7.3 Гц, 1H), 7.25 (м, 2H).

**N-((1,3,5,5,7,9-гексаметил-5H-4λ<sup>4</sup>,5λ<sup>4</sup>-дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,2]диазаборинин-10-ил)метил)-N-фениламид азота (150)**. Соединение **149** (0,05 г, 0,15 ммоль) и NaNO<sub>2</sub> (0,052 г, 0,75 ммоль) вводили в реакцию в соответствии с общей методикой **Е**. Красный порошок, выход 44 мг (78%). <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, Хлороформ-*d*) δ -0.01 (с, 6H), 2.19 (с, 6H), 2.37 (с, 6H), 5.33 (с, 2H), 5.98 (с, 2H), 7.09 (м, 2H), 7.23 (м, 2H). <sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, Хлороформ-*d*) δ 16.3, 16.4, 44.8, 122.9, 125.4, 128.6, 128.9, 131.3, 132.6, 136.3, 138.2, 152.8. **HRMS**: расчетное значение (C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>BN<sub>4</sub>O)<sup>+</sup> m/z = 374,2278, измеренное значение m/z = 374.2269

**N-((2,8-дийод-1,3,5,5,7,9-гексаметил-5H-4λ<sup>4</sup>,5λ<sup>4</sup>-дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,2]диазаборинин-10-ил)метил)-N-фениламид азота (152)**. 0,13 г (0,22 ммоль) соединения **151** и 0,077 г (1,1 ммоль) NaNO<sub>2</sub> вводили в реакцию в соответствии с общей методикой **Д**. Порошок темно-красного цвета, выход 48 мг (36%). <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, Хлороформ-*d*) δ 0.01 (с, 6H), 2.24 (с, 6H), 2.46 (с, 6H), 5.38 (с, 2H), 7.04 (м, 2H), 7.25 (м, 3H). <sup>13</sup>C ЯМР (75 МГц, Хлороформ-*d*) δ 18.3, 18.9, 45.5, 87.9, 125.2, 128.8, 129.2, 131.1, 132.4, 138.1, 138.6, 153.5. **HRMS**: расчетное значение (C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>BI<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O)<sup>+</sup> m/z = 626,0211, измеренное значение m/z = 626.0185

**N-((5,5-дифтор-1,7,9,10-тетраметил-5H-4λ<sup>4</sup>,5λ<sup>4</sup>-дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,2]диазаборинин-3-ил)метил)анилин (142a)**. К анилину (31 мг, 0,34 ммоль) добавляли NaNH (16 мг, 0,4 ммоль) в ацетонитриле и перемешивали 15 минут. После этого добавляли **141** и перемешивали ночь при 50 °С. На следующий день реакционную смесь охлаждали, разбавляли водой и экстрагировали 75 мл EtOAc. Органический слой промывали насыщенным раствором NH<sub>4</sub>Cl и 2 раза рассолом. Органический слой отделяли, высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Остаток очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле, используя DCM в

качестве элюента. Оранжевый осадок, 25 мг (21%).  $^1\text{H ЯМР}$  (300 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  2.34 (с, 3H), 2.40 (с, 3H), 2.53 (с, 3H), 2.55 (с, 5H), 4.62 (с, 2H), 6.08 (с, 1H), 6.19 (с, 1H), 6.59 – 6.75 (м, 3H), 7.15 (т,  $J = 7.0$  Гц, 2H).  $^{19}\text{F ЯМР}$  (282 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  -148,61 (м).  $^{13}\text{C ЯМР}$  (75 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  14.4, 16.4, 17.3, 29.6, 41.2, 76.5, 76.9, 77.3, 113.0, 117.6, 119.2, 121.8, 129.1, 132.0, 132.5, 140.2, 142.3, 147.51, 154.0, 155.2. **HRMS**: расчетное значение  $m/z = 353.1869$  ( $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_3^{11}\text{B}_1\text{F}_2$ )<sup>+</sup>, измеренное значение  $m/z = 353.1863$ .

Соединения **153** и **154** были получены согласно методами, описанным в [42].

**трет-бутил (Z)-4-(5-(5-(4-(трет-бутоксикарбонил)(метил)амино)фенил)-3-фенил-2H-пиррол-2-илиден)амино)-4-фенил-1H-пиррол-2-ил)фенил(метил)карбамат (155).**

Смесь **154** (0,6 г, 1,5 ммоль) и  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (1,74 г, 22,6 ммоль) в EtOH (35 мл) кипятили с обратным холодильником в течение 72 часов. Реакционную смесь охлаждали в морозильной камере и фильтровали. Осадок промывали 50 мл холодного этанола. Твердое вещество темно-синего цвета, выход 53 мг (10%).  $^1\text{H ЯМР}$  (300 МГц, Хлороформ-*d*,  $\delta$ ): 1.50 (с, 18H); 3.34 (с, 6H); 7.15 (с, 2H); 7.31-7.36 (м, 2H); 7.38-7.44 (м, 10H); 7.84-7.88 (м, 4H); 8.01-8.05 (м, 4H); 12.5 (очень широкий синглет, 1H).  $^{13}\text{C ЯМР}$  (100 МГц, Хлороформ-*d*,  $\delta$ ): 28.5; 37.2; 81.1; 115.0; 125.5; 126.9; 128.1; 128.4; 128.8; 129.2; 133.9; 142.6; 145.5; 149.8; 154.5. **HRMS**: расчетное значение  $m/z = 707.3472$  ( $\text{C}_{44}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_4$ )<sup>+</sup>, измеренное значение  $m/z = 707.3475$ .

***N,N'*-((5,5-дифтор-1,9-дифенил-5H-4 $\lambda^4$ ,5 $\lambda^4$ -дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,5,2] триазаборинин-3,7-диил)бис(4,1-фенилен))бис(N-метиламид азота) (157).**

Соединение **155** (80 мг, 0,1 ммоль) растворяли в 5 мл DCM и продували аргоном. Добавляли DIPEA (0,5 мл) и реакционную смесь перемешивали в течение 15 минут. Добавляли по каплям  $\text{VF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  (0,5 мл) и реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. По завершении реакционную смесь разбавляли EtOAc и промывали водой, 5% раствором  $\text{NaHCO}_3$  и рассолом. Органическую фазу сушили над сульфатом натрия, упаривали при пониженном давлении и пропускали через хроматографическую колонку с силикагелем, используя в качестве элюента  $\text{CHCl}_3$ . Полученный промежуточный продукт (0,19 г,

0,03 ммоль) переносили в круглодонную колбу на 25 мл с  $\text{NaNO}_2$  (0,035 г, 0,05 ммоль), DCM (4 мл), ТГФ (8 мл) и  $\text{AcOH}$  (4 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре (темно-зеленый раствор). Полученный раствор разбавляли DCM, нейтрализовали 5% раствором  $\text{NaHCO}_3$  и промывали водой. Органическую фазу сушили над сульфатом натрия, упаривали при пониженном давлении и очищали колоночной хроматографией на силикагеле, используя в качестве элюента  $\text{CHCl}_3$ . Твердое вещество темно-зеленого цвета, выход 23 мг (38% за две стадии).  $^1\text{H ЯМР}$  (300 МГц, Хлороформ-*d*,  $\delta$ ) 3.45 (с, 6H), 7.08 (с, 2H), 7.45 (м, 6H), 7.69 (д,  $J = 8.5$  Гц, 4H), 8.11 (м, 8H).  $^{19}\text{F ЯМР}$  (282 МГц, Хлороформ-*d*,  $\delta$ ) -131.15 (м).  $^{13}\text{C ЯМР}$  (100 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  30.3, 118.1, 118.9, 128.6, 129.3, 129.6, 129.8, 130.9, 132.0, 143.8, 144.3, 145.8, 157.9. **HRMS**: расчетное значение  $m/z = 613.2209$  ( $\text{C}_{34}\text{H}_{26}^{11}\text{BF}_2\text{N}_7\text{O}_2$ )<sup>+</sup>, измеренное значение  $m/z = 613.2213$ .

### Соединения 160.

**Метод 1.** Раствор **153** (1 экв.) и  $\text{KOH}$  (5 экв.) в 5 мл метанола охлаждали на ледяной бане при перемешивании. Затем по каплям добавляли 3 мл раствора соответствующего альдегида (1 экв.) в метаноле. Реакционную смесь перемешивали в течение 5 дней при комнатной температуре. По окончании реакции смесь выливали в 50 мл воды со льдом, нейтрализовали 5% раствором соляной кислоты и экстрагировали хлороформом. Органический слой отделяли от водного и сушили над безводным сульфатом натрия. Растворитель отгоняли при пониженном давлении, а остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле, элюент –  $\text{Hex}:\text{EtOAc} = 10:1$ .

**Метод 2.** Раствор **153** (1 экв.) в 15 мл безводного хлористого метилена охлаждали до  $-78$  °C и при перемешивании добавляли раствор  $\text{TiCl}_4$  (1,2 экв.) в 5 мл DCM. Через 10 минут добавляли раствор DIPEA (2,4 экв.) в 5 мл DCM и перемешивали еще 30 минут при охлаждении. После этого добавляли раствор соответствующего альдегида (1,2 экв.) в 5 мл DCM. Реакционную смесь перемешивали 1 час при охлаждении и 1 час при комнатной температуре. После этого в колбу добавляли насыщенный раствор хлористого аммония и полученную

смесь экстрагировали этилацетатом. Органическую фазу отделяли, сушили над безводным сульфатом натрия и удаляли растворитель при пониженном давлении. Остаток очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле, элюент – Нех:EtOAc = 10:1.

**трет-бутил (E)-(4-(3-(4-(диэтиламино)фенил)акрилоил)фенил)(метил)карбамат (160a).**

Метод 1. **153** (0,5г, 0,002 моль), **158** (0,355г, 0,002 моль) и КОН (0,56г, 0,01 моль) реагировали согласно вышеописанному методу. Желтый порошок, выход 0,42 г (51%).

Метод 2. **153** (0,827г, 0,0033 моль), **158** (0,708г, 0,004 моль), TiCl<sub>4</sub> (0,76г, 0,004 моль) и DIPEA (1,032г, 0,008 моль) реагировали согласно вышеописанному методу. Желтый порошок, выход 0,67 г (50%).

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-*d*) δ 1.46 (с, 9H), 3.30 (с, 3H), 6.64 (д, J = 8.9 Гц, 2H), 7.28 (д, J = 15.4 Гц, 1H), 7.34 (д, J = 8.6 Гц, 2H), 7.51 (д, J = 8.9 Гц, 2H), 7.76 (д, J = 15.5 Гц, 1H), 7.96 (д, J = 8.6 Гц, 2H). <sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, Хлороформ-*d*) δ 12.5, 28.2, 36.8, 44.4, 80.8, 111.2, 116.0, 121.8, 124.3, 128.7, 130.6, 135.4, 145.6, 147.1, 149.6, 154.1, 189.4. HRMS: расчетное значение m/z= 408.2407 (C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>)<sup>+</sup>, измеренное значение m/z= 408.2408

**трет-бутил (E)-(4-(3-(4-(диметиламино)фенил)акрилоил)фенил)(метил)карбамат (160b).**

Метод 1. **153** (0,5г, 0,002 моль), **159** (0,298г, 0,002 моль) и КОН (0,56г, 0,01 моль) реагировали согласно вышеописанному методу. Желтый порошок, выход 0,24 г (31%).

Метод 2. **153** (1г, 0,004 моль), **159** (0,596г, 0,004 моль), TiCl<sub>4</sub> (0,912г, 0,0048 моль) и DIPEA (1,24г, 0,0096 моль) реагировали согласно вышеописанному методу. Желтый порошок, выход 0,343 г (45%).

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-*d*) δ 1.46 (с, 9H), 3.03 (с, 6H), 3.30 (с, 3H), 6.68 (д, J = 8.9 Гц, 2H), 7.31 (д, J = 15.5 Гц, 1H), 7.35 (д, J = 8.7 Гц, 2H), 7.53 (д, J = 8.9 Гц, 2H), 7.77 (д, J = 15.5 Гц, 1H), 7.96 (д, J = 8.8 Гц, 2H). <sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц,

Хлороформ-*d*)  $\delta$  28.2, 36.8, 40.0, 80.9, 111.0, 111.7, 116.5, 119.8, 122.5, 124.2, 124.3, 128.7, 129.0, 130.3, 130.6, 132.3, 135.2, 142.3, 145.5, 147.1, 151.9, 154.1, 189.4. **HRMS:** расчетное значение  $m/z = 380.2094$  ( $C_{23}H_{28}O_3N_2$ )<sup>+</sup>, измеренное значение  $m/z = 380.2093$

**трет-бутил-(4-(3-(4-(диэтиламино)фенил)-4-нитробутаноил)фенил)(метил)карбамат (161).** Смесь **160a** (0,44 г, 0,0011 моль), нитрометана (0,330 г, 0,0054 моль) и поташа (0,075 г,  $5,4 \times 10^{-4}$  моль) в 20 мл этанола выдерживали при перемешивании в течение суток при температуре 60°C. Спирт отгоняли при пониженном давлении, остаток растворяли в 50 мл EtOAc и промывали несколько раз рассолом. Органическую фазу отделяли, сушили над сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении. Желтое масло, использовали без очистки. Выход 0,486 г (96%). <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  1.11 (т,  $J = 7.0$  Гц, 6H), 1.45 (с, 9H), 3.20 – 3.48 (м, 7H), 4.00 – 4.16 (м, 2H), 4.54 – 4.68 (м, 1H), 4.75 (дд,  $J = 12.2, 6.9$  Гц, 1H), 6.58 (д,  $J = 8.4$  Гц, 2H), 7.07 (д,  $J = 8.2$  Гц, 2H), 7.33 (д,  $J = 8.7$  Гц, 2H), 7.86 (д,  $J = 8.7$  Гц, 2H). <sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  12.4, 28.1, 36.6, 38.5, 41.6, 44.1, 79.9, 81.1, 111.8, 124.2, 125.1, 128.1, 128.5, 132.6, 147.2, 148.2, 153.9, 196.1. **HRMS:** расчетное значение для  $m/z = 469.2571$  ( $C_{26}H_{35}O_5N_3$ )<sup>+</sup>, измеренное значение  $m/z = 469.2568$ .

