

## Синтез і спектральні дослідження стирилціанінів на основі 4-оксо-4,6,7,8-тетрагідропіроло[1,2-*a*]тієно[2,3-*d*]піримідину та 5-оксо-1,2,3,5-тетрагідропіроло[2,1-*b*]хіназоліну

А.О. Баланда, К.Д. Волкова, В.Б. Ковальська, В.П. Токар<sup>1</sup>, С.М. Ярмолук\*

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна*

*<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
вул. Академіка Глушкова, 6, Київ, 03147, Україна*

**Резюме.** Уперше синтезовано стирилціанінові барвники на основі 4-оксо-4,6,7,8-тетрагідропіроло[1,2-*a*]тієно[2,3-*d*]піримідину та 5-оксо-1,2,3,5-тетрагідропіроло[2,1-*b*]хіназоліну. Досліджено спектрально-люмінесцентні властивості одержаних барвників у вільному стані, у присутності нуклеїнових кислот і білка. Показано, що стирилціаніни на основі 4-оксо-4,6,7,8-тетрагідропіроло[1,2-*a*]тієно[2,3-*d*]піримідину специфічно зв'язуються з РНК, мають великі значення перерізу двофотонного поглинання в її присутності та можуть бути використані як РНК-специфічні флуоресцентні зонди.

**Ключові слова:** стирилціанінові барвники, детекція нуклеїнових кислот, двофотонне збудження.

**Вступ.** Стирилціанінові барвники широко застосовуються в різноманітних біологічних дослідженнях як зонди для неспецифічної флуоресцентної детекції білків та мембранні зонди, а також у флуоресцентній мікроскопії, оскільки мають здатність проникати в клітини [1-3]. Стирилціаніни використовуються для флуоресцентної детекції НК (нуклеїнових кислот) [4-8]. Відомо, що стирилціанінові барвники ефективно двофотонно збуджуються [9-11], а отже, можуть застосовуватися в мультифотонній флуоресцентній мікроскопії.

Раніше нами було синтезовано серію стирилціанінових барвників на основі різних азогетероциклів і вивчено їх спектральні властивості в присутності НК [5-7, 12]. Було показано, що стирилціаніни на основі бензотіазолового ядра можуть бути використані для флуорес-

центної детекції ДНК за одно- та двофотонного збудження (відповідно ОФЗ і ДФЗ).

У цій роботі нами продовжено дослідження взаємодії стирилціанінових барвників з НК. З метою одержання барвників, що специфічно взаємодіють з НК, ми синтезували стирилціаніни на основі 4-оксо-4,6,7,8-тетрагідропіроло[1,2-*a*]тієно[2,3-*d*]піримідину й вивчили їх спектрально-люмінесцентні властивості у вільному стані та в присутності НК і БСА (сироваткового альбуміну бика), а також дослідили ефективність ДФЗ комплексів одержаних барвників із РНК.

**Матеріали й методи.** Електронні спектри поглинання записувалися на приладі «Specord M-40» (Carl Zeiss, Німеччина). Для реєстрації спектрів флуоресценції використовували флуоресцентний спектрофотометр «Cary Eclipse» (Varian, Австралія). Усі виміри проводили в кварцевій кюветі (10x10 мм) при кімнатній температурі. Реєстрація спектрів флуоресценції за ДФЗ на довжині хвилі 1064 нм проводилась із застосуванням YAG:Nd<sup>3+</sup> лазера,

\* Corresponding author.

Tel./fax: +38044-5222458

E-mail address: sergiy@yarmoluk.org.ua

який генерував імпульси тривалістю 15 нс із частотою 6 Гц.  $^1\text{H}$  ЯМР спектри були записані в ДМСО- $d_6$  на приладі «Varian» (300 MHz) із використанням ТМС як внутрішнього стандарту.

**Приготування стокових розчинів.** Стокові розчини барвників ( $2 \times 10^{-3}$  М) готували розчиненням наважки барвників у ДМФА. Тотальна ДНК з лосося, сумарна дріжджова РНК та БСА були одержані з «Sigma» (США). Стокові розчини НК і БСА готували розчиненням наважки біополімеру в 0,05 М Tris-HCl буфері (рН 8,0). Концентрація НК і БСА в розчині становила  $6 \times 10^{-3}$  М п.о. (пар основ) для ДНК,  $1,2 \times 10^{-2}$  М о. для РНК і 0,2 мг/мл для БСА.

