



УДК 535.37+57.088+612.014.46+616.155.34

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ЗОНДЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ХЛОРНОВАТИСТОЙ КИСЛОТЫ В ЖИВЫХ КЛЕТКАХ¹

© 2022 г. В. Е. Реут*, И. В. Горудко*, Д. В. Григорьева*,
А. В. Соколов**, ***, О. М. Панасенко***, #

*Белорусский государственный университет, Беларусь, 220030 Минск, просп. Независимости, 4

**ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”,
Россия, 197376 Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

***ФГБУ “Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины” ФМБА России,
Россия, 119435 Москва, ул. Малая Пироговская, 1а

Поступила в редакцию 02.08.2021 г.

После доработки 12.10.2021 г.

Принята к публикации 22.11.2021 г.

Хлорноватистая кислота (НОСІ) играет роль в иммунных (воспалительных) реакциях не только при защите организма от патогенов, но и в силу высокой реакционной способности провоцирует развитие и осложнение многих заболеваний. Актуальная задача – разработка высокочувствительных и избирательных по отношению к НОСІ биосенсоров, включая флуоресцентные зонды. Тем не менее регистрация образования НОСІ в биологических объектах сопряжена с рядом трудностей. Так, нестабильность используемых в настоящее время зондов или их цитотоксичность, а также возбуждение флуоресценции в ультрафиолетовой области спектра или в полосах поглощения основных клеточных белков делают поиск новых хемосенсоров актуальной задачей на протяжении многих лет. В данном обзоре рассмотрены вопросы классификации малых молекулярных зондов для регистрации НОСІ в биологических системах, а также обобщены результаты разработки хемосенсоров. Особое внимание уделено достижениям в этой области за 2016–2021 гг. Сформулирован ряд проблем, касающихся конструирования и применения малых молекулярных зондов. Ввиду отсутствия “золотого стандарта” среди хемосенсоров НОСІ, что связано в том числе с коммерческой недоступностью либо сложными методами синтеза новых сенсоров, даны рекомендации по области применения упомянутых хемосенсоров. Обозначены тенденции в разработке флуоресцентных хемосенсоров для визуализации продукции НОСІ в живых клетках.

Ключевые слова: флуоресценция, флуоресцентные зонды, активные формы кислорода, активные формы галогенов, хлорноватистая кислота, хемосенсоры

DOI: 10.31857/S0132342322030162

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....416

Типы молекулярных флуоресцентных зондов для регистрации НОСІ.....417

Классификация зондов по сайтам реакции.....417

Классификация зондов по типу

флуоресцентного ответа.....418

Классификация зондов по типу флуорофора.....419

Предпосылки к разработке современных флуоресцентных хемосенсоров.....420

Зонды “включения” и “выключения”.....420

¹ Дополнительные материалы для этой статьи доступны по doi 10.31857/S0132342322030162 для авторизованных пользователей. Сокращения: APF – аминофенил флуоресцеина; СВ – целестиновый синий В; DAMN – диаминоалеонитрил; ESIPТ – внутримолекулярный перенос протонов в возбужденном состоянии; FRET – ферстеровский резонансный перенос энергии; Hcy – гомоцистеин; HeLa – клетки раковой опухоли шейки матки; HL-60 – клеточная линия острого промиелоцитарного лейкоза человека; ICT – внутримолекулярный перенос заряда; IFN-γ – интерферон гамма; LPS – липополисахариды; MPO – миелопероксидаза; PET – фотоиндуцированный перенос электронов; PMA – форбол-12-миристан-13-ацетат; R19 – родамин 19; RAW264.7 – линия клеток трансформированных макрофагов мышей; RGNH – нафтоилгидразид родамина 6G; SNAPF – сульфонафтоаминофенил флуоресцеина; TVET – передача энергии через связь; АФА – активные формы азота; АФГ – активные формы галогенов; АФК – активные формы кислорода; возб – возбуждение; исп – испускание; ПО – предел обнаружения.

Автор для связи: (тел.: +7 (499) 246-44-90; эл. почта: o-panas@mail.ru).

<i>Переход к концепции зондов “переключения”</i>	424
Последние достижения в разработке малых молекулярных флуоресцентных зондов для регистрации НОСІ.....	425
<i>Зонды на основе кумарина</i>	425
<i>Зонды на основе флуоресцеина</i>	427
<i>Зонды на основе феноксазина</i>	427
<i>Зонды на основе родола</i>	430
<i>Зонды на основе 1,8-нафталимида</i>	430
<i>Иные малые молекулярные зонды</i>	433
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	436
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	438

ВВЕДЕНИЕ

Активные формы кислорода (АФК), азота (АФА) и галогенов (АФГ), вырабатываемые живыми организмами, необходимы для обеспечения различных биологических функций: межклеточного взаимодействия, внутриклеточной передачи сигналов, модуляции артериального давления, контроля иммунной системы, фагоцитоза, регуляции активности ферментов и факторов транскрипции, синтеза биологических соединений, процессов метаболизма и др. [1, 2]. Однако в силу высокой реакционной способности данные соединения, модифицируя биологически важные молекулы (нуклеиновые кислоты, белки, липиды и др.), также вовлечены в патологические процессы, такие как старение, диабет, нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания, рак, катаракта, ревматоидный артрит, воспаление, ишемические и постишемические патологии [3]. Среди АФГ хлорноватистая кислота (НОСІ), вырабатываемая миелопероксидазой (МРО, КФ 1.11.2.2) – ферментом, содержащимся в основном в азурофильных гранулах нейтрофилов, в меньшем количестве в моноцитах, – участвует в реакциях как окисления, так и хлорирования и играет особую роль в защите организма от внешних патогенов [4, 5]. Стоит отметить, что значение pK_a НОСІ составляет 7.5, т.е. при физиологическом рН практически равные концентрации НОСІ и ОСІ⁻ содержатся в водной среде, поэтому здесь и далее под НОСІ подразумевается смесь этих форм (НОСІ/ОСІ⁻) [6]. Повышение концентрации МРО в плазме крови, избыточное образование НОСІ и хлорированных продуктов приводят к повреждению собственных клеток и тканей организма. Многие воспалительные заболевания (например, сердечно-сосудистые, нейродегенеративные, атеросклероз, васкулит, фиброз, ревматоидный артрит, некоторые виды рака и др.) сопровождаются повышением количества и/или активности МРО, ростом продукции НОСІ и, как следствие, выявлением в биологических жидкостях пациентов с данными патологиями так называемых мар-

керов галогенирующего стресса (3-хлортирозина, 5-хлорурацила, α -хлоральдегидов, хлорированных белков и др.) [6, 7]. Ввиду исключительной роли НОСІ как в защите организма от патогенов, так и в развитии патологий, исследование кинетики образования НОСІ, ее локализации, механизмов регуляции активности МРО, выявление вклада МРО в развитие заболеваний – важные не только фундаментальные, но и прикладные задачи, направленные на профилактику, диагностику и контроль за лечением заболеваний, ассоциированных с воспалением.

Регистрация НОСІ сопряжена с рядом трудностей. НОСІ обладает высокой реакционной способностью и малым временем жизни в биологических средах. Так, константа скорости реакции НОСІ с аминокислотами цистеином и метионином превышает $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, а с гистидином, таурином, α -аминогруппами – более $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [8]. Также возможны реакции и с другими мишенями (NH₂-группами “полярных головок” фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина, ДНК, двойными связями в белках и липидах), однако они вряд ли будут играть решающую роль из-за более низких скоростей реакции. Более того, фагоциты генерируют также целый ряд других высокорекреационных соединений: АФК ($\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 , $^1\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$, $\text{ROO}\cdot$ и др.), АФА ($\cdot\text{NO}$, ONOO^- , NO_2^- , $\cdot\text{NO}_2$ и др.), а также АФГ (помимо НОСІ может образовываться НОВг, хлор-, бромамины и др.) [3, 9]. Учитывая все это, становится ясным, что для регистрации продукции НОСІ в биологических системах необходимы надежные, чувствительные и селективные инструменты обнаружения, имеющие высокое пространственное и временное разрешение. Таким мощным инструментом, сочетающим простоту манипуляций и доступность, выступает флуоресцентный анализ на основе синтетических зондов (хемосенсоров) [10, 11]. Несмотря на то, что в последние годы разработано множество хемосенсоров, способных регистрировать НОСІ и другие АФК, АФГ и АФА, такие недостатки, как низкая стабильность, отсутствие специфичности их реакций с окислителями или сильное влияние восстановителей, а также цитотоксичность делают поиск новых флуоресцентных зондов, способных регистрировать НОСІ в биологических системах, по-прежнему актуальным направлением.

Большинство экспериментальных исследований и аналитических обзоров, посвященных данной тематике, сфокусированы на физико-химических аспектах взаимодействия зондов с НОСІ в бесклеточной среде, а также перспективах разработки новых зондов [10–14]. Меньше внимания уделено применению этих зондов для регистрации НОСІ в клеточных средах. Ввиду того, что ко-

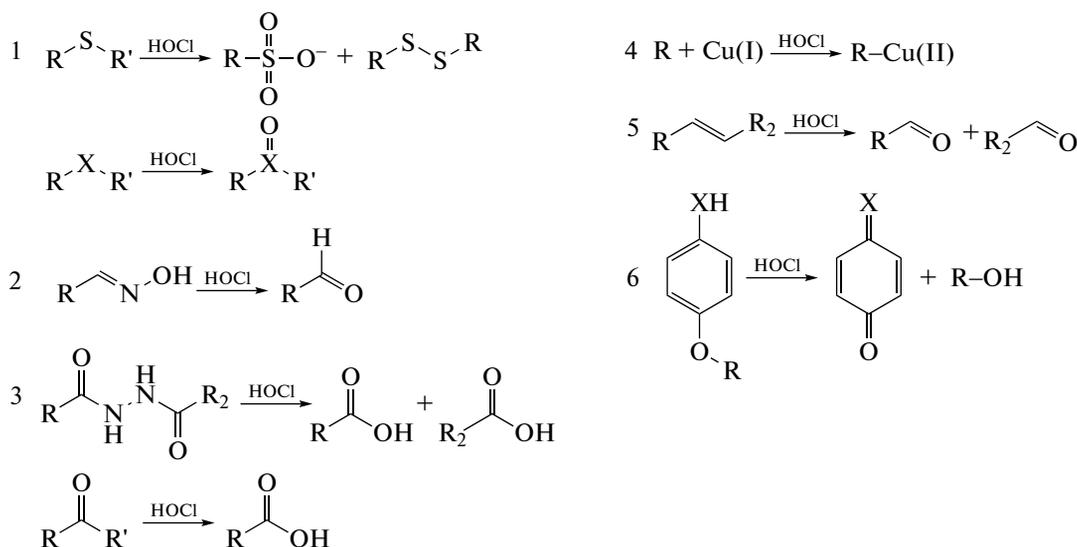


Рис. 1. Механизмы взаимодействия хемосенсоров с HOCl (R – флуорофор). Реакция HOCl: 1 – с X-содержащими соединениями (X = S, Se, Te; R' = H или алкил); 2 – с производными оксима; 3 – с гидразинами и амидами (R' = NH₂); 4 – с Cu(I)-содержащими соединениями; 5 – с ненасыщенной углерод-углеродной связью; 6 – с производными *n*-метоксифенола (X = O) и *n*-аминофенола (X = NR', R' = H или алкил). Адаптировано по данным работ [16, 22].