**трет-бутил (Z)-(4-(5-(5-(4-(трет-бутоксикарбонил)(метил)амино)фенил)-3-(4-(диэтиламино)фенил)-2H-пиррол-2-илиден)амино)-4-(4-(диэтиламино)фенил)-1H-пиррол-2-ил)фенил)(метил)карбамат (162).** Смесь **161** (0,45 г,  $9,6 \cdot 10^{-4}$  моль) и NH<sub>4</sub>OAc (5,55 г, 0,072 моль) в 20 мл этанола кипятили в течение 5 дней. Колбу остужали в холодильнике и отфильтровывали осадок, промывая его холодным спиртом. Темно синий порошок, выход 28 мг (7%). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  1.10 (т,  $J = 7.1$  Гц, 12H), 1.38 (с, 18H), 3.22 (с, 6H), 3.31 (кв,  $J = 7.1$  Гц, 8H), 6.60 (д,  $J = 8.5$  Гц, 4H), 6.88 (с, 2H), 7.29 (д,  $J = 8.2$  Гц, 4H), 7.75 (д,  $J = 8.2$  Гц, 4H), 7.91 (д,  $J = 8.5$  Гц, 4H). <sup>13</sup>C NMR (126 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  12.3, 27.9, 36.7, 44.1, 80.4, 110.6, 110.7, 120.9, 125.0, 126.0, 128.8, 130.1, 142.3, 144.4, 147.0, 149.1, 153.3, 154.0. **HRMS:** расчётное значение  $m/z = 649.3888$  ( $C_{42}H_{47}N_7$ )<sup>+</sup>, измеренное значение 649.3877. Вероятно вещество дает устойчивый молекулярный ион только без Вос-групп.

**4,4'-(5,5-дифтор-3,7-бис(4-(метиламино)фенил)-5H-4λ<sup>4</sup>,5λ<sup>4</sup>-дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,5,2]тризаборинин-1,9-диил)бис(N,N-диэтиланилин) (163).** 162 (0,033г, 3,88·10<sup>-5</sup> моль) растворяли в 5 мл сухого хлористого метилена, продували аргоном и добавляли 0,5 мл DIPEA. Перемешивали 15 минут, добавляли эфират трехфтористого бора и перемешивали реакционную смесь в течение суток. На следующий день реакционную смесь гасили водой и экстрагировали хлороформом. Органическую фазу промывали 5% раствором соды, водой и рассолом. Органическую фазу отделяли, сушили над сульфатом натрия и упаривали в роторном испарителе при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюент – хлороформ (+1% NEt<sub>3</sub>). Темно-синий порошок, выход 25 мг (92%). <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 1.21 (т, J = 6.9 Гц, 12H), 2.86 (с, 6H), 3.42 (кв, J = 7.0 Гц, 8H), 4.12 (с, 2H), 6.62 (д, J = 8.4 Гц, 4H), 6.71 (д, J = 8.6 Гц, 4H), 6.82 (с, 2H), 8.03 (т, J = 9.5 Гц, 8H). <sup>19</sup>F ЯМР (282 МГц, Хлороформ-d) δ -131.31 – -130.39 (м). <sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, Хлороформ-d) δ 12.6, 30.2, 44.4, 111.1, 111.9, 114.0, 120.7, 121.0, 130.7, 131.2, 141.5, 144.8, 147.9, 150.6, 156.0. HRMS: расчетное значение m/z= 696.3907 (C<sub>42</sub>H<sub>46</sub>N<sub>7</sub><sup>10</sup>B<sub>1</sub>F<sub>2</sub>)<sup>+</sup>, измеренное значение m/z= 696.3917.

**(E)-4-(3-оксо-3-фенилпроп-1-ен-1-ил)бензойная кислота (166).** К суспензии **164** (2 г, 0,017 моль) и **165** (2,55 г, 0,017 моль) в 50 мл метанола добавляли при перемешивании раствор NaOH (1,36 г, 0,034 моль) в 34 мл воды. Реакционную смесь перемешивали в течение суток, доводили pH ~ 2 с помощью 5% соляной кислоты. Выпавший белый осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали. Выход 3,64 г (85%). <sup>1</sup>H ЯМР соответствует литературному [189].

**4-(1-нитро-4-оксо-4-фенилбутан-2-ил)бензойная кислота (167).** Смесь **166** (0,5 г, 0,002 моль), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,414 г, 0,003 моль) и нитрометана (0,54 мл, 0,01 моль) в 30 мл этанола перемешивали при 65 °С ночь. По окончании реакции смесь раствор выливали в 50 мл холодной воды, подкисляли 5% соляной кислотой до pH ~ 2 и экстрагировали этил ацетатом. Органическую фазу промывали рассолом, сушили

над сульфатом магния и упаривали растворитель при пониженном давлении. Желтое масло, выход 0,624 г (99%). Использовали без дополнительной очистки.  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  3.33 – 3.49 (м, 2H), 4.22 (п,  $J = 7.0$  Гц, 1H), 4.65 (дд,  $J = 12.8, 8.3$  Гц, 1H), 4.79 (дд,  $J = 12.7, 6.3$  Гц, 1H), 7.31 (д,  $J = 8.2$  Гц, 2H), 7.38 (т,  $J = 7.8$  Гц, 2H), 7.50 (т,  $J = 7.5$  Гц, 1H), 7.84 (д,  $J = 7.8$  Гц, 2H), 7.95 (д,  $J = 8.0$  Гц, 2H), 10.85 (с, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  38.8, 40.9, 78.8, 127.3, 127.7, 128.5, 130.0, 130.3, 133.4, 135.8, 143.9, 168.1, 196.2. HRMS: расчетное значение  $m/z = 313.0945$  ( $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{O}_5\text{N}_1$ ) $^+$ , измеренное значение  $m/z = 266.0942$ , что соответствует расчетному значению  $m/z = 266.0938$  ( $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_3$ ) $^+$ . Вероятно, устойчивый молекулярный ион образуется после отщепления  $\text{HNO}_2$ , что и было зафиксировано.

**(Z)-4-(2-((3-(4-карбоксифенил)-5-фенил-1H-пиррол-2-ил)имино)-5-фенил-2H-пиррол-3-ил)бензойная кислота (168)**. Смесь **167** (0,4 г, 0,0013 моль) и  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (4,9 г, 0,064 моль) кипятили сутки в 15 мл этанола. По окончании реакции колбу охлаждали и отфильтровывали осадок, промывая небольшими порциями холодного этанола. Темно-синий порошок, выход 0,042 г (12%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7.55 – 7.60 (м, 2H), 7.62 – 7.66 (м, 4H), 7.77 – 7.81 (м, 2H), 7.97 – 8.03 (м, 4H), 8.08 – 8.15 (м, 4H), 8.15 – 8.19 (м, 4H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  116.9, 120.2, 126.8, 128.3, 129.1, 129.4, 130.8, 131.1, 136.0, 140.7, 149.1, 155.4, 167.6.

**Метил 4-формилбензоат (169)**. К суспензии **165** (3 г, 0,02 моль) в 30 мл DCM медленно прикапывали  $\text{SOCl}_2$  и кипятили при перемешивании 40 минут. После этого к остывшей реакционной смеси порционно добавляли 70 мл метанола до прекращения вскипания. Полученный прозрачный раствор кипятили 1 час, после чего упаривали растворитель при пониженном давлении на роторном испарителе. Полученный белый осадок перемешивали ночь 50 мл смеси ацетон:вода = 5:45. На следующий день выпавший белый осадок отфильтровывали, промывая несколько раз водой, и высушивали. Белый твердый осадок, выход 2,91 г (89%). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  соответствует литературному [190].

**Метил (Е)-4-(3-оксо-3-фенилпроп-1-ен-1-ил)бензоат (170).** К раствору **164** (1,1 г, 0,009 моль) в 20 мл метанола добавляли раствор NaOH (0,548 г, 0,0137 моль) в 5 мл метанол и перемешивали 5 минут при комнатной температуре. Затем по каплям добавляли раствор **169** (1,5 г, 0,009 моль) в 5 мл метанола и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре ночь. На следующий день реакционную смесь выливали в 50 мл воды и отфильтровывали выпавший бледно-желтый осадок, промывая водой 2x50 мл. Бледно-желтый осадок, выход 1,95 г (80%). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  соответствует литературному [191].

**Метил 4-(1-нитро-4-оксо-4-фенилбутан-2-ил)бензоат (171).** Смесь **170** (0,7 г, 0,0026 моль),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0,180 г, 0,0013 моль) и нитрометана (0,7 мл, 0,013 моль) в 20 мл этанола перемешивали при 65 °С ночь. По окончании реакции смесь раствор выливали в 50 мл холодной воды, нейтрализовали 5% раствором соляной кислоты и экстрагировали хлороформом. Органическую фазу промывали рассолом, сушили над сульфатом магния и упаривали растворитель при пониженном давлении. Вещество очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле, DCM – элюент. Желтое масло, выход 0,540 г (63 %).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  3.36 – 3.55 (м, 2H), 3.87 (с, 3H), 4.27 (п,  $J = 6.8$  Гц, 1H), 4.68 (дд,  $J = 12.7, 8.2$  Гц, 1H), 4.83 (дд,  $J = 12.7, 6.4$  Гц, 1H), 7.35 (д,  $J = 8.3$  Гц, 2H), 7.42 (т,  $J = 8.0$  Гц, 2H), 7.55 (тт,  $J = 7.3, 1.2$  Гц, 1H), 7.86 – 7.91 (м, 2H), 7.98 (д,  $J = 8.4$  Гц, 2H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  38.9, 41.0, 52.0, 78.9, 127.4, 127.8, 128.6, 130.1, 133.4, 133.5, 135.9, 144.1, 166.4, 196.3. **HRMS:** расчетное значение  $m/z = 327.1101$  ( $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_5\text{N}_1$ ) $^+$ , измеренное значение  $m/z = 280.1089$ , что соответствует расчетному значению  $m/z = 280.1094$  ( $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_3$ ) $^+$ . Вероятно, устойчивый молекулярный ион образуется после отщепления  $\text{HNO}_2$ , что и было зафиксировано.

#### Определение выделяемого NO:

Для измерения выхода выделяемого NO была использована ловушка DAR-2. Интенсивность флуоресценции в любой момент времени:

$$I = I_{\text{exc}}(\phi_0[\text{DAR2}] + \phi_{\text{TZ}}[\text{DAR2}_{\text{TZ}}]),$$

где  $[DAR2]$  концентрация непрореагировавшего зонда,  $[DAR2_{TZ}]$  – концентрация триазольной формы (после реакции с NO),  $I_{exc}$  – интенсивность света возбуждения,  $\phi_0$  и  $\phi_{TZ}$  – соответствующие константы пропорциональности. До реакции с NO:

$$I_0 = I_{exc} \phi_0 [DAR2_0],$$

где  $[DAR2_0]$  – начальная концентрация DAR-2 и в любой момент времени:

$$[DAR2_0] = [DAR2] + [DAR2_{TZ}].$$

Из этого следует:

$$I - I_0 = I_{exc} (\phi_{TZ} - \phi_0) [DAR2_{TZ}],$$

Наконец, разделив полученное выражение на  $I_0$ , концентрацию NO можно выразить как:

$$[NO] = [DAR2_{TZ}] = [DAR2_0] \frac{I - I_0}{I_0} \frac{1}{\phi_{TZ}/\phi_0 - 1}.$$

Это уравнение было использовано для определения концентрации NO. Начальная концентрация  $[DAR2_0]$  контролировалась в процессе эксперимента, а  $I$  и  $I_0$  измеренные интенсивности флуоресценции на 550 нм при возбуждении 540 нм. Чтобы найти отношение  $\phi_{TZ}/\phi_0$ , была измерена флуоресценция DAR-2 в этаноле до и после реакции с избытком NONO-ата. Было вычислено, что  $\phi_{TZ}/\phi_0 = 47$ , что близко к значению, сообщенному в [99]:  $0.34/0.006 \approx 57$  (был использован другой буферный раствор).

В случае сложных смесей, наличие молекулы, спектр поглощения которой перекрывается со спектром зонда DAR-2, значительно уменьшает интенсивность света возбуждения  $I_{exc}$ . Поскольку результат не зависит от  $I_{exc}$ , был сделан вывод, что описанный метод подходит и для комплексных смесей. Однако, такой метод не подходит в случае, когда спектр поглощения молекулы претерпевает значительные изменения при фотолизе светом с длиной волны 540 нм. Другим возможным источником неточности измерений может быть собственная флуоресценция изучаемой молекулы, которая также может меняться во время фотолиза. Это происходит в случае соединения **145**, которое образует неизвестный сильно

флуоресцирующий фотопродукт с полосой поглощения 550 нм. Для остальных же исследованных соединений флуоресценция при облучении 540 нм пренебрежительно мала.

Также была построена линейность флуоресценции различных концентрация DAR-2 от 20 нМ до 2 мМ. Результат представлен на рисунке 37.