**Приготування робочих розчинів.** Робочі розчини барвників готували, розводячи стокові розчини барвників у буфері чи метанолі, робочі розчини комплексів барвник-ДНК (-РНК) — додаючи аліквоти стокових розчинів барвників і НК до буфера. Робочі розчини барвника в присутності БСА готували, змішуючи стокові розчини барвника й білка. Концентрації барвника, ДНК, РНК і БСА в робочих розчинах становили відповідно  $5 \times 10^{-6}$  М,  $6 \times 10^{-5}$  М п.о.,  $1,2 \times 10^{-4}$  М о. та 0,2 мг/мл. За ДФЗ концентрація стирилціанінових барвників і РНК у розчинах становила відповідно  $1,5 \times 10^{-5}$  М та  $3,6 \times 10^{-4}$  М о. Концентрація **Rhodamine 6G**, який використовувався для порівняння, становила  $5 \times 10^{-6}$  М.

Стирилціаніни було синтезовано за методами, наведеними нижче.

**Методика 1.** Одержання 4-оксо-4,6,7,8-тетрагідропіроло[1,2-*a*]тієно[2,3-*d*]піримідинових гетероциклів. У розчин 0,04 моль **1.1** та 0,044 моль 2-піролідінону в 30 мл абсолютного дихлоретану при охолодженні додавали 4 мл  $\text{POCl}_3$ . Реакційну суміш кип'ятили 30 хв. Після охолодження додавали розчин 5 г ацетату натрію в 30 мл води та кип'ятили 20 хв. Органічний шар відділяли, водний екстрагували дихлоретаном. Об'єднані екстракти промивали водою, дихлоретан випаровували під зниженим тиском, а утворений осад перекристалізували зі спирту. Вихід 70-80 %.

**Методика 2.** Одержання четвертинних солей. Суміш 0,001 моль 1,2,3,5-тетрагідропіроло[2,1-*b*]хіназолін-5-ону чи заміщеного 4-оксо-4,6,7,8-тетрагідропіроло[1,2-*a*]тієно[2,3-*d*]піримідину (**1.2**) і 0,0016 моль алкілйодиду в 3 мл діоксану кип'ятили 8 год. Після охолод-

ження осад фільтрували та промивали діетиловим етером. Продукт використовували без додаткового очищення. Вихід 85-90 %.

**Методика 3.** Одержання стирилціанінових барвників. Суміш 0,001 моль четвертинної солі, 0,0011 моль *n*-диметиламінобензальдегіду та 5 крапель піперидину в 4 мл *n*-бутанолу кип'ятили протягом години. Осад, що утворився, фільтрували, промивали діетиловим етером та перекристалізували з метанолу.

**Результати й обговорення.** Синтез стирилціанінів. Загальний метод синтезу барвників **Stp-1—Stp-5** (рис. 1) наведено на схемі 1. Похідні 2-аміно-3-карбетокситіофенів одержували за реакцією Гевальда [13] з етилціаноацетату, сірки й відповідного кетону (2-бутанон, циклогексанон та 4-*трет*-бутилциклогексанон). 4,6,7,8-тетрагідропіроло[1,2-*a*]тієно[2,3-*d*]піримідин-4-они синтезували при взаємодії (**1.1**) та 2-піролідінону (методика 1). Нагриваючи одержаний гетероцикл із надлишком йодистого метилу (у випадку **Stp-5** йодистого етилу) в діоксані, одержували четвертинні солі (методика 2). Для отримання барвників **Stp-1—Stp-5** суміш відповідної четвертинної солі та *n*-диметиламінобензальдегіду кип'ятили в *n*-бутанолі в присутності піперидину як каталізатора (методика 3). При спробі провести синтез в етанолі, який зазвичай застосовують при одержанні стирилціанінів, конденсація практично не проходила навіть при довготривалому кип'ятінні, а коли використовували *n*-бутанол, що кипить більш високо, реакція проходила менше ніж за годину.

Барвник **Sbp** було одержано з етилантранілату та 2-піролідінону за аналогічною схемою, **Stp-6** — конденсацією 2,3-диметил-4,6,7,8-тетрагідропіроло[1,2-*a*]тієно[2,3-*d*]піримідин-4-ону і *n*-диметиламінобензальдегіду згідно з [14].

Структури синтезованих барвників перевірялися за допомогою  $^1\text{H}$  ПМР спектроскопії та мас-спектрометрії (дані не наводяться).