нежная цель разработки сенсоров – изучение вклада HOCl в физиологические и патофизиологические процессы, скрининг лекарственных препаратов, а также прогнозирование и диагностика заболеваний, крайне важны исследования возможности использования этих веществ в системах клеток/тканей/организма. В данном обзоре собрана информация о наиболее перспективных малых молекулярных флуоресцентных зондах, предназначенных для регистрации HOCl в клеточных системах. Отметим также, что некоторые вопросы применения наночастиц и квантовых точек для регистрации HOCl приведены в работах [15–17] и не будут затронуты в данном обзоре.

ТИПЫ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ HOCl

Выбор флуоресцентного зонда зависит от целей исследования, а чувствительность и избирательность зонда по отношению к аналиту (веществу, содержание которого требуется оценить, в нашем случае – HOCl) – зачастую определяющие факторы выбора сенсора. В качестве количественной меры чувствительности зонда к HOCl чаще всего используют предел обнаружения (ПО) [18]. Математическое выражение для расчета ПО выглядит так:

$$ПО = 3\sigma/k,$$

где σ – стандартное отклонение интенсивности флуоресценции раствора зонда в отсутствие HOCl, k – тангенс угла наклона калибровочной кривой зависимости интенсивности флуоресценции от

концентрации HOCl [19]. Под избирательностью понимают предпочтительное взаимодействие зонда с HOCl по сравнению с прочими соединениями. Чаще всего в экспериментальных статьях чувствительным зонд признают в случае, когда изменение интенсивности его флуоресценции при действии HOCl значительно больше, чем при действии других присутствующих высокорекреационных соединений. Чувствительность и избирательность зонда могут ограничивать как используемый химический механизм преобразования сенсора, так и тип преобразования флуоресцентного ответа или использование конкретных флуорофоров.

Классификация зондов по сайтам реакции

Разработка флуоресцентных зондов для регистрации HOCl основана на окислительно-восстановительных реакциях или реакциях замещения между HOCl и хемосенсором. Примеры некоторых основных реакций HOCl с функциональными группами флуоресцентных зондов представлены на рис. 1:

1) серосодержащие соединения окисляются под воздействием HOCl с образованием сульфатов, дисульфидов или сульфоксидов, селен- и теллур-содержащие – до селен- и теллуридов соответственно (рис. 1, 1) [20];

2) производные оксима окисляются HOCl до альдегидов (рис. 1, 2) [21, 22];

3) гидразины и амиды хлорируются под действием HOCl с последующим гидролизом в вод-

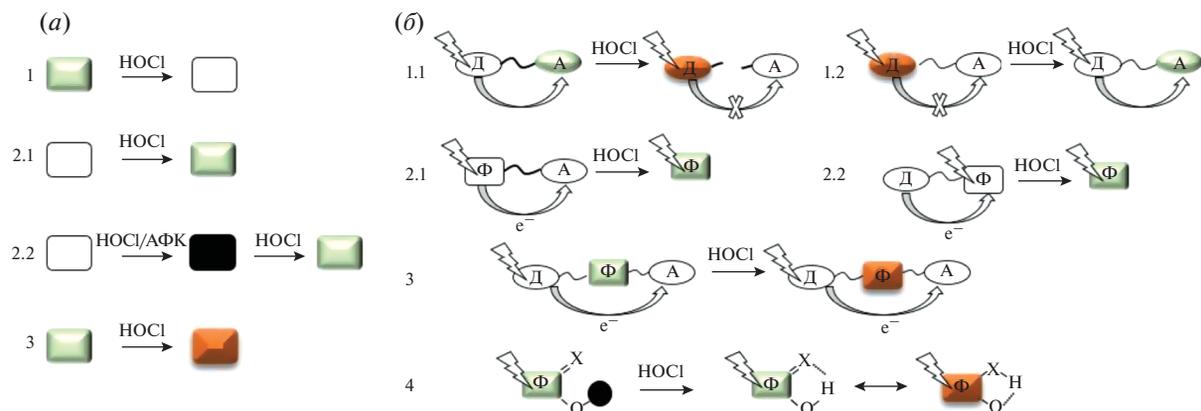


Рис. 2. Типы и механизмы флуоресцентного ответа датчиков. (а) – Общий вид типов флуоресцентного ответа: 1 – “выключения”, 2.1 – “включения”, 2.2 – “двойного замка”, 3 – “переключения”; (б) – механизмы изменения флуоресцентного ответа: 1.1 – FRET выкл, 1.2 – FRET вкл, 2.1 – а-PET, 2.2 – д-PET, 3 – ICT, 4 – ESIPT. “Ф” – флуорофор, “Д” – донор, “А” – акцептор. С изменениями и дополнениями из работы P. Gao et al. [27]. Пояснения см. в тексте.

ной среде и образованием карбонильных соединений (рис. 1, 3) [16, 22];

4) Cu(I) и другие металл-содержащие соединения окисляются под действием HOCl (рис. 1, 4), на основе реакций такого типа для косвенного обнаружения HOCl разработаны хемосенсоры, чувствительные, например, к Cu(II) [22];

5) ненасыщенные углерод-углеродные связи (–HC=CH–) подвергаются реакции электрофильного присоединения HOCl с образованием изомеров хлоргидринов [6] и дальнейшему окислению до более стабильных нехлорированных карбонильных соединений (рис. 1, 5) [22];

6) производные *n*-метоксифенола и *n*-аминофенола окисляются HOCl с высвобождением бензохинона и бензохинонимина соответственно (рис. 1, 6) [16, 22, 23].

Классификация зондов по типу флуоресцентного ответа

Для регистрации HOCl важны флуоресцентные свойства используемых зондов. Так, в результате взаимодействия сенсора с аналитом интенсивность его флуоресценции может изменяться следующим образом:

1) уменьшаться, такой тип зондов упоминается в литературе под названиями “turn-off” [10], “on-off” [16], “negative” [24] (т.е. “выключения”, “отрицательные”);

2) увеличиваться, такой тип зондов именуется “turn-on” [13], “off-on” [16, 25], “positive” [24] (т.е. “включения”, “положительные”);

3) убывать на одной и возрастать на другой длине волны испускания или возбуждения флуоресценции, наиболее часто встречаемое наименование таких зондов – “ratiometric” [16], реже

“switch” (т.е. “рatiометрические” или “переключения”).

Исторически первым появившимся типом хемосенсоров были зонды “выключения”. Такие молекулярные зонды обладают собственной флуоресценцией и теряют свои флуоресцентные свойства при взаимодействии с HOCl (рис. 2а, 1). Если хемосенсор не флуоресцирует или интенсивность флуоресценции крайне мала, а образующийся в результате реакции с HOCl продукт обладает флуоресценцией, интенсивность которой в разы превышает фоновый уровень, то его относят к типу “включения” (рис. 2а, 2.1). “Включение” зонда может происходить при непосредственном окислении до флуоресцирующего продукта либо за счет высвобождения заблокированного флуорофора. Возможна ситуация, когда зонд первоначально нужно “активировать”, а уже затем при реакции с аналитом он переходит во флуоресцирующую форму – такая система получила название “двойного замка” (рис. 2а, 2.2) [26]. Если при взаимодействии с HOCl происходит сдвиг спектрального диапазона в спектрах возбуждения или испускания, то такие зонды относятся к типу “переключения” (рис. 2а, 3). Наиболее часто зонды “переключения” характеризуются изменениями в спектрах испускания.

Вместе с указанием типа датчика говорят и о механизме (если он установлен) изменения его флуоресцентных свойств: флуоресцентный резонансный перенос энергии (FRET), фотоиндуцированный перенос электронов (PET), внутримолекулярный перенос заряда (ICT) или внутримолекулярный перенос протонов в возбужденном состоянии (ESIPT, рис. 2б) [27].

FRET – явление безлучательной передачи энергии от донора “Д” к акцептору “А” (рис. 2б) за счет дальнедействующих диполь-дипольных

взаимодействий. Эффективность FRET сильно зависит от степени перекрытия спектров поглощения (возбуждения) “А” и испускания “Д”. Процесс FRET до взаимодействия хемосенсора с НОСІ может быть как активным с последующей инактивацией (FRET выкл – рис. 2б, 1.1), так и заблокированным с последующей активацией (FRET вкл – рис. 2б, 1.2). Зонды, сконструированные по принципу FRET, могут относиться ко всем трем типам (“включения”, “выключения” и “переключения”), однако чаще всего используются в качестве зондов “переключения”, где и “Д”, и “А” выступают флуорофорами [27, 28]. В последние годы чаще стали появляться сведения о новом механизме передачи энергии между “Д” и “А”, аналогичном FRET, но лишенном некоторых его недостатков: не требуется эффективное перекрытие спектров испускания “Д” и поглощения “А”, эффективность переноса не зависит значительно от расстояния между “Д” и “А”, за счет чего возрастает скорость безызлучательной передачи энергии, и наблюдается большой псевдостоксов сдвиг. Предполагается, что процесс передачи энергии идет через электронно-сопряженный жесткий линкер π -системы (фенильные остатки, ацетилен, оксидазольный компонент) и называется передачей энергии через связь (through bond energy transfer, ТВЕТ), хотя сам механизм еще не вполне изучен. Подробнее с этим механизмом и зондами на его основе можно ознакомиться, например, в обзоре Cao et al. [29].

РЕТ – явление фотоиндуцированного переноса электронов, часто используемое при проектировании зондов типа “включения”. Зонды, в основе которых используется механизм РЕТ, можно разделить на а-РЕТ и д-РЕТ. а-РЕТ представляет собой процесс переноса электронов от возбужденного флуорофора “Ф” к электронно-дефицитному “А” (рис. 2б, 2.1), что вызывает тушение флуоресценции “Ф” и называется окислительным РЕТ. д-РЕТ представляет собой перенос электронов от “Д” к возбужденному “Ф” (рис. 2б, 2.2) и вызывает восстановление “Ф”, а также тушение флуоресценции и называется восстановительным РЕТ. При реакции зонда с НОСІ происходит смещение энергетических уровней “Д” и “А” относительно друг друга (для д-РЕТ – “Д” и “Ф”, для а-РЕТ – “А” и “Ф”), что приводит к блокировке процесса РЕТ и увеличению интенсивности флуоресценции [27, 28].

Зонды, работающие по принципу ІСТ, в составе одной молекулы содержат “Д” и “А” электронов на разных концах от “Ф” (рис. 2б, 3). Сам флуорофор также может быть использован в качестве “Д” или “А”. Возбужденное состояние зонда обладает большим дипольным моментом по сравнению с основным состоянием. Перестройка сольватной оболочки приводит к сближению уровней энергии основного и возбужден-

ного состояний и флуоресценции с длиной волны значительно большей, чем у возбуждающего излучения. При реакции зонда с НОСІ нарушается первоначальное распределение электронной плотности сенсора, что служит причиной изменения эффективности процесса ІСТ. Уменьшение эффективности ІСТ приводит к сдвигу в синюю область спектра испускания флуоресценции, и наоборот, возрастание эффективности ІСТ способствует сдвигу в красную область спектра флуоресценции. На основе ІСТ чаще всего проектируют зонды типа “включения” и “переключения” [27, 28].

ESIPT относится к явлению переноса атомов водорода (в основном от гидроксильных или аминогрупп) от “Ф” к соседним гетероатомам (в основном к N, O или S) при лазерном возбуждении (рис. 2б, 4). ESIPT обычно происходит в молекулах с пяти- или шестичленным кольцом, которые подвергаются процессу таутомеризации, сопровождающемуся эмиссионными изменениями из-за различий в структуре энергетических уровней таутомеров. Стратегия ESIPT может эффективно применяться для конструирования зондов типа “переключения” [27, 30].