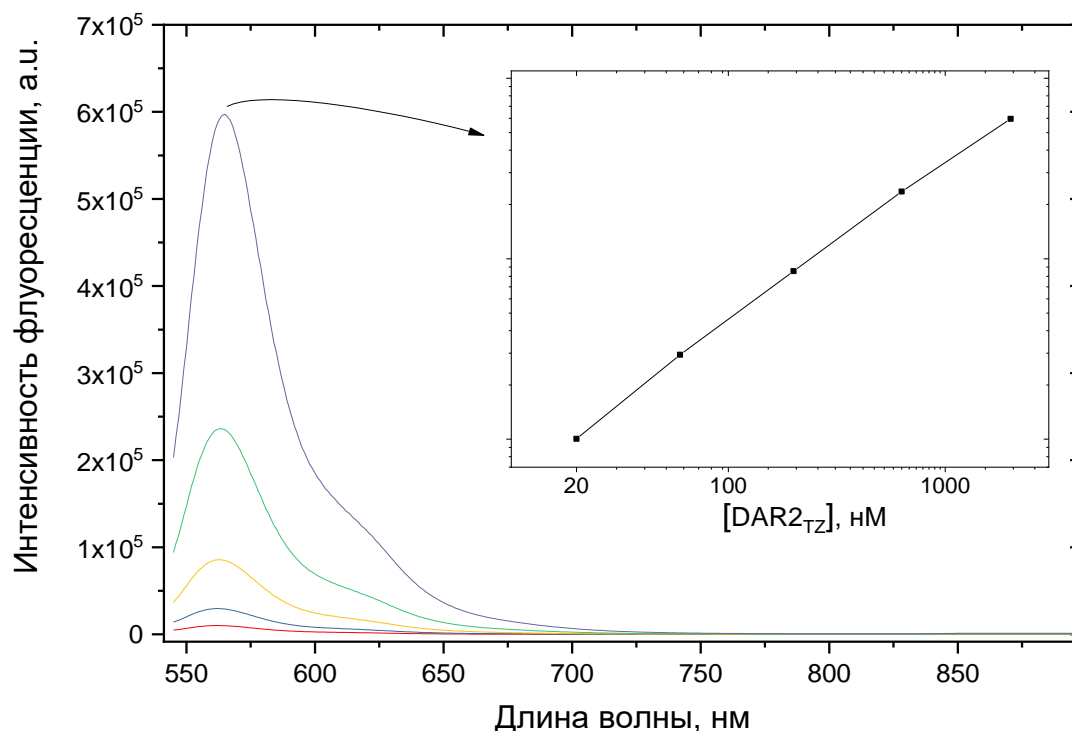


Рисунок 38. *Линейность флуоресценции зонда DAR-2 для концентраций от 20 нМ до 2 мМ*

#### Подготовка образцов тромбоцитов

Образцы крови были получены натошак из локтевых вен здорового добровольца, который был проинформирован и было получено его и информированное согласие. Образец собирали в вакуумную пробирку, содержащую цитрат натрия в качестве антикоагулянта (9:1). После сбора образец выдерживали при комнатной температуре в течение часа для получения слоя плазмы, содержащего тромбоциты. На следующем этапе образец обрабатывали флуоресцентным кальциевым зондом Fluo-4-AM. Исходный раствор (1 мМ) Fluo-4-AM разбавляли в 62,5 раза фосфатно-солевым буфером (PBS) и смешивали 1:1 с плазмой крови. После инкубации в течение 30 минут в темноте образец разбавляли

в 10 раз раствором PBS с **142, 144** или без, помещали в лунку 96-луночного планшета и оставляли еще на 30 минут перед экспериментом. Сигнал кальция в отдельных тромбоцитах регистрировали с помощью флуоресцентного микроскопа CarlZeiss AxioVert.A1 с объективом 20x.

#### Квантово-химические расчёты

Квантово-химические расчеты профилей адиабатической поверхности потенциальной энергии (ППЭ) исследуемых молекул **136-140** были проведены с использованием метода DFT с использованием функционала CAM-B3LYP [192], реализованного программном пакете GAMESS. Расчеты ППЭ включали в себя локализацию стационарных структур и определение их типа на основе анализа нормальных колебаний. Для **136-139** использовали базисный набор 6-31+G\*, тогда как для **140** использовали SPK-DZP. Влияние окружающей среды учитывали с помощью PCM-модели с параметрами, характерными для H<sub>2</sub>O. Расчеты возбужденного состояния проводились с использованием метода TD-DFT.

#### Анализ с использованием реагента Грисса

Было проведено количественное определение нитрит аниона (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) стабильного продукта окисления NO, с использованием реагента Грисса. Вкратце, реагент растворяли в EtOH и проводили процедуру калибровки, измеряя изменение оптической плотности при 500 нм при добавлении известного количества NaNO<sub>2</sub>. Затем готовили раствор **157** (8,8 мкМ) с реагентом Грисса и освещали, как описано в основном тексте. В присутствии реагента Грисса при облучении виден отчетливый рост сигнала поглощения при 500 нм. Этот рост значительно сильнее, чем в контрольной пробе (без реагента Грисса). Отличие обусловлено реакцией реагента Грисса с нитритами. Согласно нашей калибровке, это соответствует ~20 мкМ NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, что действительно очень близко к двойной концентрации **157** (17,6 мкМ).

### Список использованной литературы

1. Mayer B. Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition: / B. Mayer, P. Andrew // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. – 1998. – Vol. 358. – № 1. – P. 127-133.
2. Rand M. J. Nitric Oxide as a Neurotransmitter in Peripheral Nerves: Nature of Transmitter and Mechanism of Transmission / M. J. Rand, C. G. Li // *Annual Review of Physiology*. – 1995. – Vol. 57. – № 1. – P. 659-682.
3. Loscalzo J. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system / J. Loscalzo, G. Welch // *Progress in Cardiovascular Diseases*. – 1995. – Vol. 38. – № 2. – P. 87-104.
4. Nitric Oxide: The Versatility of an Extensive Signal Molecule / L. Lamattina, C. García-Mata, M. Graziano, G. Pagnussat // *Annual Review of Plant Biology*. – 2003. – Vol. 54. – № 1. – P. 109-136.
5. Velayutham M. Nitric Oxide Signaling in Biology / M. Velayutham, J. L. Zweier // *Messenger*. – 2013. – Vol. 2. – № 1. – P. 1-18.
6. Bredt D. S. NITRIC OXIDE: A Physiologic Messenger Molecule / D. S. Bredt, S. H. Snyder // *Annual Review of Biochemistry*. – 1994. – Vol. 63. – № 1. – P. 175-195.
7. Kerwin J. F. Jr. Nitric Oxide: A New Paradigm for Second Messengers / J. F. Jr. Kerwin, J. R. Lancaster, P. L. Feldman // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1995. – Vol. 38. – № 22. – P. 4343-4362.
8. Wink D. A. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide / D. A. Wink, J. B. Mitchell // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1998. – Vol. 25. – № 4-5. – P. 434-456.
9. Widespread Peroxynitrite-Mediated Damage in Alzheimer's Disease / M. A. Smith, P. L. R. Harris, L. M. Sayre [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 1997. – Vol. 17. – № 8. – P. 2653-2657.
10. Szabo C. Gasotransmitters in cancer: from pathophysiology to experimental therapy / C. Szabo // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2016. – Vol. 15. – № 3. – P. 185-203.
11. Enderlein J. 4.09 - Advanced Fluorescence Microscopy / J. Enderlein. – Text : electronic // *Comprehensive Biomedical Physics* / ed. A. Brahmé. – Oxford : Elsevier, 2014. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444536327004093> (date accessed: 10.02.2023).
12. Chen Y. Recent developments of fluorescent probes for detection and bioimaging of nitric oxide / Y. Chen // *Nitric Oxide*. – 2020. – Vol. 98. – P. 1-19.

13. Ford P. C. Polychromophoric Metal Complexes for Generating the Bioregulatory Agent Nitric Oxide by Single- and Two-Photon Excitation / P. C. Ford // *Accounts of Chemical Research*. – 2008. – Vol. 41. – № 2. – P. 190-200.
14. Heilman B. Light-triggered nitric oxide delivery to malignant sites and infection / B. Heilman, P. K. Mascharak // *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. – 2013. – Vol. 371. – № 1995. – P. 20120368.
15. Lo K. K.-W. Luminescent and Photoactive Transition Metal Complexes as Biomolecular Probes and Cellular Reagents / K. K.-W. Lo Google-Books-ID: c0MPCgAAQBAJ. – Springer, 2015. – 266 p.
16. Ford P. C. Metal complex strategies for photo-uncaging the small molecule bioregulators nitric oxide and carbon monoxide / P. C. Ford // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2018. – Vol. 376. – P. 548-564.
17. Ostrowski A. D. Metal complexes as photochemical nitric oxide precursors: Potential applications in the treatment of tumors / A. D. Ostrowski, P. C. Ford // *Dalton Transactions*. – 2009. – № 48. – P. 10660.
18. Photochemistry of metal nitrosyl complexes. Delivery of nitric oxide to biological targets / P. C. Ford, J. Bourassa, K. Miranda [et al.] // *Coordination Chemistry Reviews*. – 1998. – Vol. 171. – P. 185-202.
19. Xiang H. Transition-Metal Nitrosyls for Photocontrolled Nitric Oxide Delivery / H. Xiang, M. Guo, J. Liu // *European Journal of Inorganic Chemistry*. – 2017. – Vol. 2017. – № 12. – P. 1586-1595.
20. Visible-to-NIR-Light Activated Release: From Small Molecules to Nanomaterials / R. Weinstain, T. Slanina, D. Kand, P. Klán // *Chemical Reviews*. – 2020. – Vol. 120. – № 24. – P. 13135-13272.
21. A Nonmetal-Containing Nitric Oxide Donor Activated with Single-Photon Green Light / M. Blangetti, A. Fraix, L. Lazzarato [et al.] // *Chemistry - A European Journal*. – 2017. – Vol. 23. – № 38. – P. 9026-9029.
22. Nitric Oxide-Releasing Polymeric Materials for Antimicrobial Applications: A Review / F. Rong, Y. Tang, T. Wang [et al.] // *Antioxidants*. – 2019. – Vol. 8. – № 11. – P. 556.
23. Nitric-Oxide-Releasing Biomaterial Regulation of the Stem Cell Microenvironment in Regenerative Medicine / A. C. Midgley, Y. Wei, Z. Li [et al.] // *Advanced Materials*. – 2020. – Vol. 32. – № 3. – P. 1805818.

24. Mild dealkylative *N*-nitrosation of *N,N*-dialkylaniline derivatives for convenient preparation of photo-triggered and photo-calibrated NO donors / S. Qiu, C. Guo, M. Wang [et al.] // *Organic Chemistry Frontiers*. – 2018. – Vol. 5. – № 22. – P. 3206-3209.
25. Vorobev A. Yu. Long-wavelength photoremovable protecting groups: On the way to *in vivo* application / A. Yu. Vorobev, A. E. Moskalensky // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. – 2020. – Vol. 18. – P. 27-34.
26. Ring-restricted *N*-nitrosated rhodamine as a green-light triggered, orange-emission calibrated and fast-releasing nitric oxide donor / H. He, T. He, Z. Zhang [et al.] // *Chinese Chemical Letters*. – 2018. – Vol. 29. – № 10. – P. 1497-1499.
27. Mechanistic Aspects of the Oxidative and Reductive Fragmentation of *N*-Nitrosoamines: A New Method for Generating Nitrenium Cations, Amide Anions, and Aminyl Radicals / K. Piech, T. Bally, A. Sikora, A. Marcinek // *Journal of the American Chemical Society*. – 2007. – Vol. 129. – № 11. – P. 3211-3217.
28. Transnitrosation of Thiols from Aliphatic *N*-Nitrosoamines: *S*-Nitrosation and Indirect Generation of Nitric Oxide / T. Yanagimoto, T. Toyota, N. Matsuki [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2007. – Vol. 129. – № 4. – P. 736-737.
29. Namiki S. High-Performance Caged Nitric Oxide: A New Molecular Design, Synthesis, and Photochemical Reaction / S. Namiki, T. Arai, K. Fujimori // *Journal of the American Chemical Society*. – 1997. – Vol. 119. – № 16. – P. 3840-3841.
30. Horneck G. UV Radiation (Biological Effects) / G. Horneck. – Text : electronic // *Encyclopedia of Astrobiology* / eds. M. Gargaud [et al.]. – Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2011. – URL: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-11274-4\\_1640](http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-11274-4_1640) (date accessed: 17.01.2023).
31. Photomanipulation of Vasodilation with a Blue-Light-Controllable Nitric Oxide Releaser / N. Ieda, Y. Hotta, N. Miyata [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2014. – Vol. 136. – № 19. – P. 7085-7091.
32. A yellowish-green-light-controllable nitric oxide donor based on *N*-nitrosoaminophenol applicable for photocontrolled vasodilation / H. Okuno, N. Ieda, Y. Hotta [et al.] // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2017. – Vol. 15. – № 13. – P. 2791-2796.
33. Structure-efficiency relationship of photoinduced electron transfer-triggered nitric oxide releasers / N. Ieda, Y. Oka, T. Yoshihara [et al.] // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 1430.
34. Development of a Red-Light-Controllable Nitric Oxide Releaser to Control Smooth Muscle Relaxation *in Vivo* / N. Ieda, Y. Hotta, A. Yamauchi [et al.] // *ACS Chemical Biology*. – 2020. – Vol. 15. – № 11. – P. 2958-2965.