**Спектральні властивості барвників в індивідуальному стані.** Спектральні характеристики синтезованих стирилціанінів подано в табл. 1. Максимуми спектрів поглинання в буфері барвників **Stp-1—Stp-4** і **Sbp** знаходяться в інтервалі 472-487 нм. Для барвника **Stp-5**, окрім основного максимуму на 412 нм, спостерігаються довго- та короткохвильові плечі

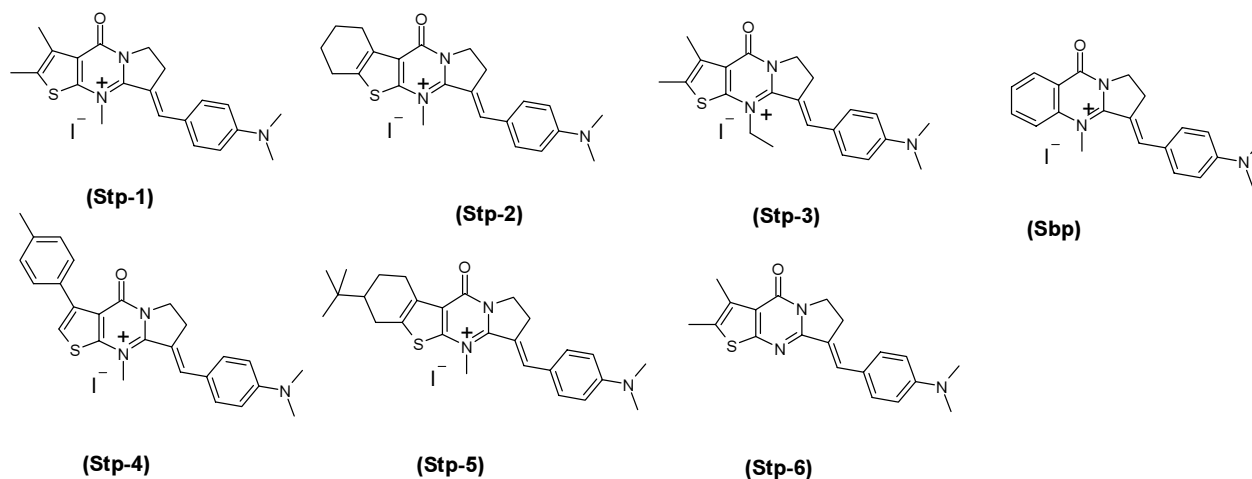


Рис. 1. Структури синтезованих барвників **Stp-1**–**Stp-6** і **Sbp**.

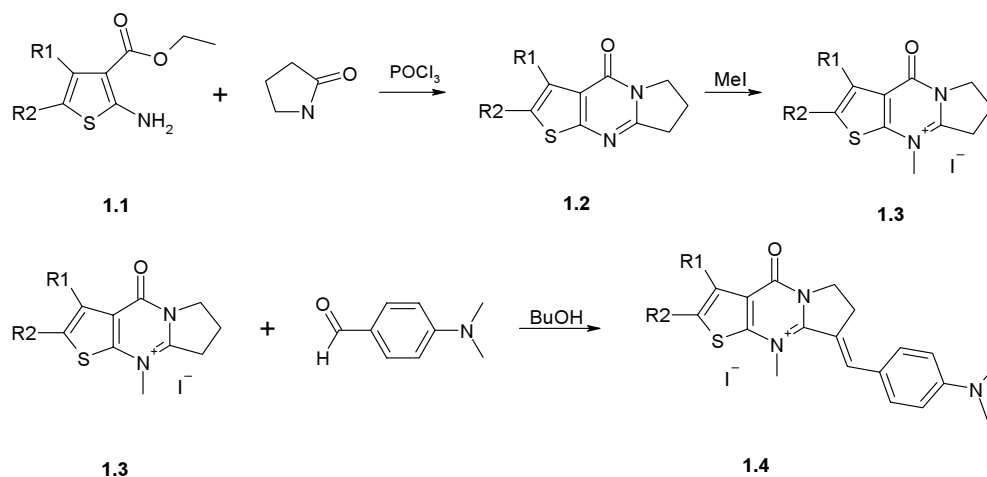
на 449 і 394 нм відповідно. Це можна пояснити утворенням агрегатних структур різних типів або з різною кількістю молекул. Крива поглинання ціаніну **Stp-6** має максимум на 397 нм з плечем на 453 нм.

Максимуми збудження флуоресценції досліджуваних барвників зсунуті в довгохвильову ділянку спектра відносно максимумів спектрів поглинання до 20 нм. Для більшості стирилціанінів максимуми спектрів флуоресценції в буфері знаходяться між 575 та 584 нм (для **Stp-6** крива флуоресценції має максимум на 557 нм з плечем на 599 нм). Барвники мають низькі значення інтенсивності флуоресценції (1,5–2,9 у.о.). Винятком є незаряджений стирил **Stp-6**, для якого інтенсивності флуоресценції в буфері становлять 16,2 у.о.