Стоит отметить, что использование зондов типа “выключения” зачастую затрудняет регистрацию НОСІ ввиду остаточного флуоресцентного сигнала. Зонды типа “включения” и “переключения” обеспечивают лучшее пространственное разрешение, и их применение более предпочтительно. Сенсоры типа “переключения” удобны для визуализации прореагировавшего и непрореагировавшего зонда, что помогает минимизировать ошибки, которые могут возникнуть из-за неоднородности образца или неоднородности распределения зонда [31]. Однако часто наблюдается малый сдвиг длин волн в спектрах испускания или образование двух продуктов реакции с двумя разными длинами волн возбуждения, что затрудняет применение зондов типа “переключения” на практике. Кроме того, они, как правило, имеют громоздкую структуру за счет использования нескольких флуорофоров, что ограничивает их применение [32, 33].

Классификация зондов по типу флуорофора

Выбор подходящих низкомолекулярных флуоресцентных зондов для обнаружения НОСІ в биологических исследованиях может основываться на разновидности их “ядра”, т.е. флуорофора. Существует несколько основных типов “ядер”: кумарин, флуоресцеин, родамин, 4,4-дифтор-4-бор-3а,4а-диаза-5-индацен (бор-дипиррометен, BODIPY), 1,8-нафталимид, цианин, триазолин и др. [12, 13, 34]. Таким образом, выбор зонда может быть сделан исходя из хорошо изученных химических и фотофизических свойств флуорофора.

ПРЕДПОСЫЛКИ К РАЗРАБОТКЕ СОВРЕМЕННЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ХЕМОСЕНСОРОВ

Первые флуоресцентные зонды для регистрации продукции АФК в клетках, сконструированные по типу “выключения”, были крайне неспецифичными. В дальнейшем целесообразным представлялось конструирование более специфичных хемосенсоров для регистрации НОСІ. Параллельно этот процесс сопровождался переходом к синтезу сенсоров типа “включения” и “переключения”. В данном разделе представлен ряд разработок в этой области.

Зонды “включения” и “выключения”

Хемосенсоры на основе родамина. В 2007 г. группа ученых во главе с S. Kenmoku представила HySOx – хемосенсор типа “включения” ($\lambda_{\text{возб}} = 552 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 575 \text{ нм}$), реализованный на основе концепции “S-замка” (рис. 3) [35]. “Включение” флуоресценции наблюдается после окисления сенсора под действием НОСІ с разрывом S-содержащего кольца и переходом зонда во флуоресцирующую форму. HySOx – чувствительный и избирательный флуоресцентный зонд для НОСІ, кроме того, интенсивность флуоресценции его продукта практически не зависит от рН в диапазоне 6.5–9.0. К недостаткам стоит отнести малый квантовый выход и сильное перекрытие спектров поглощения и испускания [35]. В 2011 г. на основе HySOx синтезированы ряд Si-содержащих аналогов (MMSiR и его более гидрофобное производное wsMMSiR, рис. 3), интенсивность флуоресценции которых возрастает при реакции с НОСІ в ближней инфракрасной области спектра ($\lambda_{\text{возб}} = 652 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 770 \text{ нм}$) [36]. HySOx и его модификации были успешно апробированы при визуализации продукции НОСІ в фагосомах нейтрофилов, активированных опсонизированным зимозаном [35, 36]. Также с их помощью была выявлена продукция НОСІ *in vivo* в модели перитонита у мышей, который был вызван внутрибрюшинной инъекцией зимозана и форбол-12-миристан-13-ацетата (РМА) [36].

В 2011 г. группой X. Chen et al. был предложен еще один структурный аналог HySOx – R-19S ($\lambda_{\text{возб}} = 510 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 545 \text{ нм}$) (рис. 3) [37]. Этот зонд типа “включения” показал хорошую чувствительность и селективность обнаружения НОСІ с оптимумом рН ~ 6.0. С помощью данного хемосенсора была выявлена продукция НОСІ нейтрофилами человека и мышей методами конфокальной микроскопии и проточной цитометрии, а также продукция НОСІ в кишечном эпителии *Drosophila melanogaster*, индуцируемая при пероральном введении насекомым микробного экстракта [37]. В 2015 г. был представлен зонд

RSTPP – еще один структурный аналог HySOx типа “включения” ($\lambda_{\text{возб}} = 553 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 580 \text{ нм}$) (рис. 3) [38]. Главная особенность этого зонда – наличие катиона трифенилфосфония, который обеспечивает проникновение RSTPP в митохондрии клеток. Зонд показал высокую чувствительность и селективность, однако интенсивность флуоресценции продукта стабильна в узком диапазоне рН 6–7. Для апробации сенсора были использованы макрофаги линии RAW264.7 (макрофаги мышей, зараженных вирусом лейкемии Абельсона), в норме экспрессирующие МРО на низком уровне [39], однако способные увеличивать экспрессию фермента при действии ряда стимулов, например, интерферона гамма (IFN- γ) [40]. При помощи хемосенсора методом конфокальной микроскопии была показана продукция эндогенной НОСІ в митохондриях макрофагов RAW264.7, индуцируемая последовательной инкубацией клеток с липополисахаридами (LPS) и РМА. Также показана продукция НОСІ клетками RAW264.7 при их инкубации с *Escherichia coli* [38].

В 2009 г. группа ученых во главе с Y.K. Yang предложила зонд типа “включения” на основе родамина 6G – соединение (I) (рис. 3) [41]. В исходном состоянии соединение (I) находится в нефлуоресцирующей спироциклической форме. Остаток гидроксамовой кислоты – сайт для НОСІ, после реакции с которым происходит хлорирование и элиминирование НСІ с образованием открытой формы родамина 19 (R19). Для данного хемосенсора характерно малое время реакции (достижение плато интенсивности флуоресценции происходит за 20 с), большая чувствительность (увеличение интенсивности флуоресценции наблюдалось уже при внесении 25 нМ НОСІ) и высокая селективность по отношению к НОСІ в сравнении с другими основными АФК и АФА. Однако рабочий диапазон рН оказался несколько сдвинут в щелочную область (рН 7.5–10.0, максимум при рН 9.0). Зонд был использован для визуализации экзогенной НОСІ при ее инкубации с клетками рака легкого линии A549 и с эмбрионами аквариумных рыб *Danio rerio* (семейство карповых) [41].

В 2011 г. Z. Zhang et al. синтезировали гидразид родамина 6G – хемосенсор типа “включения” (рис. 3) [42]. В отличие от соединения (I), в данном хемосенсоре в качестве специфического сайта реакции выступает гидразидный фрагмент, N-хлорирование которого при действии НОСІ с последующей элиминацией НСІ приводит к высвобождению R19 ($\lambda_{\text{возб}} = 500 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 550 \text{ нм}$). К достоинствам этого зонда можно отнести высокую чувствительность (ПО = 60 нМ), а также широкий диапазон линейного отклика (2–400 мкМ НОСІ при рН 7.4). Главные недостатки сенсора – значительное увеличение интенсивности флуо-

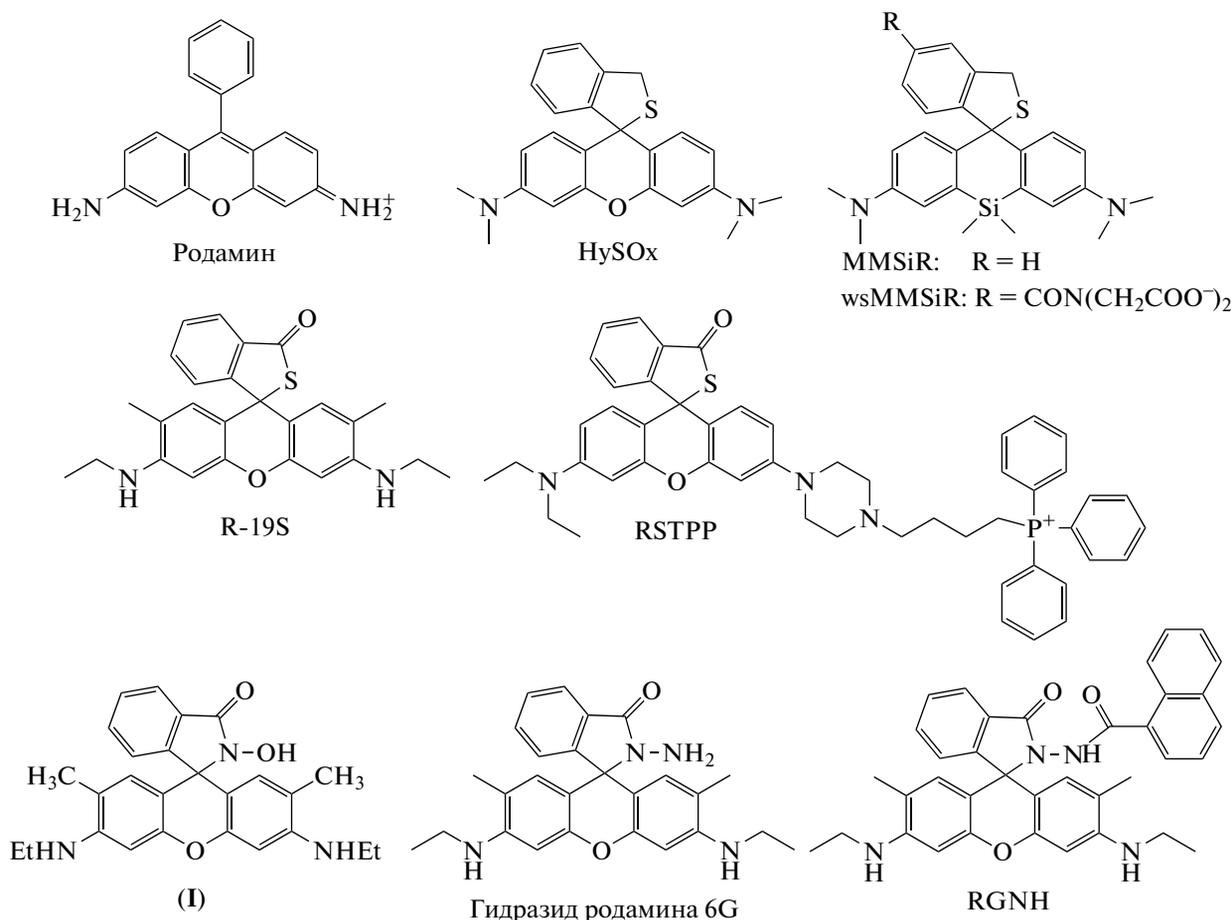


Рис. 3. Структурные формулы родамина и флуоресцентных зондов на его основе.

ресценции в присутствии ионов меди (Cu²⁺) и сильный сдвиг оптимума pH работы зонда в сторону низких значений pH 2–5, при которых значительно возрастает автофлуоресценция хемосенсора. Гидразид родамина 6G был использован для регистрации образования HOCl методом конфокальной микроскопии в макрофагах линии RAW264.7 при их инкубации с LPS и IFN-γ и последующей активации PMA (система LPS/IFN-γ/PMA) [42].