35. A near-infrared fluorophore for live-cell super-resolution microscopy of cellular proteins / G. Lukinavičius, K. Umezawa, N. Olivier [et al.] // *Nature Chemistry*. – 2013. – Vol. 5. – № 2. – P. 132-139.
36. A Photo-triggered and photo-calibrated nitric oxide donor: Rational design, spectral characterizations, and biological applications / H. He, Y. Liu, Z. Zhou [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2018. – Vol. 123. – P. 1-7.
37. A Water-Soluble, Green-Light Triggered, and Photo-Calibrated Nitric Oxide Donor for Biological Applications / H. He, Y. Xia, Y. Qi [et al.] // *Bioconjugate Chemistry*. – 2018. – Vol. 29. – № 4. – P. 1194-1198.
38. Shen R. A turn-on and lysosome-targeted fluorescent NO releaser in water media and its application in living cells and zebrafishes / R. Shen, Y. Qian // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2020. – Vol. 230. – P. 118024.
39. Shen R. A efficient light-controlled nitric oxide releaser in aqueous solution and its red fluorescence imaging in lysosome / R. Shen, Y. Qian // *Dyes and Pigments*. – 2020. – Vol. 176. – P. 108247.
40. A photocalibrated NO donor based on N-nitrosorhodamine 6G upon UV irradiation / S. Zhang, Q. Wang, J. Yang [et al.] // *Chinese Chemical Letters*. – 2019. – Vol. 30. – № 2. – P. 454-456.
41. Super-Resolution Monitoring of Mitochondrial Dynamics upon Time-Gated Photo-Triggered Release of Nitric Oxide / H. He, Z. Ye, Y. Xiao [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2018. – Vol. 90. – № 3. – P. 2164-2169.
42. Near-Infrared Photoactivatable Nitric Oxide Donors with Integrated Photoacoustic Monitoring / E. Y. Zhou, H. J. Knox, C. J. Reinhardt [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2018. – Vol. 140. – № 37. – P. 11686-11697.
43. Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods / C. Ash, M. Dubec, K. Donne, T. Bashford // *Lasers in Medical Science*. – 2017. – Vol. 32. – № 8. – P. 1909-1918.
44. Photocalibrated NO Release from N-Nitrosated Naphthalimides upon One-Photon or Two-Photon Irradiation / Z. Zhang, J. Wu, Z. Shang [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2016. – Vol. 88. – № 14. – P. 7274-7280.
45. A two-photon excitable and ratiometric fluorogenic nitric oxide photoreleaser and its biological applications / X. Xie, J. Fan, M. Liang [et al.] // *Chem. Commun.* – 2017. – Vol. 53. – № 87. – P. 11941-11944.

46. Pathways and kinetic energy disposal in the photodissociation of nitrobenzene / D. B. Galloway, J. A. Bartz, L. G. Huey, F. F. Crim // *The Journal of Chemical Physics*. – 1993. – Vol. 98. – № 3. – P. 2107-2114.
47. Glenewinkel-Meyer T. The isomerization of nitrobenzene to phenylnitrite / T. Glenewinkel-Meyer, F. F. Crim // *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. – 1995. – Vol. 337. – № 3. – P. 209-224.
48. The Photochemistry of Flutamide and its Inclusion Complex with  $\beta$ -Cyclodextrin. Dramatic Effect of the Microenvironment on the Nature and on the Efficiency of the Photodegradation Pathways / S. Sortino, S. Giuffrida, G. De Guidi [et al.] // *Photochemistry and Photobiology*. – 2007. – Vol. 73. – № 1. – P. 6-13.
49. Sortino S. New insight on the photoreactivity of the phototoxic anti-cancer flutamide: photochemical pathways selectively locked and unlocked by structural changes upon drug compartmentalization in phospholipid bilayer vesicles / S. Sortino, G. Condorelli, G. Marconi // *Chemical Communications*. – 2001. – № 13. – C. 1226-1227.
50. Sortino S. Light-controlled nitric oxide delivering molecular assemblies / S. Sortino // *Chemical Society Reviews*. – 2010. – Vol. 39. – № 8. – P. 2903.
51. Nanoscale lipid vesicles functionalized with a nitro-aniline derivative for photoinduced nitric oxide (NO) delivery / N. Sharma, A. K. Dhyani, S. Marepally, D. A. Jose // *Nanoscale Advances*. – 2020. – Vol. 2. – № 1. – P. 463-469.
52. Light-Activated Release of Nitric Oxide with Fluorescence Reporting in Living Cells / E. Vittorino, M. T. Sciortino, G. Siracusano, S. Sortino // *ChemMedChem*. – 2011. – Vol. 6. – № 9. – P. 1551-1554.
53. A Three-Color Fluorescent Supramolecular Nanoassembly of Phototherapeutics Activable by Two-Photon Excitation with Near-Infrared Light / A. Fraix, V. Kirejev, M. Malanga [et al.] // *Chemistry – A European Journal*. – 2019. – Vol. 25. – № 29. – P. 7091-7095.
54. Photo-antimicrobial polymeric films releasing nitric oxide with fluorescence reporting under visible light / N. Marino, M. Perez-Lloret, A. R. Blanco [et al.] // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2016. – Vol. 4. – № 30. – P. 5138-5143.
55. Fukuhara K. Photochemical Generation of Nitric Oxide from 6-Nitrobenzo[*a*]pyrene / K. Fukuhara, M. Kurihara, N. Miyata // *Journal of the American Chemical Society*. – 2001. – Vol. 123. – № 36. – P. 8662-8666.
56. Photoinduced Nitric Oxide Release from Nitrobenzene Derivatives / T. Suzuki, O. Nagae, Y. Kato [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2005. – Vol. 127. – № 33. – P. 11720-11726.

57. Fluorescent Nitric Oxide Photodors Based on BODIPY and Rhodamine Antennae / C. Parisi, M. Failla, A. Fraix [et al.] // Chemistry – A European Journal. – 2019. – Vol. 25. – № 47. – P. 11080-11084.
58. A molecular hybrid producing simultaneously singlet oxygen and nitric oxide by single photon excitation with green light / C. Parisi, M. Failla, A. Fraix [et al.] // Bioorganic Chemistry. – 2019. – Vol. 85. – P. 18-22.
59. Photoinduced Nitric Oxide Release from a Hindered Nitrobenzene Derivative by Two-Photon Excitation / K. Hishikawa, H. Nakagawa, T. Furuta [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2009. – Vol. 131. – № 22. – P. 7488-7489.
60. Fine Spatiotemporal Control of Nitric Oxide Release by Infrared Pulse-Laser Irradiation of a Photolabile Donor / H. Nakagawa, K. Hishikawa, K. Eto [et al.] // ACS Chemical Biology. – 2013. – Vol. 8. – № 11. – P. 2493-2500.
61. A double bond-conjugated dimethylnitrobenzene-type photolabile nitric oxide donor with improved two-photon cross section / N. Ieda, K. Hishikawa, K. Eto [et al.] // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2015. – Vol. 25. – № 16. – P. 3172-3175.
62. Visible Light-Controlled Nitric Oxide Release from Hindered Nitrobenzene Derivatives for Specific Modulation of Mitochondrial Dynamics / K. Kitamura, M. Kawaguchi, N. Ieda [et al.] // ACS Chemical Biology. – 2016. – Vol. 11. – № 5. – P. 1271-1278.
63. New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines / J. A. Hrabie, J. R. Klose, D. A. Wink, L. K. Keefer // The Journal of Organic Chemistry. – 1993. – Vol. 58. – № 6. – P. 1472-1476.
64. Makings L. R. Caged nitric oxide. Stable organic molecules from which nitric oxide can be photoreleased. / L. R. Makings, R. Y. Tsien // Journal of Biological Chemistry. – 1994. – Vol. 269. – № 9. – P. 6282-6285.
65. Hrabie J. A. Chemistry of the Nitric Oxide-Releasing Diazeniumdiolate (“Nitrosohydroxylamine”) Functional Group and Its Oxygen-Substituted Derivatives / J. A. Hrabie, L. K. Keefer // Chemical Reviews. – 2002. – Vol. 102. – № 4. – P. 1135-1154.
66. In Search of the Perfect Photocage: Structure–Reactivity Relationships in *meso* - Methyl BODIPY Photoremovable Protecting Groups / T. Slanina, P. Shrestha, E. Palao [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2017. – Vol. 139. – № 42. – P. 15168-15175.
67. Griess P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen” / P. Griess // Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. – 1879. – Vol. 12. – № 1. – P. 426-428.

68. Fox J. B. Kinetics and mechanisms of the Griess reaction / J. B. Fox // *Analytical Chemistry*. – 1979. – Vol. 51. – № 9. – P. 1493-1502.
69. Xu J. Adaptation of E. coli cell method for micro-scale nitrate measurement with the Griess reaction in culture media / J. Xu, X. Xu, W. Verstraete // *Journal of Microbiological Methods*. – 2000. – Vol. 41. – № 1. – P. 23-33.
70. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay / J. Sun, X. Zhang, M. Broderick, H. Fein // *Sensors*. – 2003. – Vol. 3. – № 8. – P. 276-284.
71. Analysis of Ozone and Nitric Oxide by a Chemiluminescent Method in Laboratory and Atmospheric Studies of Photochemical Smog / D. H. Stedman, E. E. Daby, F. Stuhl, H. Niki // *Journal of the Air Pollution Control Association*. – 1972. – Vol. 22. – № 4. – P. 260-263.
72. Nitric oxide integrated polyethylenimine-based tri-block copolymer for efficient antibacterial activity / J. Park, J. Kim, K. Singha [et al.] // *Biomaterials*. – 2013. – Vol. 34. – № 34. – P. 8766-8775.
73. Determination of Nitric Oxide by Glassy Carbon Electrodes Modified with Poly(Neutral Red) / T. Xiaorong, F. Cheng, Y. Bing, Z. Wuming // *Microchemical Journal*. – 1999. – Vol. 62. – № 3. – P. 377-385.
74. World Precision Instruments | Biosensing | Nitric Oxide Detection | ISO-NOPF200. – URL: <https://www.wpi-europe.com/products/biosensing/nitric-oxide-detection/iso-nopf200.aspx> (дата обращения: 17.01.2023). – Текст : электронный.
75. Maia L. B. Detection of Nitric Oxide by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy: Spin-Trapping with Iron-Dithiocarbamates / L. B. Maia, J. J. G. Moura. – Text : electronic // *Plant Nitric Oxide : Methods in Molecular Biology* / ed. K. J. Gupta. – New York, NY : Springer New York, 2016. – Vol. 1424. – URL: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-3600-7\\_8](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-3600-7_8) (date accessed: 17.01.2023).
76. Joseph J. Trapping of Nitric Oxide by Nitronyl Nitroxides: An Electron Spin Resonance Investigation / J. Joseph, B. Kalyanaraman, J. S. Hyde // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1993. – Vol. 192. – № 2. – P. 926-934.
77. Antagonistic action of imidazolineoxyl N-oxides against endothelium-derived relaxing factor/.bul.NO (nitric oxide) through a radical reaction / T. Akaike, M. Yoshida, Y. Miyamoto [et al.] // *Biochemistry*. – 1993. – Vol. 32. – № 3. – P. 827-832.
78. Reactions of Nitric Oxide with Nitronyl Nitroxides and Oxygen: Prediction of Nitrite and Nitrate Formation by Kinetic Simulation / N. Hogg, R. J. Singh, J. Joseph [et al.] // *Free Radical Research*. – 1995. – Vol. 22. – № 1. – P. 47-56.

79. The Reaction between Nitrite and Deoxyhemoglobin / K. T. Huang, A. Keszler, N. Patel [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280. – № 35. – P. 31126-31131.
80. Louro S. R. W. EPR spectral changes of nitrosyl hemes and their relation to the hemoglobin T-R transition / S. R. W. Louro, P. C. Ribeiro, G. Bemski // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*. – 1981. – Vol. 670. – № 1. – P. 56-63.
81. Hille R. Spectral transitions of nitrosyl hemes during ligand binding to hemoglobin. / R. Hille, J. S. Olson, G. Palmer // *Journal of Biological Chemistry*. – 1979. – Vol. 254. – № 23. – P. 12110-12120.
82. Electron Paramagnetic Resonance Analysis of Nitrosylhemoglobin in Humans during NO Inhalation / B. Piknova, M. T. Gladwin, A. N. Schechter, N. Hogg // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280. – № 49. – P. 40583-40588.
83. Biotransformation of Sodium Nitroprusside into Dinitrosyl Iron Complexes in Tissue of Ascites Tumors of Mice / A. L. Kleschyov, K. R. Sedov, P. I. Mordvintcev, A. F. Vanin // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1994. – Vol. 202. – № 1. – P. 168-173.
84. Varich V. I. Discovery of endogenous nitric oxide in the mouse liver by electron paramagnetic resonance / V. I. Varich, A. F. Vanin, L. M. Ovsiannikova // *Biofizika*. – 1987. – Vol. 32. – № 6. – P. 1062-1063.
85. On-line detection of nitric oxide formation in liquid aqueous phase by electron paramagnetic resonance spectroscopy / P. Mordvintcev, A. Mülsch, R. Busse, A. Vanin // *Analytical Biochemistry*. – 1991. – Vol. 199. – № 1. – P. 142-146.
86. EPR evidence for nitric oxide production from guanidino nitrogens of l-arginine in animal tissues in vivo / L. N. Kubrina, W. S. Caldwell, P. I. Mordvintcev [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 1992. – Vol. 1099. – № 3. – P. 233-237.
87. In Vivo Spin Trapping of Nitric Oxide in Mice / A. Komarov, D. Mattson, M. M. Jones [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1993. – Vol. 195. – № 3. – P. 1191-1198.
88. Komarov A. M. Detection of nitric oxide production in mice by spin-trapping electron paramagnetic resonance spectroscopy / A. M. Komarov, C.-S. Lai // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. – 1995. – Vol. 1272. – № 1. – P. 29-36.
89. Vanin A. F. Iron dithiocarbamate as spin trap for nitric oxide detection: Pitfalls and successes / A. F. Vanin, A. Huisman, E. E. Van Faassen. – Text : electronic // *Methods in Enzymology*. – Elsevier, 2002. – Vol. 359. – Iron dithiocarbamate as spin trap for nitric

oxide detection. – URL:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687902591692> (date accessed:  
17.01.2023).

90. Nagano T. Bioimaging of Nitric Oxide / T. Nagano, T. Yoshimura // *Chemical Reviews*. – 2002. – Vol. 102. – № 4. – P. 1235-1270.