*Спектрально-люмінесцентні властивості барвників у присутності НК і БСА.* Характеристики поглинання, збудження флуоресценції та емісії досліджуваних барвників у присутності НК наведено в табл. 1. Максимуми поглинання барвників (за винятком **Stp-6**) у присутності НК зсунуті в довгохвильову область спектра до 8 нм відносно відповідних максимумів вільних барвників і знаходяться між 477 та 491 нм. Для більшості стирилціанінів форми кривих поглинання при додаванні НК практично не змінюються. Виняток становить барвник **Stp-6**, для якого максимум поглинання у присутності ДНК має короткохвильовий зсув 5 нм. Крім того, в спектрі поглинання цього стирилу в комплексі з ДНК відсутнє плече, яке спостерігається в довгохвильовій області спектра

Схема 1

Синтез стирилціанінів на основі 4-оксо-4,6,7,8-тетрагідропіроло[1,2-а]тієно[2,3-d]піримідинію



Спектрально-люмінесцентні характеристики стирилціанінових барвників **Stp-1—Stp-6** і **Sbp**

Барвник	У буфері				У присутності ДНК					У присутності РНК					У присутності БСА				
	$\lambda_{\text{полл}}^*$ нм	$\lambda_{\text{збф}}^*$ нм	$\lambda_{\text{фл}}^*$ нм	$I_0^*$ у.о.	$\lambda_{\text{полл}}^*$ нм	$\lambda_{\text{збф}}^*$ нм	$\lambda_{\text{фл}}^*$ нм	$I^{\text{ДНК}}$ , у.о.	$I^{\text{ДНК}}/I_0$	$\lambda_{\text{полл}}^*$ нм	$\lambda_{\text{збф}}^*$ нм	$\lambda_{\text{фл}}^*$ нм	$I^{\text{РНК}}$ , у.о.	$I^{\text{РНК}}/I_0$	$\lambda_{\text{полл}}^*$ нм	$\lambda_{\text{збф}}^*$ нм	$\lambda_{\text{фл}}^*$ нм	$I^{\text{БСА}}$ , у.о.	$I^{\text{БСА}}/I_0$
<b>Stp-1</b>	472	487	575	2,2	480	525	585	44,4	20	477	544	587	235	99	472	505	572	5,3	2,4
<b>Stp-2</b>	474	493	578	2,9	481	528	587	52,4	18	480	542	588	234	80,7	473	517	571	11	3,8
<b>Stp-3</b>	474	492	576	2,4	480	526	583	31,5	13,1	481	545	589	250	104	474	508	573	5,6	2,3
<b>Stp-4</b>	483	503	583	2,3	488	534	591	61	26,5	488	547	593	142	61,7	485	518	572	12	5,2
<b>Stp-5</b>	394* 412 449*	490	576	1,5	397 452* 517*	531	585	37	24,7	396 415 449*	544	588	170	133	555	511	570	13,8	9,2
<b>Stp-6</b>	397 453*	389	557 599*	16,2 12,4*	392	393	554	17,4	1,07	394 449*	428	519	21,3	1,31	402	400	480	1168	72
<b>Sbp</b>	487	496	584	2,0	491	531	591	40,1	20	488	548	596	46,1	23	487	502	580	2,9	1,5

Примітка. \* — виявляється у вигляді плеча.

для вільного барвника в буфері та у присутності РНК. Для барвника **Stp-5** у присутності ДНК спостерігається перерозподіл інтенсивностей смуг поглинання: збільшується інтенсивність короткохвильової смуги (на 397 нм) та зменшується інтенсивність довгохвильової (на 452 нм), у якій з'являється плече на 517 нм.

Для досліджуваних барвників у комплексах з НК максимуми збудження флуоресценції мають сильний батохромний зсув відносно максимумів поглинання (до 47 нм у присутності ДНК і 67 нм у присутності РНК). Максимуми флуоресценції барвників **Stp-1—Stp-5** та **Sbp** у присутності ДНК/РНК знаходяться між 583 та 596 нм (рис. 2). Підвищення інтенсивності флуоресценції стирилціанінів у присутності РНК значно більше, ніж у присутності ДНК. Так, значення  $I^{\text{ДНК}}/I_0$  значно менші (13,1-26,5), ніж значення  $I^{\text{РНК}}/I_0$  (61,7-133). Винятком є барвник **Sbp** на основі хіназолінового гетероциклу, для якого підвищення інтенсивності флуоресценції у присутності ДНК та РНК майже однакове і складає 20 та 23 рази відповідно. Отже, стирилціаніни на основі тієно[2,3-*d*]піримідин-4-онів, на відміну від стирилціанінів на основі хіназолінового гетероциклу, проявляють РНК-специфічність.