В 2015 г. эта же группа ученых предложила нафтоилгидразид родамина 6G (RGNH), сконструированный на основе гидразида родамина 6G с нафтоильным фрагментом в аминоположении последнего (рис. 3) [43]. RGNH также относится к зондам типа “включения”. Взаимодействие RGNH с HOCl приводит к образованию флуоресцентного R19 по механизму, аналогичному для гидразида родамина 6G ($\lambda_{\text{возб}} = 500 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 550 \text{ нм}$). Введение нафтоильного фрагмента позволило повысить избирательность и добиться более высокой чувствительности (ПО = 9 нМ) по сравнению с гидразидом родамина 6G, однако рабочий диапазон pH зонда оказался сильно сдвинут в щелочную область (pH 9–12). RGNH был успешно применен для регистрации методами конфокальной микроскопии и проточной цитометрии продукции HOCl клетками линии RAW264.7 при их стимуляции LPS/IFN-γ/PMA [43].

Из упомянутых выше зондов коммерчески доступен только зонд HySOx, известный также как BioTracker 574 Red HOCl Dye (Sigma-Aldrich, США).

Хемосенсоры на основе флуоресцеина. Аминофенил флуоресцеина (APF) был разработан группой К. Setsukinai в 2003 г. [44]. Присоединение обогащенного электронами фрагмента 4-аминофениларилэфира к молекуле флуоресцеина (рис. 4) приводит к тушению его флуоресценции за счет процесса PET. Показано, что APF при действии [•]OH, HOCl/HOBr и ONOO⁻, а также в присутствии систем пероксидаза хрена/H₂O₂ и MPO/H₂O₂/Cl⁻ путем O-деарилирования превращается в флуоресцеин, что сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 490 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 515 \text{ нм}$), т.е. выступает зондом типа “включения”. ПО для [•]OH, ONOO⁻ и HOCl

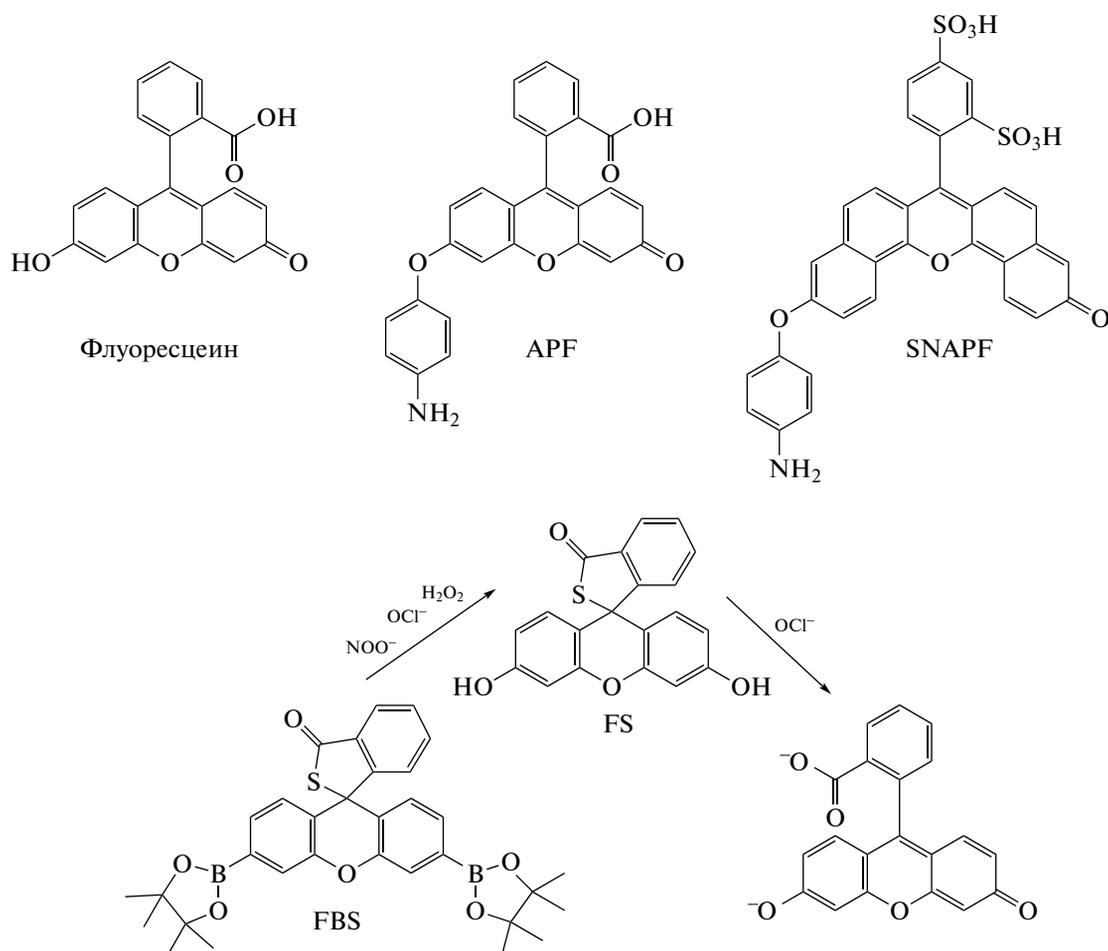


Рис. 4. Структурные формулы флуоресцеина и флуоресцентных зондов на его основе.

составил 50 нМ [45]. APF используют для регистрации продукции HOCl и HOBr нейтрофилами и эозинофилами методами конфокальной микроскопии [44] и проточной цитометрии [46], а большой квантовый выход и высокая чувствительность позволяют регистрировать продукцию HOCl/HOBr в суспензии лейкоцитов, полученной сразу же после гемолиза эритроцитов цельной крови [46, 47]. Однако для оценки избирательной роли HOCl относительно других АФК, АФГ и АФА в превращение APF в флуоресцеин необходимо использовать разностный подход с применением структурного аналога APF – гидроксифенилфлуоресцеина (HPF), который реагирует с теми же высокореакционными соединениями, что и APF, за исключением HOCl [44].

В 2007 г. J. Shepherd et al. предложили модификацию APF до сульфонафтоаминофенил флуоресцеина (SNAPF), который также представляет собой датчик типа “включения”. Отличительная особенность SNAPF – сдвиг спектров возбуждения и регистрации флуоресценции в ближнюю инфракрасную область ($\lambda_{\text{возб}} = 614 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 676 \text{ нм}$) [48].

Данный зонд показал высокую селективность и был использован для регистрации методом флуоресцентной микроскопии продукции HOCl нейтрофилами человека и макрофагами мышей, трансгенных по гену, кодирующему MPO человека, при стимуляции клеток PMA. Кроме того, с применением SNAPF было выявлено присутствие HOCl в образцах артерий человека с атеросклеротическими бляшками, а также *in vivo* у мышей с перитонитом, индуцированным тиогликолятом [48].

Концепция “двойного замка” была реализована группой Q. Xu в 2013 г. при конструировании зонда типа “включения” FBS [49]. При реакции FBS с H_2O_2 , ONOO^- или HOCl образуется слабо флуоресцирующий продукт – FS, который, в свою очередь, избирательно реагирует с HOCl с высвобождением флуоресцеина ($\lambda_{\text{возб}} = 498 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 523 \text{ нм}$) (рис. 4). Зонд чувствителен и селективен по отношению к HOCl в диапазоне pH 7–9. FBS не окисляется до флуорофора под действием $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{NO}$, $\cdot\text{OH}$, гидропероксидов и пероксильных

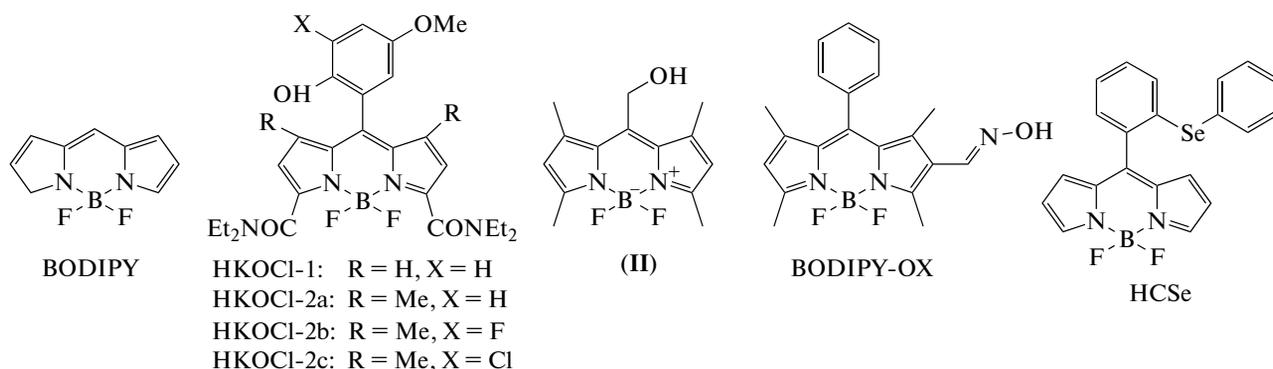


Рис. 5. Структурные формулы BODIPY и флуоресцентных зондов на его основе.

радикалов. FBS был применен для визуализации продукции HOCl в кишечнике дрозофилы при оральном введении насекомым бактериального экстракта [49].

Из упомянутых зондов на основе флуоресцеина коммерчески доступны только APF и его структурный аналог HPF (Sigma-Aldrich, США).

Хемосенсоры на основе BODIPY. В 2008 г. Z.N. Sun et al. сконструировали зонд типа “включения” HKOCl-1 (рис. 5) [50]. Увеличение интенсивности флуоресценции сенсора происходит вследствие окисления 4-метоксифенола до бензохинона в присутствии HOCl, что приводит к потере способности остатка 4-метоксифенола тушить флуоресценцию “ядра” BODIPY по механизму PET ($\lambda_{\text{возб}} = 520 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 541 \text{ нм}$). Зонд обладает высокой чувствительностью и избирательностью, широким рабочим диапазоном pH 5–8. HKOCl-1 использовали для регистрации образования HOCl в системе MPO/H₂O₂/Cl⁻, а также в макрофагах линии RAW264.7 при их стимуляции LPS/IFN- γ /PMA [50, 51]. Однако в дальнейшем зонд не получил практического применения ввиду повторного окисления флуоресцирующего продукта с образованием нефлуоресцирующего соединения [52].

В 2014 г. J.J. Nu et al. разработали ряд аналогов HKOCl-1 (HKOCl-2a–c) с дополнительной защитой 4-метоксифенола двумя метильными группами (рис. 5) [52]. Среди них HKOCl-2b ($\lambda_{\text{возб}} = 523 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 545 \text{ нм}$) показал наиболее высокую селективность и чувствительность (ПО = 18 нМ) в отношении HOCl. Для зондов HKOCl-2a и HKOCl-2b характерно длительное время выхода на плато интенсивности флуоресценции при их реакции с HOCl (до 15 мин), в то время как для HKOCl-2c этот показатель значительно ниже (3 мин). Тем не менее величина флуоресцентного отклика для HKOCl-2c в 3 раза меньше таковой по сравнению с HKOCl-2a и HKOCl-2b. По совокупности параметров HKOCl-2b был выбран как самый перспективный и применен для регистрации мето-

дом конфокальной микроскопии продукции HOCl в клетках линии RAW264.7 при их стимуляции PMA или зимозаном. Также с использованием данного зонда впервые была показана продукция HOCl в дифференцированных клетках линии THP-1 (моноциты человека с острым моноцитарным лейкозом, экспрессирующие MPO на низком уровне [53]) при их стимуляции PMA или зимозаном [52].