91. Tonzetich Z. J. Detecting and Understanding the Roles of Nitric Oxide in Biology / Z. J. Tonzetich, L. E. McQuade, S. J. Lippard // *Inorganic Chemistry*. – 2010. – Vol. 49. – № 14. – P. 6338-6348.

92. Woolley J. F. Recent advances in reactive oxygen species measurement in biological systems / J. F. Woolley, J. Stanicka, T. G. Cotter // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2013. – Vol. 38. – № 11. – P. 556-565.

93. Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluoresceins / H. Kojima, N. Nakatsubo, K. Kikuchi [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 1998. – Vol. 70. – № 13. – P. 2446-2453.

94. Damiani P. Fluorometric determination of nitrite / P. Damiani // *Talanta*. – 1986. – Vol. 33. – № 8. – P. 649-652.

95. A Fluorometric Assay for the Measurement of Nitrite in Biological Samples / T. P. Misko, R. J. Schilling, D. Salvemini [et al.] // *Analytical Biochemistry*. – 1993. – Vol. 214. – № 1. – P. 11-16.

96. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins / N. Nakatsubo, H. Kojima, K. Kikuchi [et al.] // *FEBS Letters*. – 1998. – Vol. 427. – № 2. – P. 263-266.

97. In vitro scavenging activity for reactive oxygen and nitrogen species by nonsteroidal anti-inflammatory indole, pyrrole, and oxazole derivative drugs / E. Fernandes, D. Costa, S. A. Toste [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2004. – Vol. 37. – № 11. – P. 1895-1905.

98. Nagano T. Practical methods for detection of nitric oxide / T. Nagano // *Luminescence*. – 1999. – Vol. 14. – № 6. – P. 283-290.

99. Bioimaging of Nitric Oxide with Fluorescent Indicators Based on the Rhodamine Chromophore / H. Kojima, M. Hirotsu, N. Nakatsubo [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2001. – Vol. 73. – № 9. – P. 1967-1973.

100. Nagano T. Bioimaging Probes for Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species / T. Nagano // *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. – 2009. – Vol. 45. – № 2. – P. 111-124.

101. Heiduschka P. NO production during neuronal cell death can be directly assessed by a chemical reaction in vivo / P. Heiduschka, S. Thanos // *Neuroreport*. – 1998. – Vol. 9. – № 18. – P. 4051-4057.
102. Spatial Nitric Oxide Imaging Using 1,2-Diaminoanthraquinone to Investigate the Involvement of Nitric Oxide in Long-Term Potentiation in Rat Brain Slices / O. von Bohlen und Halbach, D. Albrecht, U. Heinemann, S. Schuchmann // *NeuroImage*. – 2002. – Vol. 15. – № 3. – P. 633-639.
103. Chen X. Direct nitric oxide imaging in cultured hippocampal neurons with diaminoanthraquinone and confocal microscopy / X. Chen // *Cell Biology International*. – 2001. – Vol. 25. – № 7. – P. 593-598.
104. Nitric Oxide Modulates Low-Mg<sup>2+</sup>-Induced Epileptiform Activity in Rat Hippocampal–Entorhinal Cortex Slices / S. Schuchmann, D. Albrecht, U. Heinemann, O. von Bohlen und Halbach // *Neurobiology of Disease*. – 2002. – Vol. 11. – № 1. – P. 96-105.
105. Bohlen und Halbach O. von. Nitric oxide imaging in living neuronal tissues using fluorescent probes / O. von Bohlen und Halbach // *Nitric Oxide*. – 2003. – Vol. 9. – № 4. – P. 217-228.
106. Highly Sensitive Fluorescence Probes for Nitric Oxide Based on Boron Dipyrromethene Chromophore-Rational Design of Potentially Useful Bioimaging Fluorescence Probe / Y. Gabe, Y. Urano, K. Kikuchi [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2004. – Vol. 126. – № 10. – P. 3357-3367.
107. Near-infrared emission of dibenzoxanthonium and its application in the design of nitric oxide probes / W. Liu, C. Fan, R. Sun [et al.] // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2015. – Vol. 13. – № 15. – P. 4532-4538.
108. Highly Sensitive Near-Infrared Fluorescent Probes for Nitric Oxide and Their Application to Isolated Organs / E. Sasaki, H. Kojima, H. Nishimatsu [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2005. – Vol. 127. – № 11. – P. 3684-3685.
109. A rhodamine-based fast and selective fluorescent probe for monitoring exogenous and endogenous nitric oxide in live cells / Q. Wang, X. Jiao, C. Liu [et al.] // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2018. – Vol. 6. – № 24. – P. 4096-4103.
110. Highly Water-Soluble BODIPY-Based Fluorescent Probe for Sensitive and Selective Detection of Nitric Oxide in Living Cells / G. K. Vegesna, S. R. Sripathi, J. Zhang [et al.] // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2013. – Vol. 5. – № 10. – P. 4107-4112.
111. Yu H. A Lysosome-Targetable and Two-Photon Fluorescent Probe for Monitoring Endogenous and Exogenous Nitric Oxide in Living Cells / H. Yu, Y. Xiao, L. Jin //

Journal of the American Chemical Society. – 2012. – Vol. 134. – № 42. – P. 17486-17489.

112. NIR in, far-red out: developing a two-photon fluorescent probe for tracking nitric oxide in deep tissue / Z. Mao, W. Feng, Z. Li [et al.] // *Chemical Science*. – 2016. – Vol. 7. – № 8. – P. 5230-5235.

113. Li H. Fluorescent probes for real-time measurement of nitric oxide in living cells / H. Li, A. Wan // *The Analyst*. – 2015. – Vol. 140. – № 21. – P. 7129-7141.

114. Deep-red fluorogenic probe for rapid detection of nitric oxide in Parkinson's disease models / M. Weng, X. Yang, Y. Ni [et al.] // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2019. – Vol. 283. – P. 769-775.

115. Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects / P. Wardman // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2007. – Vol. 43. – № 7. – P. 995-1022.

116. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations / B. Kalyanaraman, V. Darley-Usmar, K. J. A. Davies [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2012. – Vol. 52. – № 1. – P. 1-6.

117. A multilevel analytical approach for detection and visualization of intracellular NO production and nitrosation events using diaminofluoresceins / M. M. Cortese-Krott, A. Rodriguez-Mateos, G. G. C. Kuhnle [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2012. – Vol. 53. – № 11. – P. 2146-2158.

118. Jourdeuil D. Increased nitric oxide-dependent nitrosylation of 4,5-diaminofluorescein by oxidants: implications for the measurement of intracellular nitric oxide / D. Jourdeuil // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2002. – Vol. 33. – № 5. – P. 676-684.

119. Uhlénhut K. Pitfalls and limitations in using 4,5-diaminofluorescein for evaluating the influence of polyphenols on nitric oxide release from endothelial cells / K. Uhlénhut, P. Högger // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2012. – Vol. 52. – № 11-12. – P. 2266-2275.

120. Interfering with Nitric Oxide Measurements / X. Zhang, W.-S. Kim, N. Hatcher [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277. – № 50. – P. 48472-48478.

121. The aromatization of Hantzsch dihydropyridines with nitric oxide (NO) / T. Itoh, K. Nagata, M. Okada, A. Ohsawa // *Tetrahedron Letters*. – 1995. – Vol. 36. – № 13. – P. 2269-2272.

122. Reaction of Nitric Oxide with Amines / T. Itoh, K. Nagata, Y. Matsuya [et al.] // *The Journal of Organic Chemistry*. – 1997. – Vol. 62. – № 11. – P. 3582-3585.

123. The rational design of a highly sensitive and selective fluorogenic probe for detecting nitric oxide / S. Ma, D.-C. Fang, B. Ning [et al.] // *Chem. Commun.* – 2014. – Vol. 50. – № 49. – P. 6475-6478.
124. Dihydropyridine-based fluorescence probe for nitric oxide / S.-F. Ma, Q.-H. Wang, F.-T. Liu [et al.] // *RSC Advances.* – 2016. – Vol. 6. – № 89. – P. 85698-85703.
125. Water-soluble Hantzsch ester as switch-on fluorescent probe for efficiently detecting nitric oxide / H.-L. Wang, F.-T. Liu, A.-X. Ding [et al.] // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* – 2016. – Vol. 169. – P. 1-6.
126. Dihydropyridine-derived BODIPY probe for detecting exogenous and endogenous nitric oxide in mitochondria / C. Gao, L. Lin, W. Sun [et al.] // *Talanta.* – 2018. – Vol. 176. – P. 382-388.
127. Highly specific C–C bond cleavage induced FRET fluorescence for in vivo biological nitric oxide imaging / H. Li, D. Zhang, M. Gao [et al.] // *Chemical Science.* – 2017. – Vol. 8. – № 3. – P. 2199-2203.
128. Moncada S. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology / S. Moncada // *Pharmacol rev.* – 1991. – Vol. 43. – P. 109-142.
129. Ferrer-Sueta G. Chemical Biology of Peroxynitrite: Kinetics, Diffusion, and Radicals / G. Ferrer-Sueta, R. Radi // *ACS Chemical Biology.* – 2009. – Vol. 4. – № 3. – P. 161-177.
130. Diffusion-limited Reaction of Free Nitric Oxide with Erythrocytes / X. Liu, M. J. S. Miller, M. S. Joshi [et al.] // *Journal of Biological Chemistry.* – 1998. – Vol. 273. – № 30. – P. 18709-18713.
131. Tennyson A. G. Generation, Translocation, and Action of Nitric Oxide in Living Systems / A. G. Tennyson, S. J. Lippard // *Chemistry & Biology.* – 2011. – Vol. 18. – № 10. – P. 1211-1220.
132. Design of a Pyrene Scaffold Multifunctional Material: Real-Time Turn-On Chemosensor for Nitric Oxide, AIEE Behavior, and Detection of TNP Explosive / A. S. M. Islam, M. Sasmal, D. Maiti [et al.] // *ACS Omega.* – 2018. – Vol. 3. – № 8. – P. 10306-10316.
133. Selective sensing of nitric oxide by a 9,10-phenanthroquinone–pyridoxal based fluorophore / D. Maiti, A. S. M. Islam, M. Sasmal [et al.] // *Photochemical & Photobiological Sciences.* – 2018. – Vol. 17. – № 9. – P. 1213-1221.
134. Development of a Silicon-Rhodamine Based Near-Infrared Emissive Two-Photon Fluorescent Probe for Nitric Oxide / Z. Mao, H. Jiang, X. Song [et al.] // *Analytical Chemistry.* – 2017. – Vol. 89. – № 18. – P. 9620-9624.

135. A Smart Molecule for Selective Sensing of Nitric Oxide: Conversion of NO to HSNO; Relevance of Biological HSNO Formation / A. S. M. Islam, R. Bhowmick, K. Pal [et al.] // *Inorganic Chemistry*. – 2017. – Vol. 56. – № 8. – P. 4324-4331.
136. Turn-On Fluorescence Probe for Nitric Oxide Detection and Bioimaging in Live Cells and Zebrafish / Q. Han, J. Liu, Q. Meng [et al.] // *ACS Sensors*. – 2019. – Vol. 4. – № 2. – P. 309-316.
137. A Highly Selective Low-Background Fluorescent Imaging Agent for Nitric Oxide / Y. Yang, S. K. Seidlits, M. M. Adams [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2010. – Vol. 132. – № 38. – P. 13114-13116.
138. Selective and Real-Time Detection of Nitric Oxide by a Two-Photon Fluorescent Probe in Live Cells and Tissue Slices / C.-G. Dai, J.-L. Wang, Y.-L. Fu [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2017. – Vol. 89. – № 19. – P. 10511-10519.
139. Turn-on fluorescent probes for nitric oxide sensing based on the ortho-hydroxyamino structure showing no interference with dehydroascorbic acid / A. Beltrán, M. Isabel Burguete, D. R. Abánades [et al.] // *Chemical Communications*. – 2014. – Vol. 50. – № 27. – P. 3579.
140. Fluorescence of 1,2-Diaminoanthraquinone and its Nitric Oxide Reaction Product within Macrophage Cells / M. J. Marín, P. Thomas, V. Fabregat [et al.] // *ChemBioChem*. – 2011. – Vol. 12. – № 16. – P. 2471-2477.
141. Spectroscopic studies of 1,2-diaminoanthraquinone (DAQ) as a fluorescent probe for the imaging of nitric oxide in living cells / F. Galindo, N. Kabir, J. Gavrilovic, D. A. Russell // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2008. – Vol. 7. – № 1. – P. 126-130.
142. A novel fluorescence probe 9-(4-(1,2-diamine)benzene-N1-phenyl)acridine for nitric oxide determination / L. Ding, F. Yuan, L. Huang [et al.] // *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.* – 2014. – Vol. 29. – № 4. – P. 848-853.
143. Soh N. A fluorescent probe for monitoring nitric oxide production using a novel detection concept / N. Soh, Y. Katayama, M. Maeda // *The Analyst*. – 2001. – T. 126. – № 5. – C. 564-566.
144. Acridine and Acridone Derivatives, Anticancer Properties and Synthetic Methods: Where Are We Now? / P. Belmont, J. Bosson, T. Godet, M. Tiano // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. – 2007. – Vol. 7. – № 2. – P. 139-169.
145. Novel synthetic 2-amino-10-(3,5-dimethoxy)benzyl-9(10H)-acridinone derivatives as potent DNA-binding antiproliferative agents / C. Gao, F. Liu, X. Luan [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2010. – Vol. 18. – № 21. – P. 7507-7514.