Слід зазначити, що барвники з аліфатичними замісниками у 2 та 3 положеннях 4-оксо-4,6,7,8-тетрагідро піроло[1,2-*a*]тієно[2,3-*d*]пі-

римідину проявляють більшу РНК-специфічність і мають більші значення підвищення інтенсивності флуоресценції в комплексах із РНК, ніж барвник **Stp-4** з ароматичним замісником у 3 положенні.

Максимуми спектрів флуоресценції для стирилу **Stp-6** у присутності ДНК та РНК знаходяться на 554 і 519 нм відповідно. Підвищення інтенсивності флуоресценції **Stp-6** у присутності НК майже не відбувається.

Максимуми спектрів поглинання більшості барвників у присутності БСА розташовані в тому ж спектральному регіоні, що й відповідні максимуми поглинання барвників у вільному стані, а саме між 472 та 487 нм. Для **Stp-6** мак-

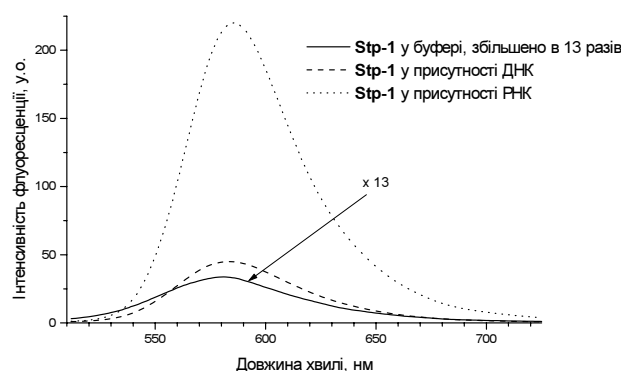


Рис. 2. Профілі спектрів флуоресценції барвника **Stp-1** у вільному стані та у присутності нуклеїнових кислот. Низькоінтенсивну смугу флуоресценції вільного барвника збільшено в 13 разів.

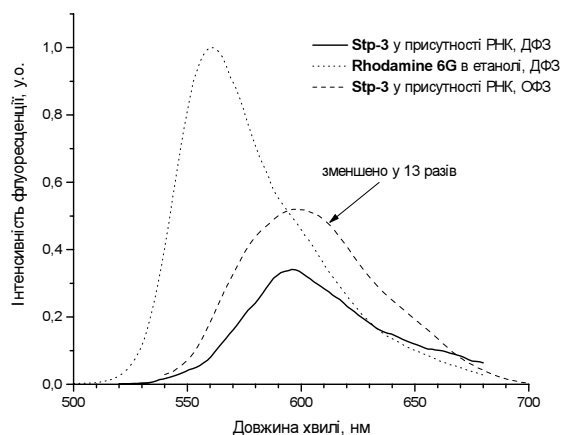


Рис. 3. Спектри флуоресценції барвника **Stp-3** у присутності РНК за ОФЗ та ДФЗ і **Rhodamine 6G** за ДФЗ.

симум поглинання в комплексі з БСА знаходиться на 402 нм.

Для стирилціанінів **Stp-1—Stp-5** і **Sbp** максимумами збудження флуоресценції у присутності БСА зсунуті в довгохвильову ділянку спектра до 44 нм відносно відповідних максимумів поглинання. Максимуми флуоресценції цих барвників у присутності БСА знаходяться між 570 та 580 нм. Для **Stp-6** максимум флуоресценції в комплексі з БСА зсунутий у короткохвильову ділянку спектра на 77 нм, тоді як у випадку ДНК і РНК цей зсув складає 3 та 38 нм відповідно.

Підвищення інтенсивності флуоресценції досліджуваних барвників у присутності БСА досить низьке і складає 1,5–9,2 рази (за винятком **Stp-6**). Емісія флуоресценції цих барвників у присутності БСА знаходиться в межах 2,9–13,8 у.о. Незаряджений стирил **Stp-6** демонструє високу інтенсивність флуоресценції (1168 у.о.) і значне її підвищення в присутності БСА.