Зонд типа “выключения” на основе BODIPY с гидроксиметильной группой в мезо-позиции был представлен группой L. Gaï в 2013 г. (соединение (II), рис. 5) [54]. “Выключение” флуоресценции зонда ($\lambda_{\text{возб}} = 480 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 525 \text{ нм}$) происходит за счет превращения гидроксиметильной группы в формильную в результате реакции окисления в присутствии HOCl. Сенсор продемонстрировал хорошую избирательность в отношении HOCl по сравнению с $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$, H₂O₂, $\cdot\text{NO}$. Данный зонд был протестирован на клеточной линии аденокарциномы протоков молочной железы человека MCF-7 при экзогенном введении HOCl в культуральную среду [54].

В 2013 г. M. Emrullahoglu et al. предложили зонд типа “включения” на основе “ядра” BODIPY с внедренной группой альдоксима (BODIPY-OX) (рис. 5) [55]. При действии HOCl образуется флуоресцирующий нитрилоксид BODIPY-CNO ($\lambda_{\text{возб}} = 470 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 529 \text{ нм}$). Зонд показал высокую чувствительность (ПО = 500 нМ) и селективность, но интенсивность флуоресценции BODIPY-CNO сильно зависит от pH (оптимум при pH 8.0). В дальнейшем было показано, что BODIPY-CNO нестабилен и разлагается на компоненты, которые не удалось идентифицировать, что сделало невозможным применение зонда для регистрации образования HOCl в клеточной среде [55].

В этом же году S. Liu совместно с S. Wu представили селен-содержащий зонд типа “включения” HCSe (рис. 5). Изначально флуоресценция HCSe блокируется за счет процесса PET. После

окисления HCSe при действии HOCl образуется оксид селена (HCSeO), в котором РЕТ заблокирован, что приводит к увеличению интенсивности флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 510$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 526$ нм). Зонд характеризуется высокой чувствительностью и селективностью, быстрым ответом, оптимальной работой сенсора лежит в диапазоне pH 6–8. HCSe был использован для регистрации образования HOCl в клетках линии RAW264.7, стимулированных PMA [56].

Из вышеперечисленных зондов в настоящий момент производится и доступен к приобретению только HKOCl-1 (Molbase (Shanghai) Biotechnology Co. Ltd, Китай).

Переход к концепции зондов “переключения”

В 2009 г. группой W. Lin впервые для регистрации HOCl был предложен зонд типа “переключения”. В основе функционирования данного сенсора лежит превращение оксима в альдегид под действием HOCl. Однако оптимальная работа зонда находится в щелочной области (pH > 9), из-за чего зонд непригоден для регистрации продукции HOCl в клеточных системах [21]. В 2012 г. эта же группа ученых в качестве основы для зондов “переключения” предложила стратегию циклизации родамин-тиосемикарбазидов до родамин-оксадиазолов при действии HOCl [31]. Так был создан родамин-кумариновый сенсор (соединение (III), рис. 6), в котором “переключение” интенсивности флуоресценции с кумаринового ($\lambda_{\text{возб}} = 414$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 473$ нм) на родаминовый ($\lambda_{\text{возб}} = 414$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 594$ нм) каналы осуществляется за счет FRET ($\lambda_{\text{возб}} = 414$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 594/473$ нм). Зонд показал высокую избирательность и чувствительность к HOCl (ПО = 52 нМ), быстрый выход интенсивности флуоресценции на плато (в течение 3 мин). При этом изменение флуоресценции зонда сильно зависит от pH (оптимальная работа при pH 6.0). Этот родамин-кумариновый сенсор был успешно применен для регистрации продукции HOCl клетками линии RAW264.7 при их стимуляции LPS/PMA [31].

В 2013 г. группой L. Long был предложен зонд HRS1 [57]. Он содержит флуорофоры на основе кумарина и родамина, связанные между собой диацетилгидразином, выступающим сайтом реакции с HOCl. HRS1 характеризуется флуоресценцией в области спектра, характерной для кумарина ($\lambda_{\text{возб}} = 410$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 501$ нм). После реакции HRS1 с HOCl происходит высвобождение как кумаринового, так и родаминового фрагментов. Таким образом, сенсор можно рассматривать как зонд типа “переключения” по кумарину ($\lambda_{\text{возб}} = 410$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 464/501$ нм), так и “включения” по родамину ($\lambda_{\text{возб}} = 554$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 578$ нм). Зонд показал высокую селективность и чувствитель-

ность к HOCl (ПО = 24 нМ) в бесклеточной среде, быстрый выход на плато интенсивности флуоресценции (в течение 1 мин). Тем не менее HRS1 не получил дальнейшего применения из-за необходимости учитывать присутствие обоих флуорофоров с разными каналами возбуждения флуоресценции [57].

Y. Zhang et al. в 2014 г. предложили еще один родамин-кумариновый зонд типа “переключения” (соединение (IV), рис. 6). Как и у HRS1, диацетилгидразин выступает в качестве сайта реакции с HOCl. Процесс “переключения” происходит по механизму FRET ($\lambda_{\text{возб}} = 410$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 580/470$ нм). Сенсор характеризуется избирательностью в отношении HOCl, а также быстрым ответом, однако в качестве недостатков необходимо отметить высокий ПО HOCl (170 мкМ) и сильную зависимость интенсивности флуоресценции от pH (оптимальная при pH 9.3). Помимо этого, продукт реакции зонда с HOCl (кумарин-родаминовая кислота) подвергается хлорированию с последующей циклизацией при действии HOCl, что приводит к блокировке FRET и увеличению флуоресценции в канале регистрации кумарина. Хемосенсор был применен для регистрации продукции HOCl клетками линии RAW264.7 при их стимуляции LPS [58].

Группа во главе с L. Wang в 2014 г. синтезировала зонд “переключения” на основе кумарина (соединение (V), рис. 6) [59]. В качестве сайта распознавания в этом сенсоре впервые был использован *N*-алкилпиридиний, который окисляется под действием HOCl до *N*-алкилпиридона. При этом происходит блокировка процесса ICT, что сопровождается сдвигом длин волн в спектре испускания ($\lambda_{\text{возб}} = 420$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 488/631$ нм) в синюю область. Зонд характеризуется высокой селективностью, сравнительно высокой чувствительностью к HOCl (ПО = 93 нМ) и малым временем реакции, однако интенсивность флуоресценции сильно зависит от pH (оптимальная при pH 7.5–11.0). Зонд был использован для определения концентрации HOCl в образцах воды рек, а также для регистрации продукции HOCl в клетках линии RAW264.7 при их активации PMA.

В 2015 г. S. Goswami et al. предложили зонд TAM на основе трифениламина в качестве сенсора типа “переключения” для обнаружения HOCl (рис. 6) [60]. Диаминималеонитрил (DAMN, рис. 6) связан с основой зонда через иминогруппу, которая служит сайтом реакции с HOCl. После окисления TAM под действием HOCl происходит отщепление фрагмента DAMN, что сопровождается сдвигом в спектре испускания флуоресценции зонда ($\lambda_{\text{возб}} = 430$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 485/630$ нм) в синюю область. Для зонда характерна высокая чувствительность (ПО = 70 нМ), селективность и малое время реакции с HOCl (выход на плато за 100 с),

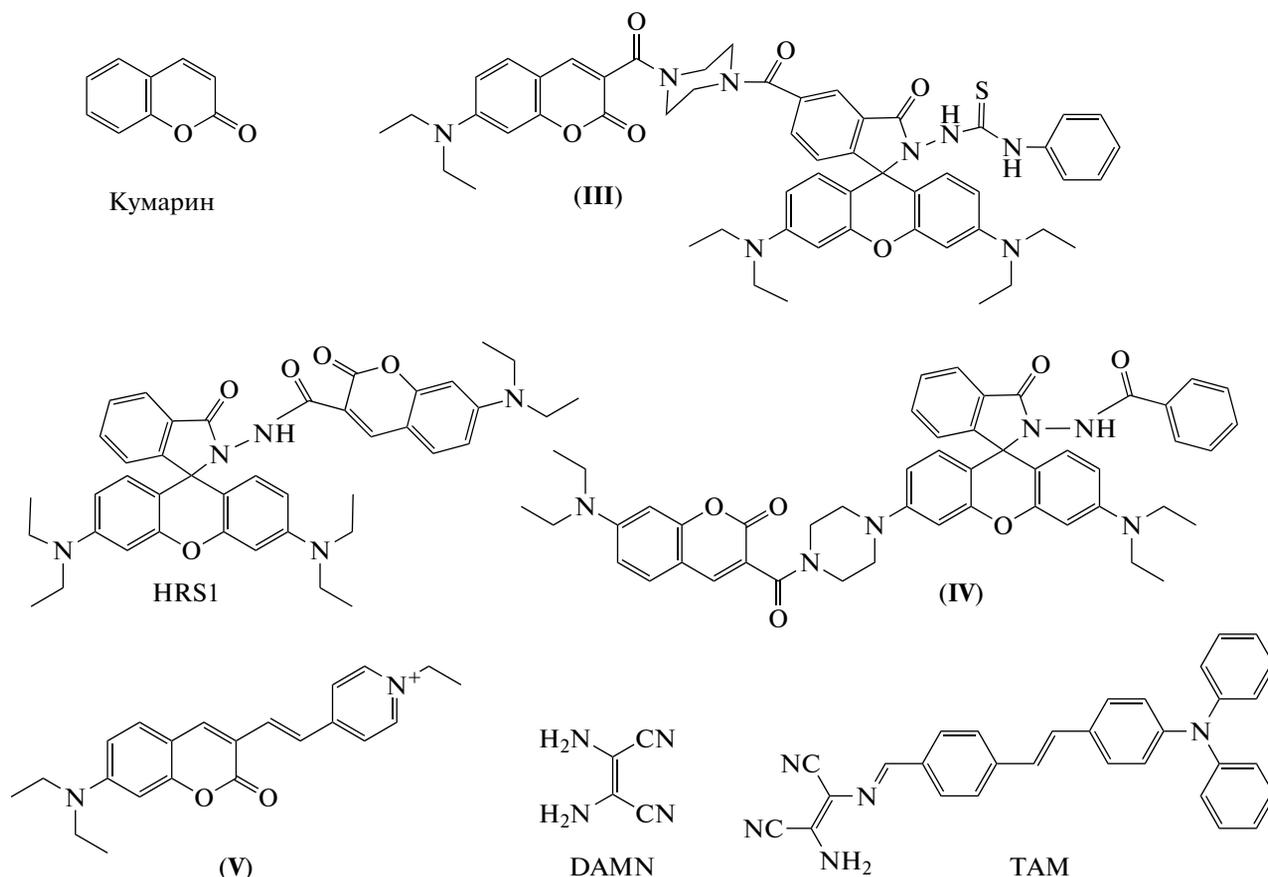


Рис. 6. Структурные формулы ратиометрических флуоресцентных зондов.

большой квантовый выход (0.86) и широкий рабочий диапазон pH (2.0–10.5). Однако данный сенсор характеризуется сильным сольватохромизмом (сдвигом спектров испускания флуоресценции в зависимости от полярности растворителя). TAM был использован для регистрации методом конфокальной микроскопии экзогенной HOCl в мононуклеарных клетках периферической крови человека [60].

Ни один из упомянутых зондов типа “переключения” не доступен для приобретения.

ПОСЛЕДНИЕ ДОСТИЖЕНИЯ В РАЗРАБОТКЕ МАЛЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ HOCl

В последние годы идет активная работа по конструированию малых молекулярных зондов для регистрации HOCl на основе известных флуорофоров с различными модификациями для достижения заданных свойств. Так, особый интерес представляют зонды не только с высокой селективностью и чувствительностью, но и с быстрым ответом для возможности исследования образования HOCl кинетически. Также усилия ученых

сосредоточены на возможности двухфотонного возбуждения зондов и/или регистрации их флуоресценции в ближнем инфракрасном диапазоне. Большой толчок в развитии получили сенсоры типа “переключения”.