146. Search for MDR modulators: Design, syntheses and evaluations of N-substituted acridones for interactions with p-glycoprotein and Mg<sup>2+</sup> / P. Singh, J. kaur, P. Kaur, S. Kaur // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2009. – Vol. 17. – № 6. – P. 2423-2427.
147. Velingkar V. S. Design, Synthesis and Evaluation of Substituted N-(3-Arylpropyl)-9,10-dihydro-9-oxoacridine-4-carboxamides as Potent MDR Reversal Agents in Cancer / V. S. Velingkar, V. D. Dandekar // *Chinese Journal of Chemistry*. – 2011. – Vol. 29. – № 3. – P. 504-510.
148. Potent acetylcholinesterase inhibitors: Synthesis, biological assay and docking study of nitro acridone derivatives / M. Parveen, A. Aslam, S. A. A. Nami [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2016. – Vol. 161. – P. 304-311.
149. Design and Synthesis of New Acridone-Based Nitric Oxide Fluorescent Probe / M. Panfilov, D. Chernova, I. Khalfina [et al.] // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – № 14. – P. 4340.
150. Lu H. Editorial: BODIPYs and Their Derivatives: The Past, Present and Future / H. Lu, Z. Shen // *Frontiers in Chemistry*. – 2020. – T. 8. – C. 290.
151. The internal heavy-atom effect on 3-phenylselanyl and 3-phenyltellanyl BODIPY derivatives studied by transient absorption spectroscopy / J. Al Anshori, T. Slanina, E. Palao, P. Klán // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2016. – Vol. 15. – № 2. – P. 250-259.
152. Zhang X.-F. BODIPY photosensitizers based on PET and heavy atom effect: A comparative study on the efficient formation of excited triplet state and singlet oxygen in BODIPY dimers and monomers / X.-F. Zhang // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2018. – Vol. 355. – P. 431-443.
153. Impact of iodine loading and substitution position on intersystem crossing efficiency in a series of ten methylated-meso-phenyl-BODIPY dyes / J. T. Ly, K. F. Presley, T. M. Cooper [et al.] // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2021. – Vol. 23. – № 21. – P. 12033-12044.
154. Effects of Concentration on Aggregation of BODIPY-Based Fluorescent Dyes Solution / Y. S. Marfin, E. A. Banakova, D. A. Merkushev [et al.] // *Journal of Fluorescence*. – 2020. – Vol. 30. – № 6. – P. 1611-1621.
155. On the Aggregation Behaviour and Spectroscopic Properties of Alkylated and Annelated Boron-Dipyrromethene (BODIPY) Dyes in Aqueous Solution / A. B. Descalzo, P. Ashokkumar, Z. Shen, K. Rurack // *ChemPhotoChem*. – 2020. – Vol. 4. – № 2. – P. 120-131.

156.  $\alpha$ -/ $\beta$ -Formylated Boron–Dipyrin (BODIPY) Dyes: Regioselective Syntheses and Photophysical Properties / C. Yu, L. Jiao, H. Yin [et al.] // *European Journal of Organic Chemistry*. – 2011. – Vol. 2011. – № 28. – P. 5460-5468.
157. Loudet A. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties / A. Loudet, K. Burgess // *Chemical Reviews*. – 2007. – T. 107. – № 11. – C. 4891-4932.
158. Wavelength dependent photochemistry of BODIPY–phenols and their applications in the fluorescent labeling of proteins / K. Zlatić, M. Cindrić, I. Antol [et al.] // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2021. – Vol. 19. – № 22. – P. 4891-4903.
159. The triplet excited state of Bodipy: formation, modulation and application / J. Zhao, K. Xu, W. Yang [et al.] // *Chemical Society Reviews*. – 2015. – Vol. 44. – № 24. – P. 8904-8939.
160. Zhang X.-F. Enhance the fluorescence and singlet oxygen generation ability of BODIPY: Modification on the meso-phenyl unit with electron withdrawing groups / X.-F. Zhang, Y. Zhang, B. Xu // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2017. – Vol. 349. – P. 197-206.
161. Singlet oxygen luminescence detector based on low-cost InGaAs avalanche photodiode / A. E. Moskalensky, T. Yu. Karogodina, A. Yu. Vorobev, S. G. Sokolovski // *HardwareX*. – 2021. – Vol. 10. – P. e00224.
162. Recent Progress of BODIPY Dyes With Aggregation-Induced Emission / Z. Liu, Z. Jiang, M. Yan, X. Wang // *Frontiers in Chemistry*. – 2019. – T. 7. – C. 712.
163. Novel *Meso* -Benzothiazole-Substituted BODIPY-Based AIE Fluorescent Rotor for Imaging Lysosomal Viscosity and Monitoring Autophagy / W.-J. Shi, R. Chen, J. Yang [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2022. – Vol. 94. – № 42. – P. 14707-14715.
164. J-aggregates of meso-[2.2]paracyclophanyl-BODIPY dye for NIR-II imaging / K. Li, X. Duan, Z. Jiang [et al.] // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 2376.
165. Effect of AIE Substituents on the Fluorescence of Tetraphenylethene-Containing BODIPY Derivatives / C. F. A. Gomez-Duran, R. Hu, G. Feng [et al.] // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2015. – Vol. 7. – № 28. – P. 15168-15176.
166. Fluorescent indicators for nitric oxide based on rhodamine chromophore / H. Kojima, M. Hirotani, Y. Urano [et al.] // *Tetrahedron Letters*. – 2000. – Vol. 41. – № 1. – P. 69-72.

167. Diaminorhodamine and Light-Activatable NO Donors: Photorelease Quantification and Potential Pitfalls / T. Yu. Dranova, A. Yu. Vorobev, E. V. Pisarev, A. E. Moskalensky // *Journal of Fluorescence*. – 2021. – Vol. 31. – № 1. – P. 11-16.
168. Photophysical properties of BODIPYs with sterically-hindered nitrophenyls in meso-position / M. A. Panfilov, T. Yu. Karogodina, Y. Songyin [et al.] // *Journal of Luminescence*. – 2022. – Vol. 246. – P. 118837.
169. Unexpected Nucleophilic Substitution Reaction of BODIPY: Preparation of the BODIPY–TEMPO Triad Showing Radical-Enhanced Intersystem Crossing / K. Xu, A. A. Sukhanov, Y. Zhao [et al.] // *European Journal of Organic Chemistry*. – 2018. – Vol. 2018. – № 7. – P. 885-895.
170. Light-Tunable Generation of Singlet Oxygen and Nitric Oxide with a Bichromophoric Molecular Hybrid: a Bimodal Approach to Killing Cancer Cells / A. Fraix, M. Blangetti, S. Guglielmo [et al.] // *ChemMedChem*. – 2016. – Vol. 11. – № 12. – P. 1371-1379.
171. Combination of PDT and NOPDT with a Tailored BODIPY Derivative / L. Lazzarato, E. Gazzano, M. Blangetti [et al.] // *Antioxidants*. – 2019. – Vol. 8. – № 11. – P. 531.
172. Michelson A. D. Platelets / A. D. Michelson. – 2nd ed. – Amsterdam ; Boston : Academic Press/Elsevier, 2007. – 1343 p.
173. Li J. L. Platelets as autonomous drones for hemostatic and immune surveillance / J. L. Li, A. Zarbock, A. Hidalgo // *Journal of Experimental Medicine*. – 2017. – T. 214. – № 8. – C. 2193-2204.
174. Brewer D. B. Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet / D. B. Brewer // *British Journal of Haematology*. – 2006. – Vol. 133. – № 3. – P. 251-258.
175. Lee M. Y. A Human Platelet Calcium Calculator Trained by Pairwise Agonist Scanning / M. Y. Lee, S. L. Diamond // *PLOS Computational Biology*. – 2015. – Vol. 11. – № 2. – P. e1004118.
176. Antiplatelet Therapy for Secondary Prevention of Vascular Disease Complications / R. R. Goli, M. M. Contractor, A. Nathan [et al.] // *Current Atherosclerosis Reports*. – 2017. – Vol. 19. – № 12. – P. 56.
177. Optical uncaging of ADP reveals the early calcium dynamics in single, freely moving platelets / D. V. Spiriyova, A. Y. Vorobev, V. V. Klimontov [et al.] // *Biomedical Optics Express*. – 2020. – Vol. 11. – № 6. – P. 3319-3330.

178. Transport limitations of nitric oxide inhibition of platelet aggregation under flow / J. L. Sylman, S. M. Lantvit, M. C. Vedepo [et al.] // *Annals of Biomedical Engineering*. – 2013. – Vol. 41. – № 10. – P. 2193-2205.
179. Bioapplications of small molecule Aza-BODIPY: from rational structural design to in vivo investigations / Z. Shi, X. Han, W. Hu [et al.] // *Chemical Society Reviews*. – 2020. – Vol. 49. – № 21. – P. 7533-7567.
180. Narender T. A simple and highly efficient method for the synthesis of chalcones by using borontrifluoride-etherate / T. Narender, K. Papi Reddy // *Tetrahedron Letters*. – 2007. – Vol. 48. – № 18. – P. 3177-3180.
181. A new practical synthesis of silyl enol ethers / P. Cazeau, F. Duboudin, F. Moulines [et al.] // *Tetrahedron*. – 1987. – Vol. 43. – № 9. – P. 2075-2088.
182. Synthesis of  $\beta$ -nitro ketones from geminal bromonitroalkanes and silyl enol ethers by visible light photoredox catalysis / H. Cao, S. Ma, Y. Feng [et al.] // *Chemical Communications*. – 2022. – Vol. 58. – № 11. – P. 1780-1783.
183. Nitric-Oxide-Releasing aza-BODIPY: A New Near-Infrared J-Aggregate with Multiple Antibacterial Modalities / X. Bao, S. Zheng, L. Zhang [et al.] // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2022. – Vol. 61. – № 32. – P. e202207250.
184. Fluorescent J-aggregates of cyanine dyes: basic research and applications review / J. L. Bricks, Y. L. Slominskii, I. D. Panas, A. P. Demchenko // *Methods and Applications in Fluorescence*. – 2017. – Vol. 6. – № 1. – P. 012001.
185. Diaminorhodamine and Light-Activatable NO Donors: Photorelease Quantification and Potential Pitfalls / T. Yu. Dranova, A. Yu. Vorobev, E. V. Pisarev, A. E. Moskalensky // *Journal of Fluorescence*. – 2021. – Vol. 31. – № 1. – P. 11-16.
186. A Ratiometric Acoustogenic Probe for in Vivo Imaging of Endogenous Nitric Oxide / C. J. Reinhardt, E. Y. Zhou, M. D. Jorgensen [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2018. – Vol. 140. – № 3. – P. 1011-1018.
187. Photocontrolled release of nitric oxide for precise management of NO concentration in a solution / E. O. Zhermolenko, T. Yu. Karogodina, A. Yu. Vorobev [et al.] // *Materials Today Chemistry*. – 2023. – Vol. 29. – P. 101445.
188. Design, synthesis and biological evaluation of new oligopyrrole carboxamides linked with tricyclic DNA-intercalators as potential DNA ligands or topoisomerase inhibitors / M.-H. David-Cordonnier, M.-P. Hildebrand, B. Baldeyrou [et al.] // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2007. – Vol. 42. – № 6. – P. 752-771.

189. Synthesis of Kojic Ester Derivatives as Potential Antibacterial Agent / C. Z. W. Sie, Z. Ngaini, N. Suhaili, E. Madiahlagan // *Journal of Chemistry*. – 2018. – Vol. 2018. – P. e1245712.
190. TEMPO/HCl/NaNO<sub>2</sub> Catalyst: A Transition-Metal-Free Approach to Efficient Aerobic Oxidation of Alcohols to Aldehydes and Ketones Under Mild Conditions / X. Wang, R. Liu, Y. Jin, X. Liang // *Chemistry - A European Journal*. – 2008. – Vol. 14. – № 9. – P. 2679-2685.
191. Nicholson K. Borane-Catalyzed, Chemoselective Reduction and Hydrofunctionalization of Enones Enabled by B–O Transborylation / K. Nicholson, T. Langer, S. P. Thomas // *Organic Letters*. – 2021. – Vol. 23. – № 7. – P. 2498-2504.
192. General atomic and molecular electronic structure system / M. W. Schmidt, K. K. Baldrige, J. A. Boatz [et al.] // *Journal of Computational Chemistry*. – 1993. – Vol. 14. – № 11. – P. 1347-1363.