*Вивчення двофотонного поглинання барвників у присутності РНК.* Ми дослідили ефективність ДФЗ комплексів зазначених барвників із РНК за використання YAG:Nd<sup>3+</sup> лазера з максимумом випромінювання на 1064 нм. Для барвників **Stp-1, Stp-2, Stp-3** і **Stp-5** у присутності РНК спостерігалась інтенсивна флуоресценція за двофотонного поглинання (рис. 3). Інтенсивність флуоресценції комплексів барвник-РНК була того ж порядку, що й інтенсивність флуоресценції розчину **Rhodamine 6G** в етанолі за ДФЗ. Положення макси-

мумів флуоресценції за ДФЗ для стирилціанінів **Stp-2, Stp-3** та **Stp-5** у присутності РНК були близькими до максимумів флуоресценції за ОФЗ на 532 нм. Для барвника **Stp-1** спостерігався 19-нм батохромний зсув спектра флуоресценції за ДФЗ у порівнянні зі спектром флуоресценції за ОФЗ. Форми смуг флуоресценції досліджуваних стирилціанінів у присутності РНК за ДФЗ були схожі на відповідні смуги флуоресценції за ОФЗ.

Отже, досліджені стирилціаніни можуть бути використані як зонди для детекції РНК за двофотонного поглинання.

**Висновки.** Уперше синтезовано серію стирилціанінів на основі 4-оксо-4,6,7,8-тетрагідропіроло[1,2-*a*]тієно[2,3-*d*]піримідину та 5-оксо-1,2,3,5-тетрагідропіроло[2,1-*b*]хіназоліну й досліджено їх спектральні властивості у вільному стані та в присутності НК і БСА.

Установлено, що інтенсивність флуоресценції стирилціанінів на основі 4-оксо-4,6,7,8-тетрагідропіроло[1,2-*a*]тієно[2,3-*d*]піримідину в присутності РНК у 8 разів більша, ніж інтенсивність флуоресценції цих барвників у присутності ДНК. Стирилціаніни **Stp-1, Stp-2** та **Stp-3** мають значну емісію у присутності РНК і можуть використовуватися як флуоресцентні зонди для специфічної детекції РНК.

Стирилціанін на основі 5-оксо-1,2,3,5-тетрагідропіроло[2,1-*b*]хіназоліну, на відміну від стирилціанінів на основі 4-оксо-4,6,7,8-тетрагідропіроло[1,2-*a*]тієно[2,3-*d*]піримідину, має однакову інтенсивність флуоресценції у присутності ДНК та РНК.

Барвник **Stp-6** у присутності БСА має високу емісію флуоресценції (1168 у.о.) та 72-кратне її збільшення, тоді як у присутності НК спостерігаються незначні зміни інтенсивності флуоресценції.

Одержано спектри флуоресценції барвників **Stp-1, Stp-2, Stp-3** та **Stp-5** у присутності РНК за двофотонного поглинання на 1064 нм з використанням YAG:Nd<sup>3+</sup> 20 нс лазера. Синтезовані стирилціаніни можуть використовуватися як флуоресцентні зонди для детекції РНК за ДФЗ.

<sup>1</sup>H ПМР спектри

синтезованих стирилціанінів\*

8-[1-(4-диметиламінофеніл)метилідене]-2,3,9-триметил-4-оксо-4,6,7,8-тетрагідропіроло[1,2-*a*]тієно[2,3-*d*]піримідин-9-ий йодид

**(Stp-1).** Вихід: 74 %;  $T_{\text{пл}}$  218-220 °C з розкл.;  $^1\text{H}$  ПМР (ДМСО- $d_6$ ): 2,43 (3H, c), 2,48 (3H, c), 3,06 (6H, c), 3,32 (2H+H<sub>2</sub>O, м), 4,17-4,27 (5H, м), 6,85 (2H, д, J=8,3), 7,61 (2H, д, J=8,3), 7,87 (1H, c).

1-[1-(4-диметиламінофеніл)метилідене]-11-метил-5-оксо-1,2,3,5,6,7,8,9-октагідробензо[4,5]тієно[2,3-d]піроло[1,2-a]піримідин-11-ий йодид (**Stp-2**). Вихід: 68 %;  $T_{\text{пл}}$  242-244 °C;  $^1\text{H}$  ПМР (ДМСО- $d_6$ ): 1,83 (4H, м), 2,89 (4H, м), 3,07 (6H, c), 4,15-4,34 (5H, м), 6,85 (2H, д, J=8,1), 7,62 (2H, д, J=8,1), 7,89 (1H, c).