Зонды на основе кумарина

В начале 2018 г. группа ученых во главе с Z. Liu предложила зонд типа “выключения” CMOS на основе кумарина (рис. 7) [61]. 1,3-Оксотиолан служит в качестве сайта реакции с HOCl. “Выключение” интенсивности флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 405 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 480 \text{ нм}$) происходит вследствие образования нефлуоресцирующего продукта окисления CMOS под действием HOCl – CMCHO. Также показано, что в присутствии цистеина или гомоцистеина (Cys/Hcy) CMCHO подвергается тиацеталированию с образованием CMCSys или CMHcy (рис. 7), что сопровождается медленным увеличением интенсивности флуоресценции на длине волны, характерной для CMOS. Таким образом, данный зонд – пример перехода типа “включение”–“выключение”–“включение”. CMOS характеризуется быстрым откликом (5 с), высо-

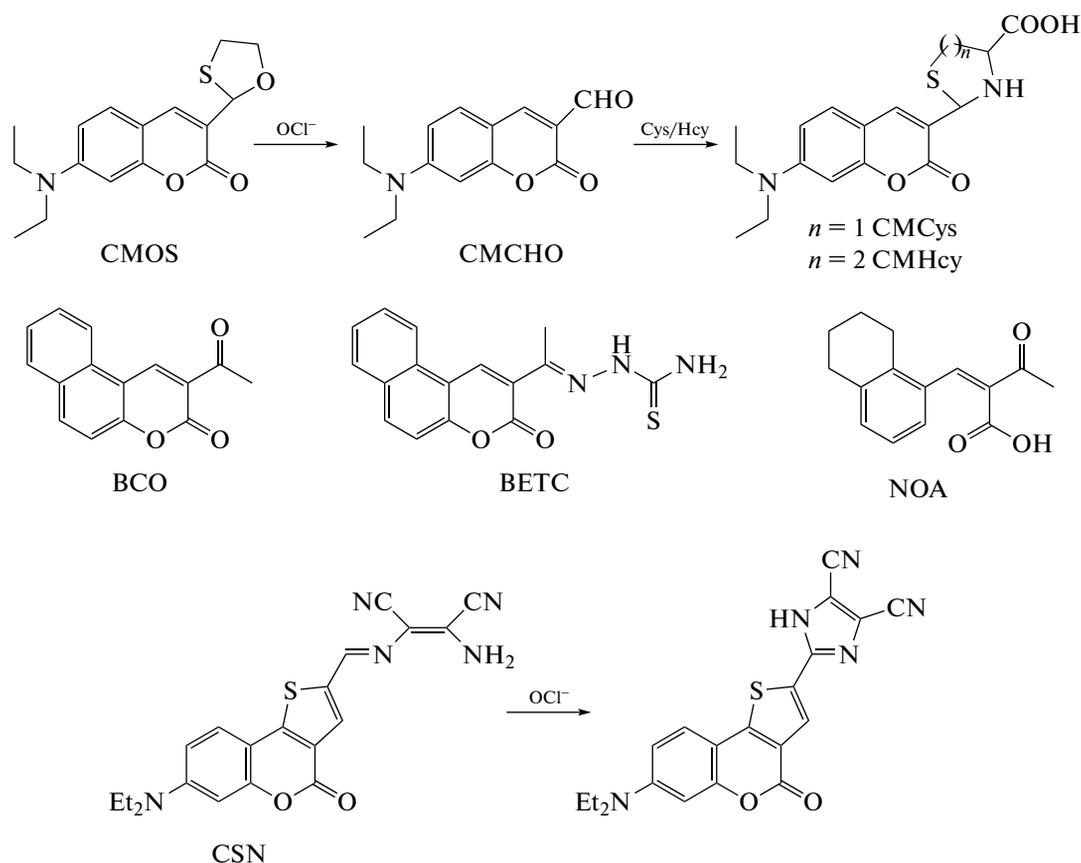


Рис. 7. Структурные формулы новых флуоресцентных зондов на основе кумарина.

кой чувствительностью (ПО = 21 нМ) и селективностью, оптимум работы зонда наблюдается в диапазоне pH 4.0–6.5. Зонд был использован для визуализации экзогенной HOCl в клетках рака яичников (SKVO-3). Методом конфокальной микроскопии было показано уменьшение интенсивности флуоресценции CMOS в клетках SKVO-3 при внесении HOCl, а также восстановление интенсивности флуоресценции в присутствии Cys/Hcy. Исходя из полученных данных, авторами был сделан вывод о возможности использования CMOS для изучения процессов окисления и восстановления тиолов в биологических системах [61].

В 2019 г. L. Jin et al. предложили сразу два хемосенсора типа “переключения” и “включения” с “ядром” кумарина – BCO и BETC соответственно (рис. 7) [62]. В основе механизма “переключения” BCO ($\lambda_{\text{возб}} = 372$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 430/460$ нм) и “включения” BETC ($\lambda_{\text{возб}} = 350$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 440$ нм) лежит окисление связей C=O (в случае BCO), C=O и C=N (в случае BETC) при действии HOCl с образованием общего конечного продукта (NOA, рис. 7). Оба зонда показали высокую чувствительность (ПО = 154 нМ для BCO и 32 нМ для BETC) и избирательность к HOCl. Однако BCO обладает малым сдвигом длин волн испускания

флуоресценции, что затрудняет его применение. Хемосенсоры были использованы для визуализации экзогенной HOCl в клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2) методом конфокальной микроскопии [62].

В начале 2020 г. группа L. Shi представила зонд типа “переключения” на основе кумарина – CSN, в котором DAMN был выбран в качестве сайта реакции с HOCl [63]. “Переключение” зонда ($\lambda_{\text{возб}} = 413$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 470/640$ нм) происходит благодаря реакциям окисления и циклизации DAMN в присутствии HOCl. Зонд характеризуется большим синим сдвигом, высокой чувствительностью (ПО = 94 нМ) и селективностью к HOCl, оптимум интенсивности флуоресценции зонда наблюдался в диапазоне pH 6.6–8.6. Недостаток CSN – слабая флоростабильность (значительное изменение флуоресцентных характеристик CSN наблюдалось спустя 30 мин после начала облучения зонда ксеноновой лампой). Несмотря на это, было показано постепенное усиление интенсивности флуоресценции зонда в синем канале регистрации по отношению к красному каналу в клетках HeLa (клетки раковой опухоли шейки матки) после инкубации с HOCl. Хемосенсор также был успешно применен для реги-

страции продукции НОСІ клетками RAW264.7 при их стимуляции LPS методом конфокальной микроскопии [63].

Ни один из указанных в данном подразделе зондов на основе кумарина не доступен для приобретения.

Зонды на основе флуоресцеина

В 2016 г. J. Hu et al. предложили модификацию зонда HPF с внедрением в него двух атомов хлора в *орто*-положении (2,6-дихлорфенольный фрагмент) – НКОСІ-3 (рис. 8) [64]. РЕТ обеспечивает низкий фоновый уровень флуоресценции НКОСІ-3. “Включение” датчика происходит за счет реакции окислительного *О*-деарилрования 2,6-дихлорфенола ($\lambda_{\text{возб}} = 490$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 527$ нм). НКОСІ-3 обладает крайне высокой чувствительностью (ПО = 0.33 нМ), селективностью и быстрым ответом на НОСІ; его недостаток – сильная зависимость интенсивности флуоресценции продукта от рН среды (оптимум достигается в узком диапазоне рН 7.0–7.5). Хемосенсор был использован для регистрации методом конфокальной микроскопии продукции НОСІ в клетках линий RAW264.7 и ТНР-1, нейтрофилах человека, а также в клетках микроглии мышей (BV-2, экспрессирующих МРО при воздействии ряда стимулов [65, 66]) при стимуляции РМА. Помимо этого, НКОСІ-3 подходит для регистрации продукции эндогенной НОСІ методом проточной цитометрии и при помощи спектрофлуориметра. Данный зонд эффективен также во флуоресцентной микроскопии при регистрации продукции эндогенной НОСІ *in vivo* в живых интактных эмбрионах аквариумных рыб *Danio rerio* на разных стадиях их развития [64].

В 2016 г. группа R. Zhang представила хемосенсор типа “включения” FHZ на основе флуоресцеина (рис. 8) [67]. Зонд имеет два сайта реакции: для $\cdot\text{OH}$ и для НОСІ. В присутствии только $\cdot\text{OH}$ происходит гидроксирование одного из шестичленных ароматических колец с последующим его разрывом, а также разрыв пятичленного кольца FHZ с образованием конечного продукта FOBA (рис. 8). В присутствии только НОСІ реакция идет без разрыва шестичленного ароматического кольца с образованием продукта F-TEG (рис. 8). Ввиду спектральных различий образующихся продуктов возможна одновременная регистрация увеличения интенсивности флуоресценции при действии $\cdot\text{OH}$ и НОСІ в разных каналах: в синем ($\lambda_{\text{возб}} = 410$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 486$ нм) для $\cdot\text{OH}$ и в зеленом ($\lambda_{\text{возб}} = 490$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 520$ нм) для НОСІ. FHZ в течение 2–3 мин реагирует с присутствующими одновременно $\cdot\text{OH}$ и НОСІ с увеличением интенсивности флуоресценции в 19 раз в синем канале и в 35 раз – в зеленом канале. В случае с НОСІ по-

казано, что “включение” флуоресценции происходит за счет блокирования процесса РЕТ [67, 68]. FHZ избирателен в отношении $\cdot\text{OH}$ и НОСІ и был протестирован на клетках HeLa при экзогенном внесении окислителей и на клетках RAW264.7 при их активации РМА. Показано, что FHZ распределяется как в цитоплазме, так и в митохондриях клеток. Продемонстрирована высокая биосовместимость зонда. Так, на живых эмбрионах аквариумных рыб *Danio rerio* было показано избирательное накопление спонтанно образующихся $\cdot\text{OH}$ и НОСІ в органах (кишечник, печень, пронефрос) с течением времени [67].

В 2019 г. группа J. Lv представила два зонда типа “включения” на основе флуоресцеина – FN-1 и FN-2 (рис. 8) [69]. Оба зонда были получены путем конденсации аминогрупп 1,8-диаминонафталина с альдегидными группами моно- (в случае FN-1) или бис- (в случае FN-2) альдегида флуоресцеина. Азот полученной при этом иминогруппы ($-\text{NH}-$) выступает мишенью для НОСІ. При реакции зондов с НОСІ образуются моно- и бис-альдегид флуоресцеина (для FN-1 и FN-2 соответственно). Реакция сопровождается “включением” флуоресценции флуоресцеина ($\lambda_{\text{возб}} = 490$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 529$ нм) за счет блокировки РЕТ. Квантовый выход флуоресценции продуктов реакции зондов с НОСІ в 3–4 раза ниже, чем у флуоресцеина. FN-1 по сравнению с FN-2 обладает большим фоновым уровнем флуоресценции и меньшей скоростью реакции с НОСІ. Оптимальный диапазон работы достигается при рН 7–10 для FN-1 и рН 6–10 для FN-2. Оба сенсора более специфичны, но менее чувствительны по отношению к НОСІ по сравнению с APF (ПО = 210 и 230 нМ для FN-1 и FN-2 соответственно). FN-1 и FN-2 были использованы для регистрации продукции НОСІ при экзогенном внесении H_2O_2 к клеткам HeLa, предварительно проинкубированными с NaCl и МРО [69].