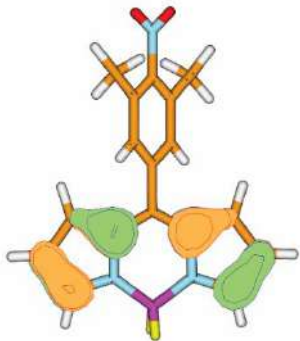
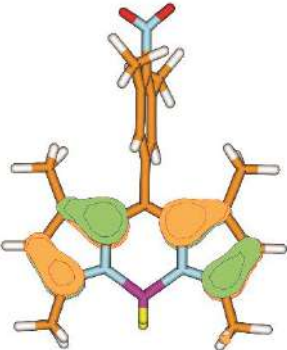
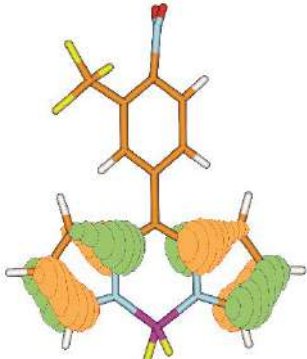
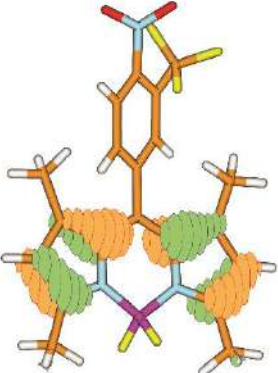
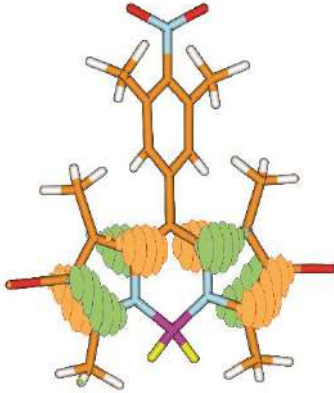
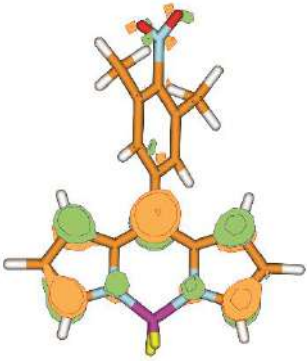
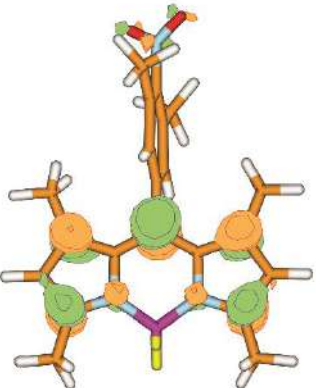
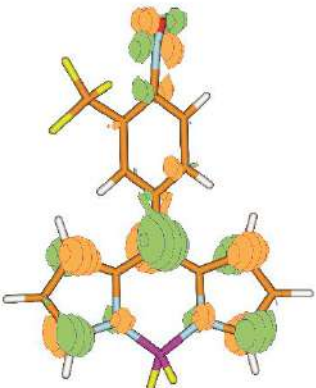
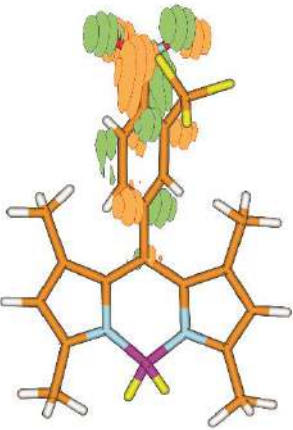
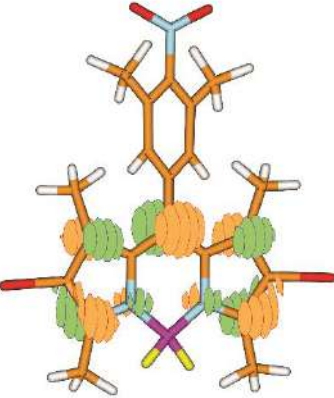
## Приложения

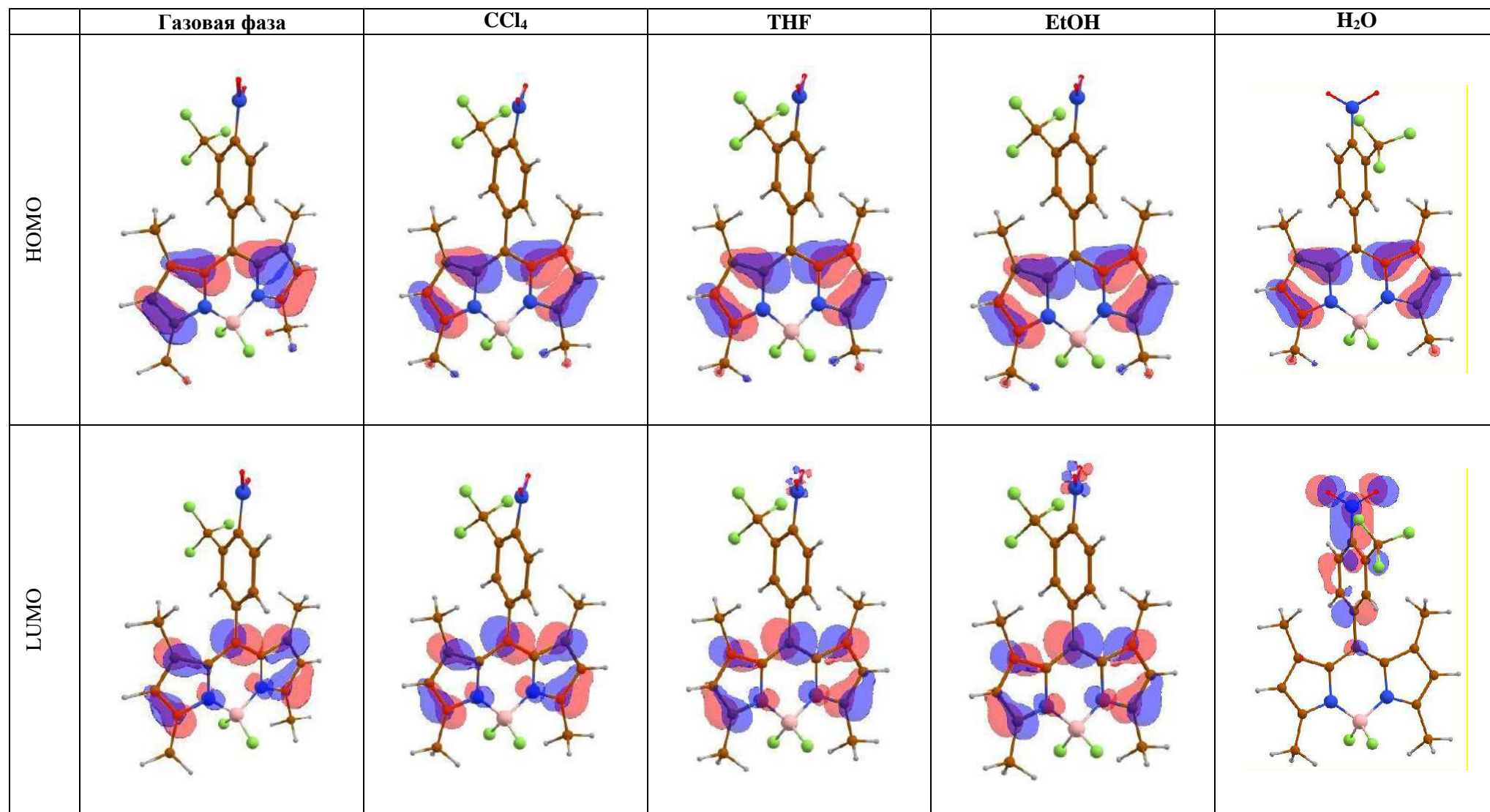
### Приложение 1. Рассчитанная энергия **136-140**.

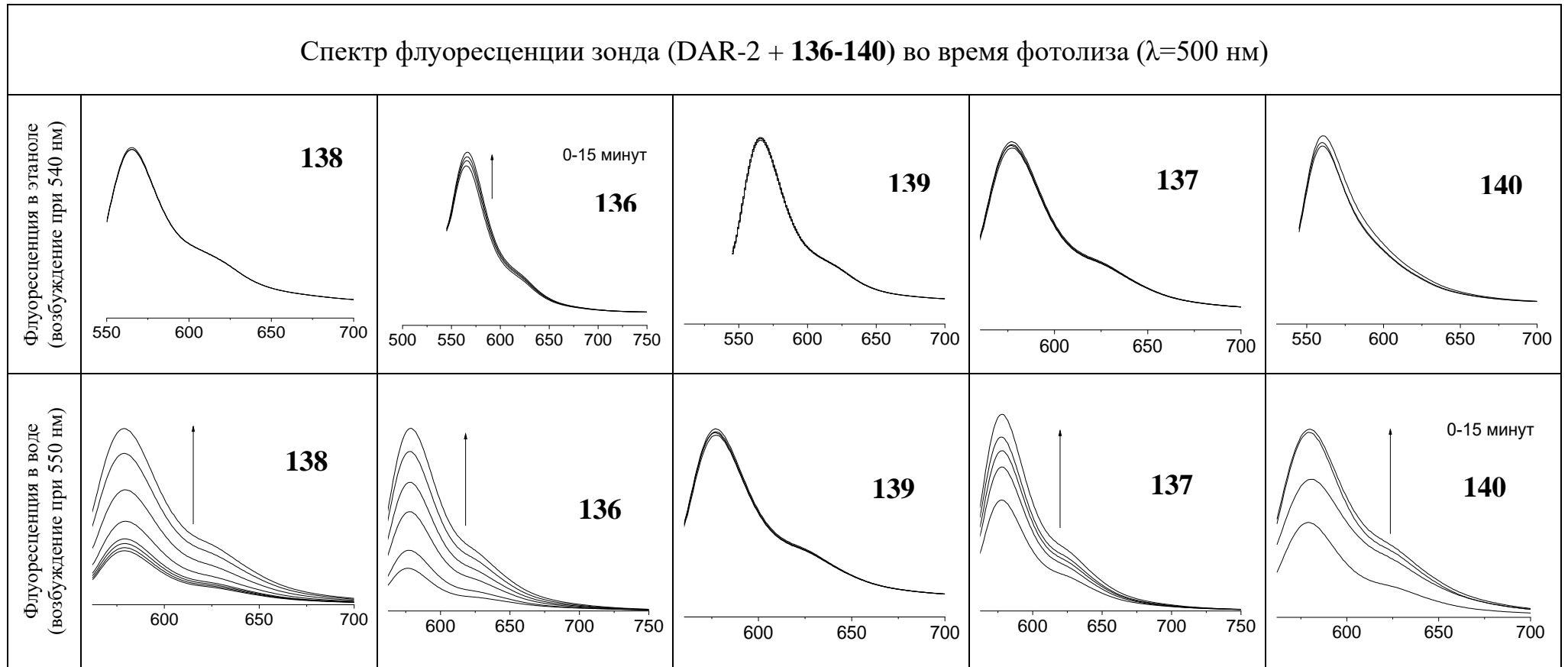
Молекула	Состояние	E(HARTREE)	$\Delta E_{tr}(eV)$	$\Delta E^*(eV)$
<b>138</b>	Синглетное основное состояние	-1195.077582		
	Триплетное состояние	-1195.017220	1.64	2.92
	Возбужденное синглетное состояние	-1194.970322		
<b>136</b>	Синглетное основное состояние	-1352.256958		
	Триплетное состояние	-1352.199035	1.58	2.85
	Возбужденное синглетное состояние	-1352.152362		
<b>139</b>	Синглетное основное состояние	-1453.466508		
	Триплетное состояние	-1453.408205	1.59	2.89
	Возбужденное синглетное состояние	-1453.360465		
<b>137</b>	Синглетное основное состояние	-1610.646425		
	Триплетное состояние	-1610.592621	1.46	2.84
	Возбужденное синглетное состояние	-1610.542053		
<b>140</b>	Синглетное основное состояние	-15192.538707		
	Триплетное состояние	-15192.480637	1.58	2.76
	Возбужденное синглетное состояние	-15192.437352		

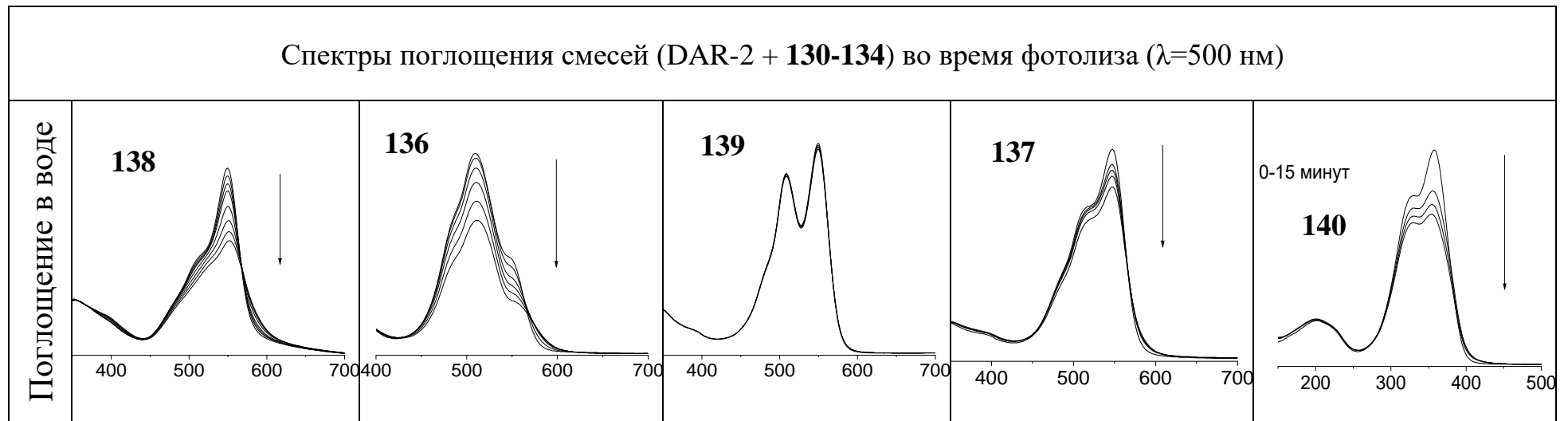
\*Расчет энергий триплетного и возбужденного состояний проведен для геометрии синглетного состояния.