8-[1-(4-диметиламінофеніл)метилідене]-9-етил-2,3-диметил-4-оксо-4,6,7,8-тетрагідропіроло[1,2-a]тієно[2,3-d]піримідин-9-ий йодид (**Stp-3**). Вихід: 71 %;  $T_{\text{пл}}$  210-213 °C з розкл.;  $^1\text{H}$  ПМР (ДМСО- $d_6$ ): 1,67 (3H, т, J=8,0), 2,43 (3H, c), 2,48 (3H, c), 3,07 (6H, c), 3,27-3,42 (2H+H<sub>2</sub>O, м), 4,19 (2H, т, J=7,3), 4,61 (2H, д, J=7,2), 6,86 (2H, д, J=8,8), 7,57-7,63 (3H, м).

8-[1-(4-диметиламінофеніл)метилідене]-9-метил-3-(4-метилфеніл)-4-оксо-4,6,7,8-тетрагідропіроло[1,2-a]тієно[2,3-d]піримідин-9-ий йодид (**Stp-4**). Вихід: 78 %;  $T_{\text{пл}}$  235-236 °C;  $^1\text{H}$  ПМР (ДМСО- $d_6$ ): 2,36 (3H, c), 3,08 (6H, c), 3,34 (2H+H<sub>2</sub>O, м), 4,20 (2H, т, J=6,8), 4,31 (3H, c), 6,87 (2H, д, J=8,3), 7,25 (2H, д, J=7,8), 7,41 (2H, д, J=7,8), 7,63 (2H, д, J=8,8), 7,73 (1H, c), 7,93 (1H, c).

8-(трет-бутил)-1-[1-(4-диметиламіно-

феніл)метилідене]-11-метил-5-оксо-1,2,3,5,6,7,8,9-октагідробензо[4,5]тієно[2,3-d]піроло[1,2-a]піримідин-11-ий йодид (**Stp-5**). Вихід: 80 %;  $T_{\text{пл}}$  165 °C з розкл.;  $^1\text{H}$  ПМР (ДМСО- $d_6$ ): 0,94 (9H, c), 1,29 (1H, c), 1,53 (1H, c), 2,06 (1H, д, J=12,7), 2,54-2,71 (2H, м), 2,95 (1H, уш д, J=16,1), 3,19 (1H, уш д, J=17,0), 3,32 (2H, м), 4,20 (2H, д, J=8,3), 4,23 (3H, c), 6,86 (2H, д, J=8,3), 7,6 (2H, д, J=8,0), 7,87 (1H, c).

8-[1-(4-диметиламінофеніл)метилідене]-2,3-диметил-4,6,7,8-тетрагідропіроло[1,2-a]тієно[2,3-d]піримідин-4-он (**Stp-6**). Вихід: 69 %;  $T_{\text{пл}}$  288-289 °C;  $^1\text{H}$  ПМР (ДМСО- $d_6$ ): 3,32 (3H, c), 2,37 (3H, c), 2,96 (6H, c), 3,12-3,22 (2H+H<sub>2</sub>O, м), 4,07 (2H, т, J=7,2), 6,74 (2H, д, J=8,7), 7,43 (2H, д, J=8,7), 7,45 (1H, c).

1-[1-(4-диметиламінофеніл)метилідене]-10-метил-5-оксо-1,2,3,5-тетрагідропіроло[2,1-b]хінолін-10-ий йодид (**Sbp**). Вихід: 83 %;  $T_{\text{пл}}$  238-240 °C;  $^1\text{H}$  ПМР (ДМСО- $d_6$ ): 3,07 (6H, c), 3,31 (2H, т, J=6,5), 4,21-4,29 (5H, м), 6,87, д, J=9,3), 7,63 (2H, д, J=8,8), 7,77 (1H, т, J=7,3), 7,98 (1H, c), 8,10 (2H, м), 8,28 (1H, д, J=8,0).

\*наведені положення (м.ч.), інтенсивність сигналу, його форма (с — синглет, д — дублет, уш д — уширений дублет, т — триплет, м — мультиплет), константа спін-спінової взаємодії (Гц).

Надійшла до редакції 07.06.2006 р.

**Synthesis and spectral studies of styrylcyanines based on 4-oxo-4,6,7,8-tetrahydropyrrolo[1,2-a]thieno[2,3-d]pyrimidinium and 5-oxo-1,2,3,5-tetrahydropyrrolo[2,1-b]quinazolinium**

A.O. Balanda, K.D. Volkova, V.B. Kovalska, V.P. Tokar<sup>1</sup>, S.M. Yarmoluk

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine  
150 Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

<sup>1</sup>Taras Shevchenko National University  
6 Acad. Glushkova Ave., Kyiv, 03147, Ukraine

**Summary.** A series of novel styrylcyanine dyes based on 4-oxo-4,6,7,8-tetrahydropyrrolo[1,2-a]thieno[2,3-d]pyrimidinium and 5-oxo-1,2,3,5-tetrahydropyrrolo[2,1-b]quinazolinium were synthesised. Spectral-luminescent properties of obtained dyes in unbound state and in presence of nucleic acids and BSA (bovine serum albumin) were evaluated. *p*-Dimethylaminostyryls based on 4-oxo-4,6,7,8-tetrahydropyrrolo[1,2-a]thieno[2,3-d]pyrimidinium appeared to selectively interact with RNA and thus could be used as RNA-specific fluorescent probes. Besides, for these dyes large values of two-photon absorption cross-sections were observed in RNA presence.