Из указанных в данном подразделе зондов на основе флуоресцеина доступны к приобретению зонды НКОСІ-3 (MedChemExpress, США) и FHZ (Sigma-Aldrich, США).

Зонды на основе феноксазина

В 2016 г. краситель феноксазинового ряда – целестиновый синий В (СВ) – был предложен в качестве зонда типа “включения” для регистрации продукции НОСІ (рис. 9) [70]. Фоновая флуоресценция СВ в видимой области спектра практически не наблюдается, реакция с НОСІ приводит к образованию гликоля СВ (рис. 9) [71]. Реакция СВ с НОСІ сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции в оранжевой области спектра ($\lambda_{\text{возб}} = 460$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 590$ нм). Зонд характеризуется избирательностью в отношении

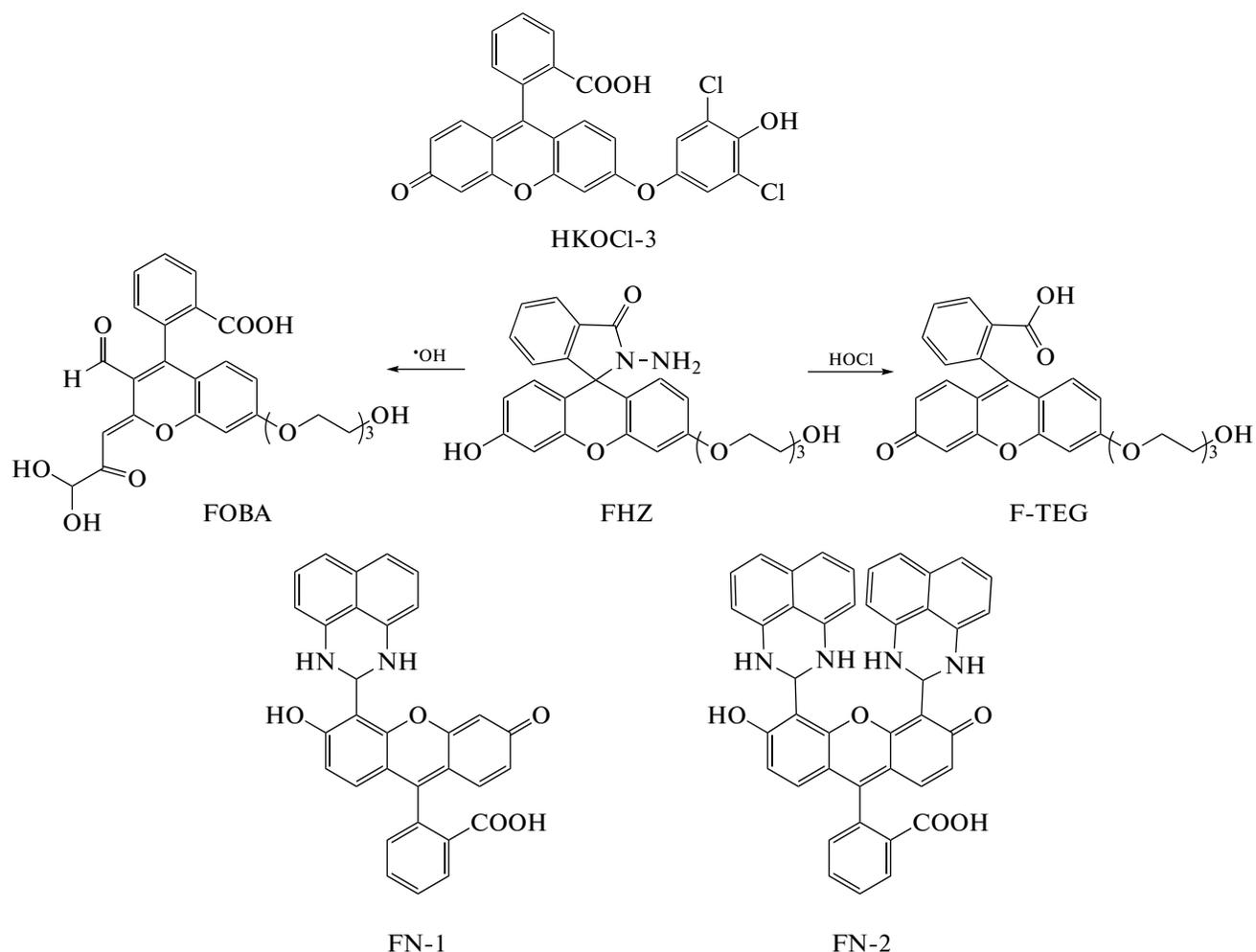


Рис. 8. Структурные формулы новых флуоресцентных зондов на основе флуоресцеина.

НОСI, НОВг, а также галогенированных производных таурина и белков. Хемосенсор обладает высокой чувствительностью к НОСI (ПО = 32 нМ), фотостабильностью, высокой скоростью реакции (плато интенсивности флуоресценции достигается в течение 30 с) и большим стоксовым сдвигом. Существенное увеличение интенсивности флуоресценции (в ~100 раз) наблюдается в диапазоне рН 7.0–7.5, а фоновый уровень флуоресценции низок и практически не изменяется в диапазоне рН 2.2–8.0. С использованием СВ методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии показана продукция НОСI нейтрофилами человека при их стимуляции РМА [70]. Помимо этого, СВ может использоваться для кинетического анализа продукции НОСI в суспензиях нейтрофилов, активированных РМА, хемотаксическим пептидом *N*-формилметионил-лейцил-фенилаланином и растительными лектинами с различной углеводной специфичностью (в присутствии цитохалазина В). Хемосенсор был успешно опробован при исследовании влияния лекарственных

препаратов на продукцию НОСI нейтрофилами человека [70–72].

В 2019 г. М.Г. Choi et al. представили зонд типа “включения” RT-1 на основе карбонидитиоатного производного резорурфина (рис. 9) [73]. Гидролиз карбонидитиоатного фрагмента при действии НОСI приводит к высвобождению флуоресцирующего резорурфина ($\lambda_{\text{возб}} = 550 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 587 \text{ нм}$). Зонд показал высокую чувствительность (ПО = 2.18 нМ), избирательность к НОСI, однако относительно невысокую скорость реакции с НОСI (интенсивность флуоресценции достигала плато в течение 3 мин). К недостаткам зонда следует отнести падение интенсивности флуоресценции резорурфина в присутствии ионов брома и иода, а также сильную зависимость отношения интенсивности флуоресценции резорурфина к интенсивности флуоресценции RT-1 от значения рН среды (оптимум при рН 8.0). RT-1 был использован для визуализации экзогенной НОСI в клетках линий RAW264.7 и HeLa [73].

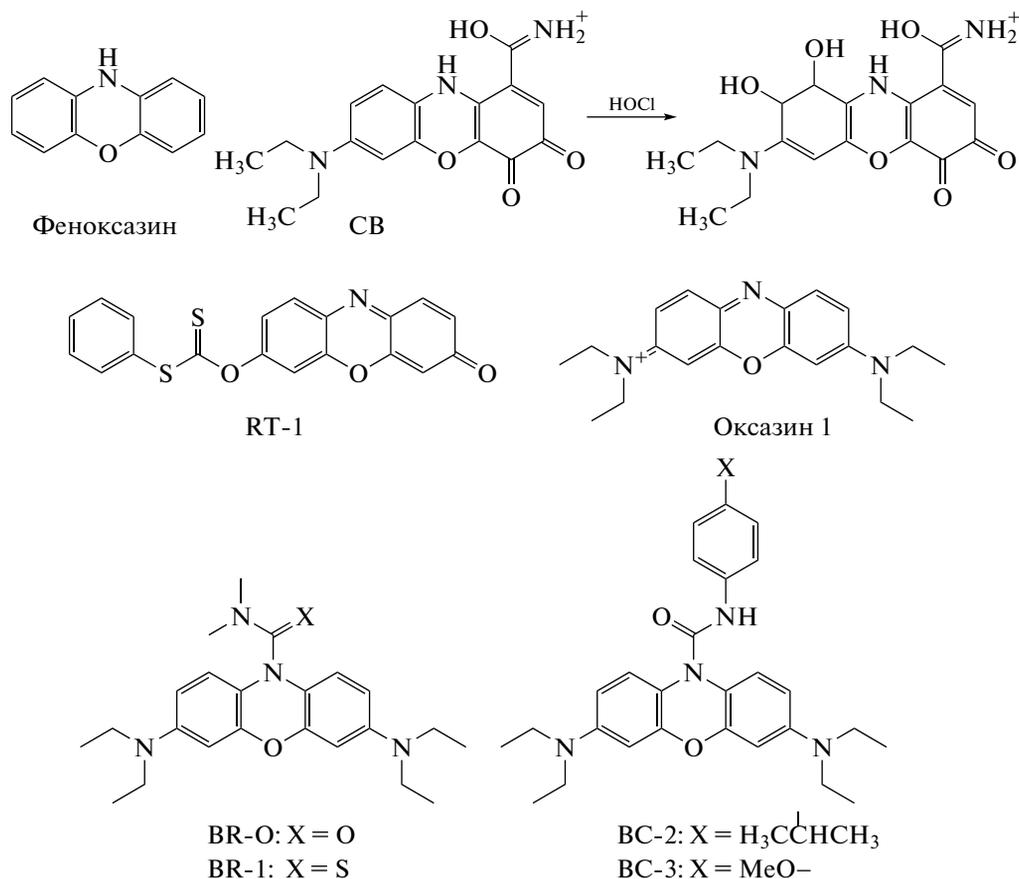


Рис. 9. Структурные формулы феноксазина и новых флуоресцентных зондов на его основе.

В 2020 г. группа J. Yang представила два зонда типа “включения” BR-O [74] и BR-1 [75], имеющих *N,N*-диметилкарбонильный и *N,N*-диметилтиокарбонильный остатки в качестве сайтов реакции с HOCl соответственно (рис. 9). Оба хемосенсора окисляются HOCl с высвобождением нестабильной восстановленной формы бис-диметиламинофеноксазина, который быстро гидролизуется и окисляется до конечного флуорофора – оксазина 1 ($\lambda_{\text{возб}} = 610 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 670 \text{ нм}$). Оба зонда показали избирательность в отношении HOCl по сравнению с АФК и АФА, достаточно быстрый ответ (плато интенсивности флуоресценции достигается за 7 и 2.5 мин для BR-O и BR-1 соответственно), стабильность флуоресцентного сигнала в диапазоне pH 5–8, а также высокую чувствительность (ПО = 19 и 11 нМ для BR-O и BR-1 соответственно). Недостаток этих сенсоров – сильное перекрывание спектров поглощения и испускания (стоксов сдвиг составил 20 нм для обоих зондов). BR-O и BR-1 показали увеличение интенсивности флуоресценции при внесении экзогенной HOCl в культуру клеток RAW264.7. Кроме того, с помощью данных зондов выявлено спонтанное образование HOCl в клетках острой

промиелоцитарной лейкемии человека (линия HL-60, экспрессирующая MPO на высоком уровне [53]) и подавление этого процесса в присутствии ингибитора MPO – гидразида 4-аминобензойной кислоты [74, 75]. BR-1 был использован для регистрации образования HOCl в модели артрита коленного сустава мышей [75], индуцированного инъекцией мукополисахарида λ -каррагинана – известного индуктора артрита у крыс [76].