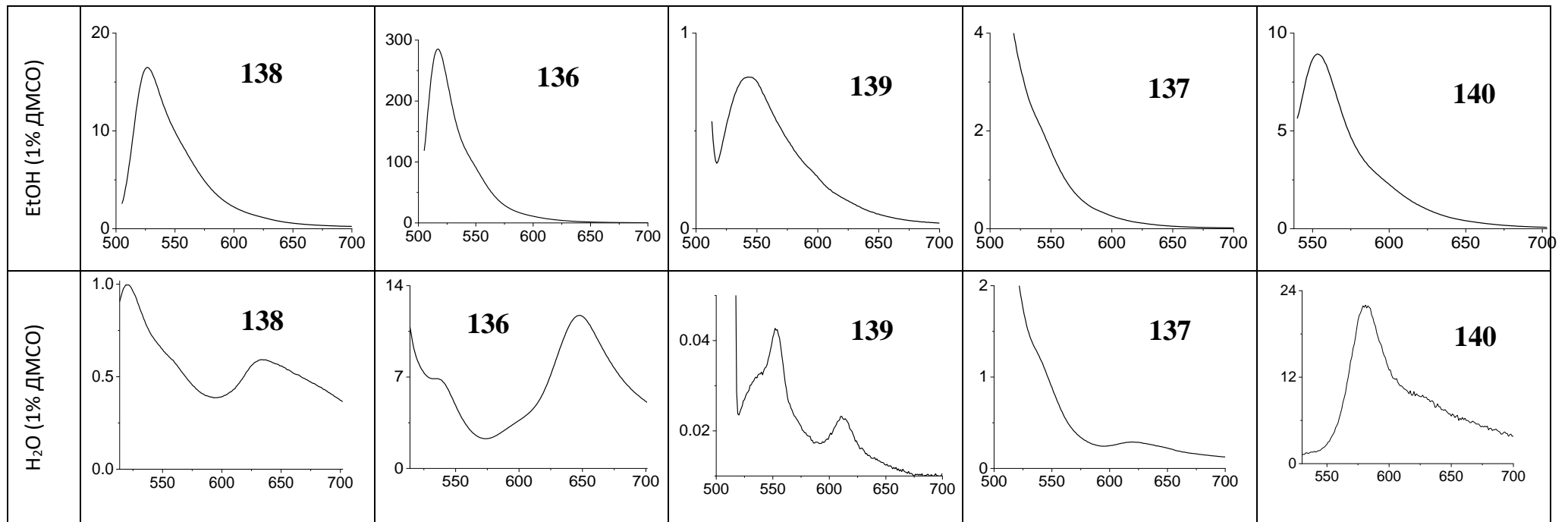
Приложение 2. Расчетное распределение плотности HOMO и LUMO для соединений **136-140**

	138	136	139	137	140
HOMO					
LUMO					

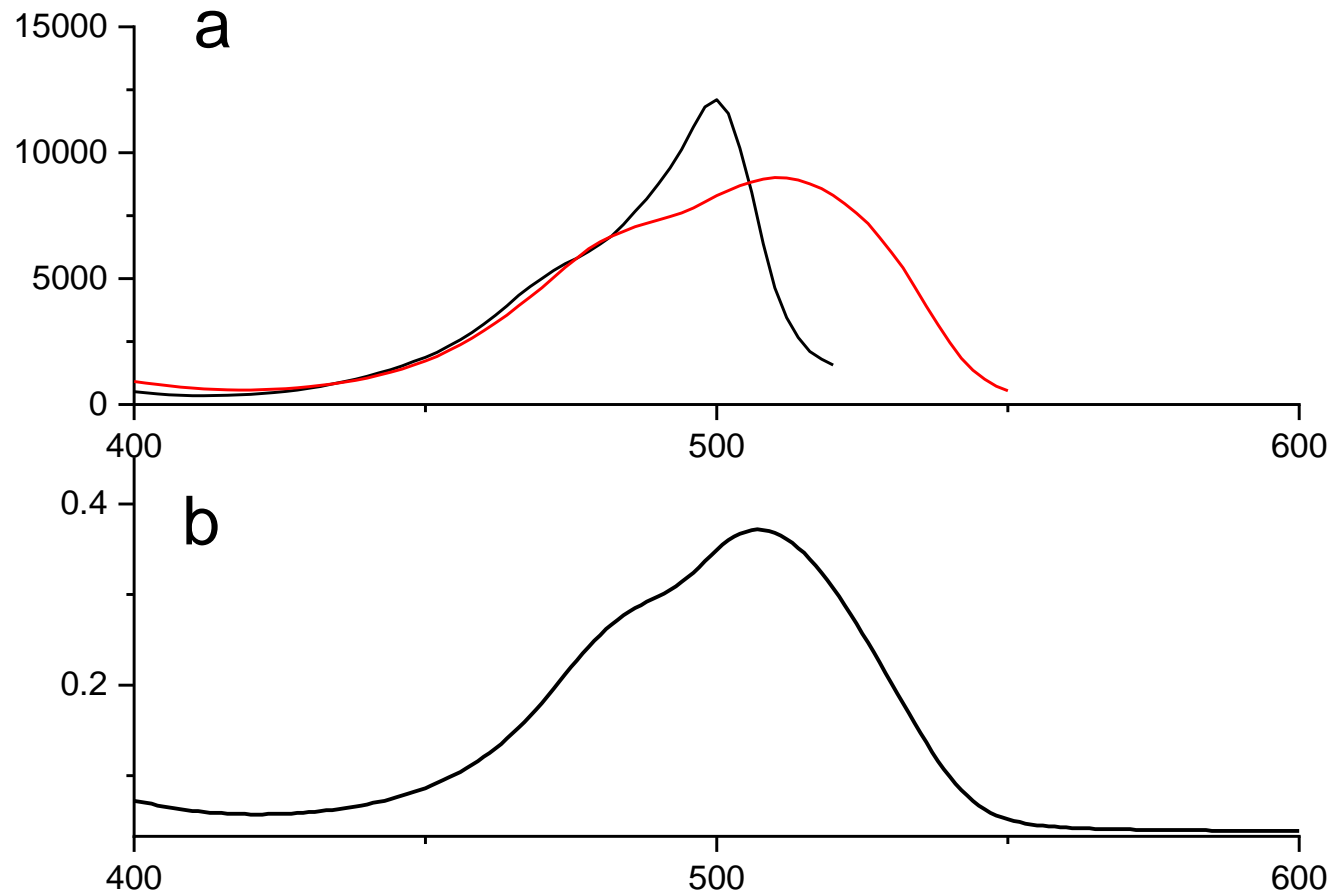
Приложение 3. Орбитали HOMO и LUMO для **137** в различных растворителях (GAMESS, DFT, CAMB3LYP/6-31G\*).

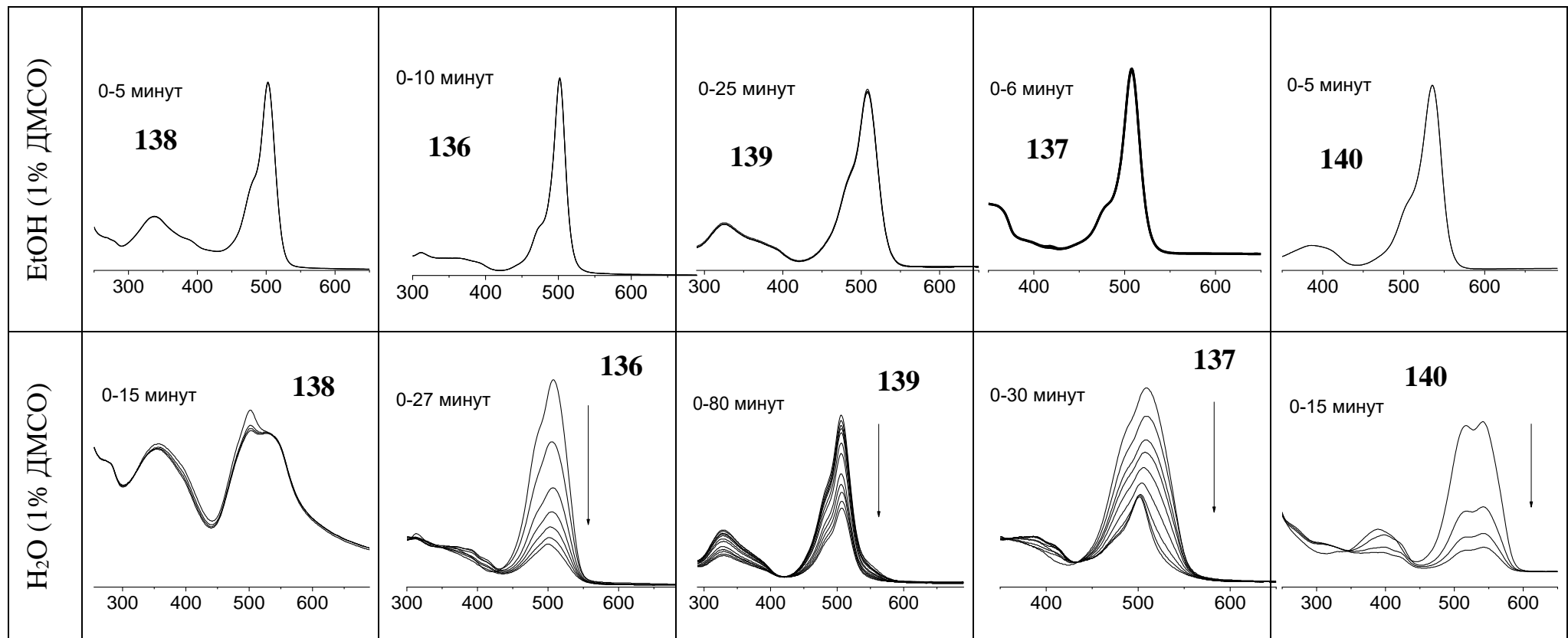
Приложение 4. Спектр флуоресценции зонда (DAR-2 + **136-140**) во время фотолиза ( $\lambda=500$  нм)

Приложение 5. Спектры поглощения смесей (DAR-2 + **130-134**) во время фотолиза ( $\lambda=500$  нм)

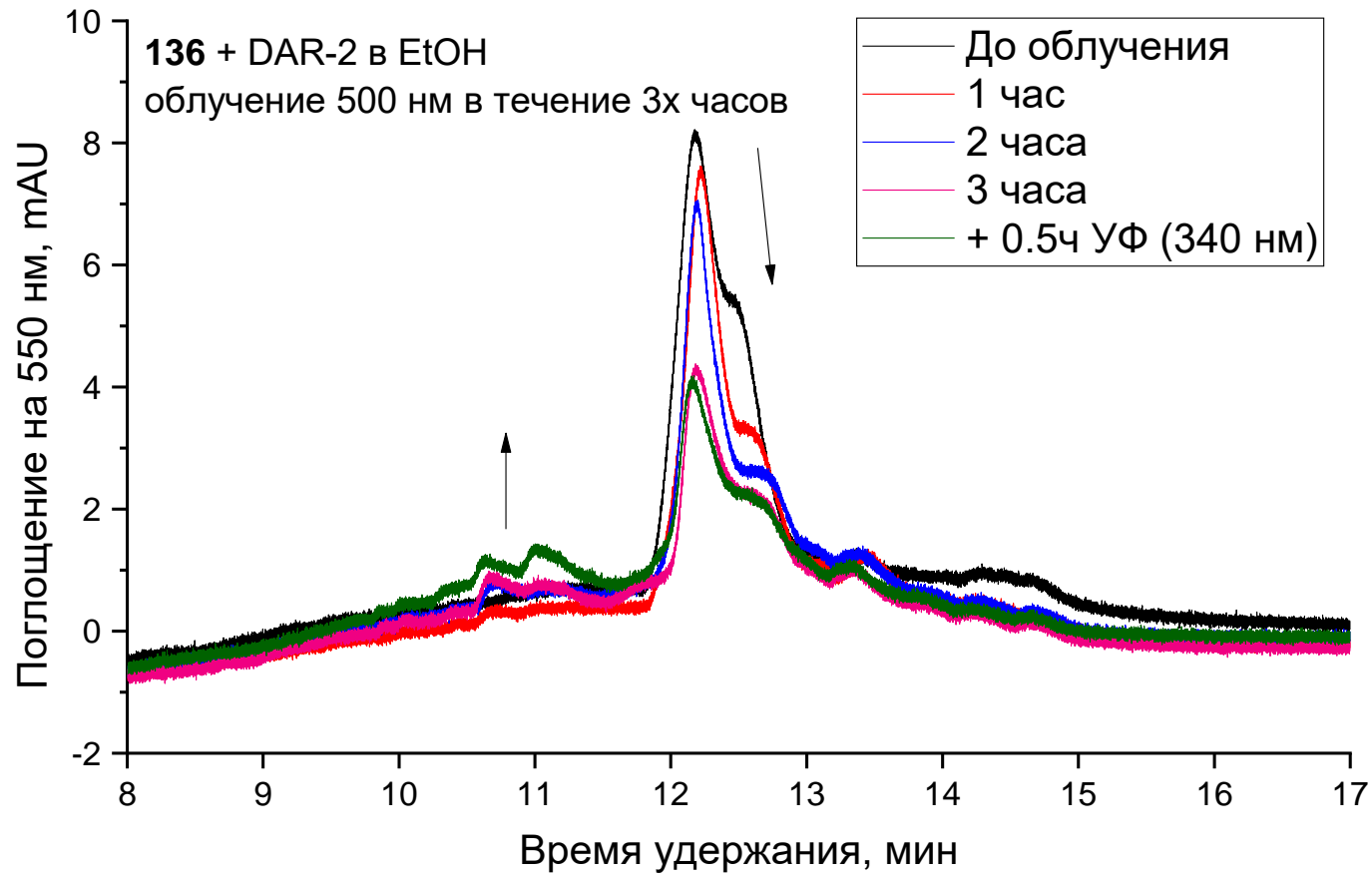
Приложение 6. Спектры флуоресценции микромолярных растворов **136-140** в этаноле и воде

Приложение 7. (а) Спектры флуоресценции **136**. Черная линия – испускание при 535 нм, красная - испускание при 647 нм; (b) Спектр поглощения **136** в воде



Приложение 8. Спектры поглощения микромолярных растворов **136-140** при фотолизе ( $\lambda=500$  нм) в этаноле и воде

Приложение 9. ВЭЖХ анализ этанольного раствора **136** + DAR-2 во время облучения светом 500 нм: поглощение на 550 нм от времени удержания. В этих условиях, триазольная форма DAR-2 имеет время удержания 10.3 минуты, однако на графике нет соответствующего сигнала. Зеленая линия соответствует дополнительному УФ облучению в течение 30 минут



Приложение 10. Определение фотовысвобождения NO с использованием реагента Грисса. Рост поглощения на 500 нм (зеленая стрелка) происходит в результате реакции реагента Грисса с нитритами.