**Keywords:** styrylcyanine dyes, nucleic acids detection, two-photon excitation.

## Перелік літератури

1. *Haugland R.P.* Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 9<sup>th</sup> ed. Eugene: Molecular Probes Inc., 2002.
2. *Turro N., Gratzel M., Braun A.A.* Photophysical and photochemical processes in micellar systems // *Chem. Int. Ed. Engl.* — 1980. — Vol. 19, No 9. — P. 675-696.
3. UK Patent Application, 2074340 A, 1981.
4. *Kumar C., Turner R., Ascuncion E.* Groove binding of a styryl cyanine dye to the DNA double helix: the salt effect // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chem.* — 1993. — Vol. 74, No 1-2. — P. 231-238.
5. *Kovalska V.B., Kryvorotenko D.V., Balanda A.O., Losytskyi M.Yu., Tokar V.P., Yarmoluk S.M.* Fluorescent homodimer styryl cyanines: synthesis and spectral-luminescent studies in nucleic acids and protein complex // *Dyes and Pigments.* — 2005. — Vol. 67. — P. 47-54.
6. *Kovalska V.B., Kocheshev I.O., Kryvorotenko D.V., Balanda A.O., Yarmoluk S.M.* Studies on the spectral-luminescent properties of the novel homodimer styryl dyes in complexes with DNA // *Journal of Fluorescence.* — 2005. — Vol. 15. — P. 215-219.
7. *Баланда А.О., Волкова К.Д., Ковальська В.Б., Лосицький М.Ю., Лукашов С.С., Ярмолук С.М.* Нові стирилціаніни та їх димери як флуоресцентні барвники для детекції нуклеїнових кислот: синтез та спектрально-люмінесцентні властивості // *Ukr. Bioorgan. Acta.* — 2006. — Т. 4, № 1. — С. 17-29.
8. *Lee J.W., Jung M., Rosania G., Chang Y.T.* Development of novel cell-permeable DNA sensitive dyes using combinatorial synthesis and cell-based screening // *Chemical Communication.* — 2003. — P. 1852-1853.
9. *Wang H.Z., Lei H., Wei Z.C., Zhao F.L., Zheng X.G., Xu N.S., Wang X.M., Ren Y., Tian Y.P., Fang Q., Jiang M.H.* Spectral properties and effective upconverted lasing of new organic molecules // *Chemical Physics Letters.* — 2000. — Vol. 324. — P. 349-353.
10. *Wu L.Z., Tang X.J., Jiang M.H., Tung C.H.* Two-photon induced fluorescence of novel dyes // *Chemical Physics Letters.* — 1999. — Vol. 315. — P. 379-382.
11. *Stiel H., Teuchner K., Paul A., Fveyer W., Leupold D.* Two-photon excitation of alkyl-substituted magnesium phthalocyanine: radical formation via higher excited states // *Journal of Photochemistry and Photobiology. A: Chem.* — 1994. — Vol. 80, No 1-3. — P. 289-298.
12. *Kovalska V.B., Losytskyi M.Yu., Kryvorotenko D.V., Balanda A.O., Tokar V.P., Yarmoluk S.M.* Synthesis of novel fluorescent styryl dyes based on the imidazol[1,2-*a*]pyridinium chromophore and their spectral-fluorescent properties in the presence of nucleic acids and proteins // *Dyes and Pigments.* — 2006. — Vol. 68. — P. 39-45.
13. *Gewald K., Schinke E., Bottcher H.* 2-Amino-thiophene aus methylenaktiven. Nitrilen, Carbonylverbindungen und Schwefel // *Chemische Berichte.* — 1966. — Vol. 99. — P. 94-100.
14. *Шахидоятов Х.М., Саргазаков К.Д., Молчанов Л.В., Таишходжаев Б., Арипов Х.Н.* Хиназолон-4 и их биологическая активность // *Химия природ. соедин.* — 1991. — С. 862-864.