В этом же году группа ученых во главе с W. Zheng представила две модификации зонда BR-O: BC-2 и BC-3 (рис. 9) [77]. Мишень для HOCl в этих сенсорах – атом углерода амидной группы. Как и в случае BR-O и BR-1, взаимодействие BC-2 и BC-3 с HOCl приводит к разрыву амидной связи с высвобождением восстановленного бис-диметиламинофеноксазина, который затем быстро переходит в окисленную форму, что сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции оксазина 1 ($\lambda_{\text{возб}} = 620 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 669 \text{ нм}$). BC-2 и BC-3 чувствительны (ПО = 20 и 11 нМ соответственно) и селективны в отношении HOCl по сравнению с АФК и АФА. При этом увеличение интенсивности флуоресценции в 3 раза больше в случае взаимодействия HOCl с BC-3

в сравнении с ВС-2. Существенное улучшение данных модификаций по сравнению с зондами BR-0 и BR-1 – уменьшение времени достижения плато интенсивности флуоресценции после добавления НОСІ (30–50 с). ВС-3 был использован для регистрации спонтанной продукции НОСІ в клетках линии HL-60, а также в модели артрита у мышей при инъекции λ -каррагинана [77].

Из указанных зондов на основе феноксазина коммерчески доступен только зонд СВ (Sigma-Aldrich, США; Thermo Fisher Scientific, США).

Зонды на основе родола

Родол – гибридный флуорофор на основе флуоресцеина и родамина (рис. 10) – и его производные (родафлуоры) также используются в качестве флуоресцентных зондов для регистрации НОСІ. В 2018 г. группа Y. Zhang представила зонд типа “включения” RO610 на основе родола [78]. DAMN был выбран в качестве сайта реакции. При действии НОСІ происходит отщепление остатка DAMN, что сопровождается “включением” флуоресценции родола ($\lambda_{\text{возб}} = 535$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 577$ нм). RO610 обладает высокой чувствительностью (ПО = 29 нМ), селективностью по отношению к НОСІ в сравнении с АФК и АФА, быстрым выходом кинетической кривой изменения интенсивности флуоресценции на плато (в течение 30 с). Однако хемосенсор имеет небольшой рабочий диапазон рН (7.0–8.5). RO610 был апробирован для визуализации экзогенной НОСІ в клетках линии A549, а также при внутрибрюшинной инъекции НОСІ мышам. Помимо этого, была показана возможность регистрации образования эндогенной НОСІ *in vivo* в модели перитонита у мышей как при введении им зимозана, так и в норме без дополнительной стимуляции [78].

В 2020 г. X. Bai et al. на основе родола представили зонд типа “включения” НКОСІ-4 и его производные – НКОСІ-4г и НКОСІ-4м (рис. 10) [79]. Во всех трех зондах остаток 2,6-дихлорфенола был использован в качестве сайта для реакции с НОСІ. Превращение сенсоров во флуоресцирующую форму происходит за счет реакции О-деарилрования ($\lambda_{\text{возб}} = 530$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 557$ нм). НКОСІ-4 крайне чувствителен (ПО = 9 нМ) и селективен в отношении НОСІ. Увеличение интенсивности флуоресценции происходит быстро (плато достигается в течение 30 с), однако наблюдается сильная зависимость интенсивности флуоресценции от рН (максимум при рН 8.0). НКОСІ-4г и НКОСІ-4м были разработаны с целью улучшения проникновения зонда в клетки и регистрации продукции НОСІ в митохондриях. Так, в НКОСІ-4г введена группа сложного диметилового эфира, которая может гидролизоваться эстеразами клеток, а в НКОСІ-4м введен катионный митохондриально-нацелен-

ный фрагмент на основе трифенилфосфония (рис. 10). Методом конфокальной микроскопии с использованием НКОСІ-4г было показано образование НОСІ в клетках линии RAW264.7 при их стимуляции РМА, а также LPS/IFN- γ , помимо этого показано присутствие НОСІ в тканях мозга крыс с ишемическим повреждением. Методами конфокальной микроскопии и проточной цитометрии с помощью НКОСІ-4м была визуализирована НОСІ в митохондриях клеток линии RAW264.7 при их стимуляции РМА или LPS/IFN- γ [79].

Из указанных зондов на основе родола доступны к приобретению зонды НКОСІ-4 и НКОСІ-4м.

Зонды на основе 1,8-нафталимида

Несмотря на то, что 1,8-нафталимид и ранее использовался для конструирования зондов для НОСІ, в последние годы его популярность возросла. В 2017 г. группа во главе с J. Li синтезировала зонд типа “включения” на основе 1,8-нафталимида – соединение (VI) (рис. 11) [80]. НОСІ окисляет гидроксильную группу данного зонда до карбонильной, что сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 414$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 523$ нм). Хемосенсор характеризуется относительно низкой чувствительностью (ПО = 2.66 мкМ), большим диапазоном линейной зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации НОСІ (0.1–1.0 мМ), стабильностью в физиологическом диапазоне рН, хорошей селективностью и высокой скоростью реакции с НОСІ (плато изменения интенсивности флуоресценции достигается в течение 3 с). Соединение (VI) было использовано для визуализации экзогенной НОСІ в клетках линии A549 с помощью конфокальной микроскопии [80].

В этом же году С. Liu et al. представили лизосомино-нацеленный хемосенсор типа “включения” РТ-1 (рис. 11) [81]. 1,8-Нафталимид выступает в качестве флуорофора, фенотиазиновый фрагмент – в качестве донора электронов, а морфолиновый фрагмент – в качестве лизосомино-нацеленной группы. В результате реакции НОСІ с атомом серы в фенотиазиновом фрагменте происходит блокировка процесса РЕТ, что способствует увеличению интенсивности флуоресценции зонда ($\lambda_{\text{возб}} = 460$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 535$ нм). Зонд обладает высокими значениями таких параметров, как селективность, чувствительность (ПО = 0.88 нМ) и квантовый выход (0.57), а также быстрым откликом (плато изменения интенсивности флуоресценции достигается в течение 10 с), рабочий диапазон рН соответствует кислой области, что необходимо для регистрации НОСІ в лизосомах (рН 2–6). РТ-1 был апробирован при регистрации экзогенной НОСІ в клетках линии L929 (ли-

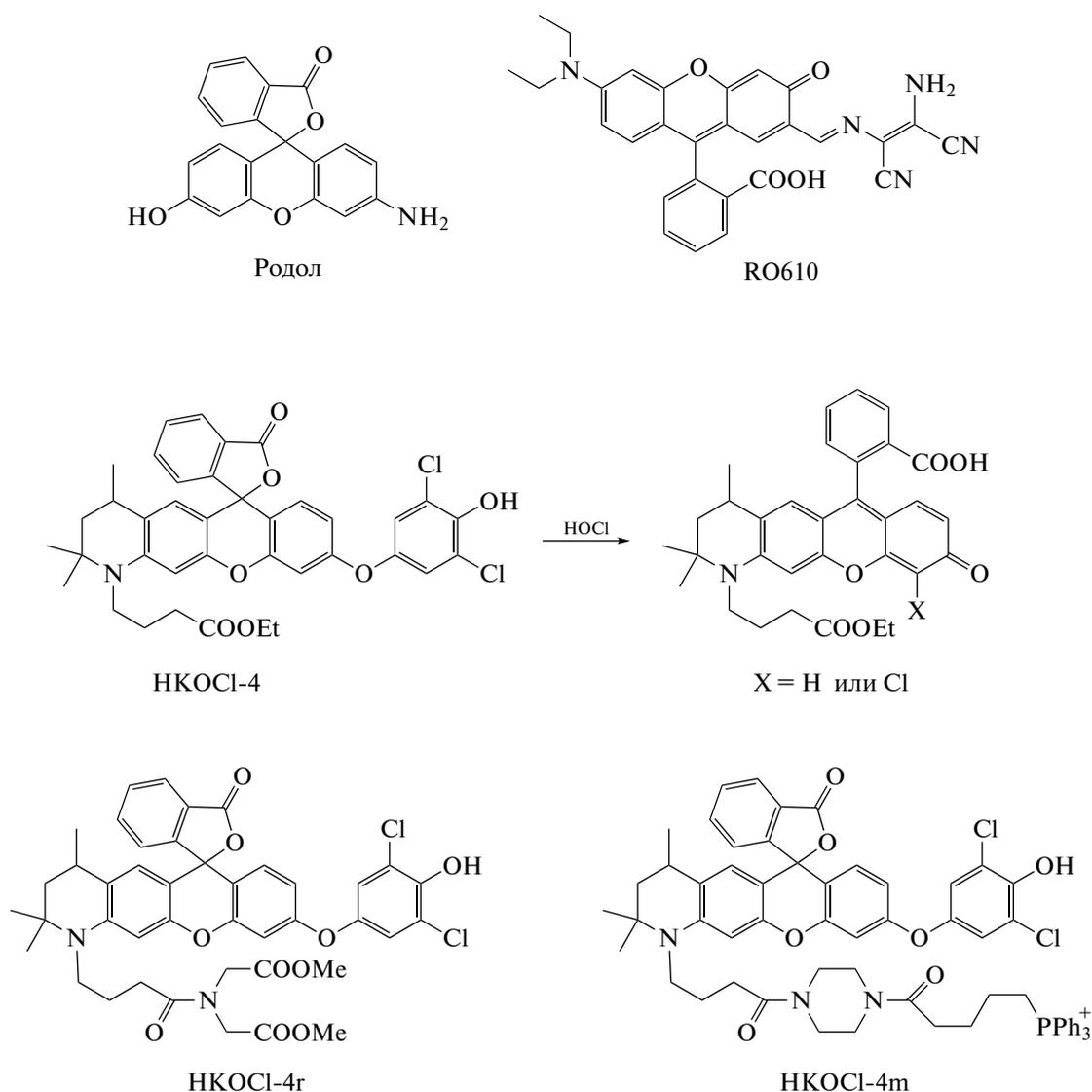


Рис. 10. Структурные формулы родола и новых флуоресцентных зондов на его основе.

ния клеток подкожной соединительной ткани мышей), а также эндогенной HOCl в клетках линии RAW264.7 при стимуляции LPS/PMA [81].

В начале 2020 г. С. Jiao et al. представили хемосенсор типа “включения” NDS для регистрации HOCl (рис. 11) [82]. В NDS нафталимид выступает в качестве флуорофора, диметилтиокарбамат – в качестве сайта реакции с HOCl, а морфолиновый фрагмент обеспечивает проникновение зонда в лизосомы. Предполагается, что HOCl реагирует с атомом серы сенсора с последующим гидролизом целевой группы. “Включение” интенсивности флуоресценции зонда ($\lambda_{\text{возб}} = 420 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 525 \text{ нм}$) происходит благодаря процессу ICT. NDS обладает высокой чувствительностью (ПО = 105 нМ), селективностью и скоростью реакции с HOCl: плато изменения интенсивности флуо-

ресценции достигается в течение 16 с при реакции NDS с HOCl в растворе и в течение 300 с при реакции с HOCl, образующейся в системе MPO/H₂O₂/Cl⁻. NDS был использован для регистрации образования HOCl в лизосомах клеток HeLa при их стимуляции LPS/PMA [82].

В этом же году другая группа ученых во главе с Т. Yang разработала зонд типа “включения” ER-NPA для регистрации HOCl в эндоплазматическом ретикулуме (рис. 11) [83]. В качестве флуорофора был использован нафталимид, в качестве сайта реакции с HOCl – *n*-аминофениловый эфир, а в качестве целевой группы для эндоплазматического ретикулума – метилсульфонамид. Предполагается, что в ER-NPA PET обеспечивает гашение флуоресценции нафталимида, а в присутствии HOCl окисление и гидролиз эфирной

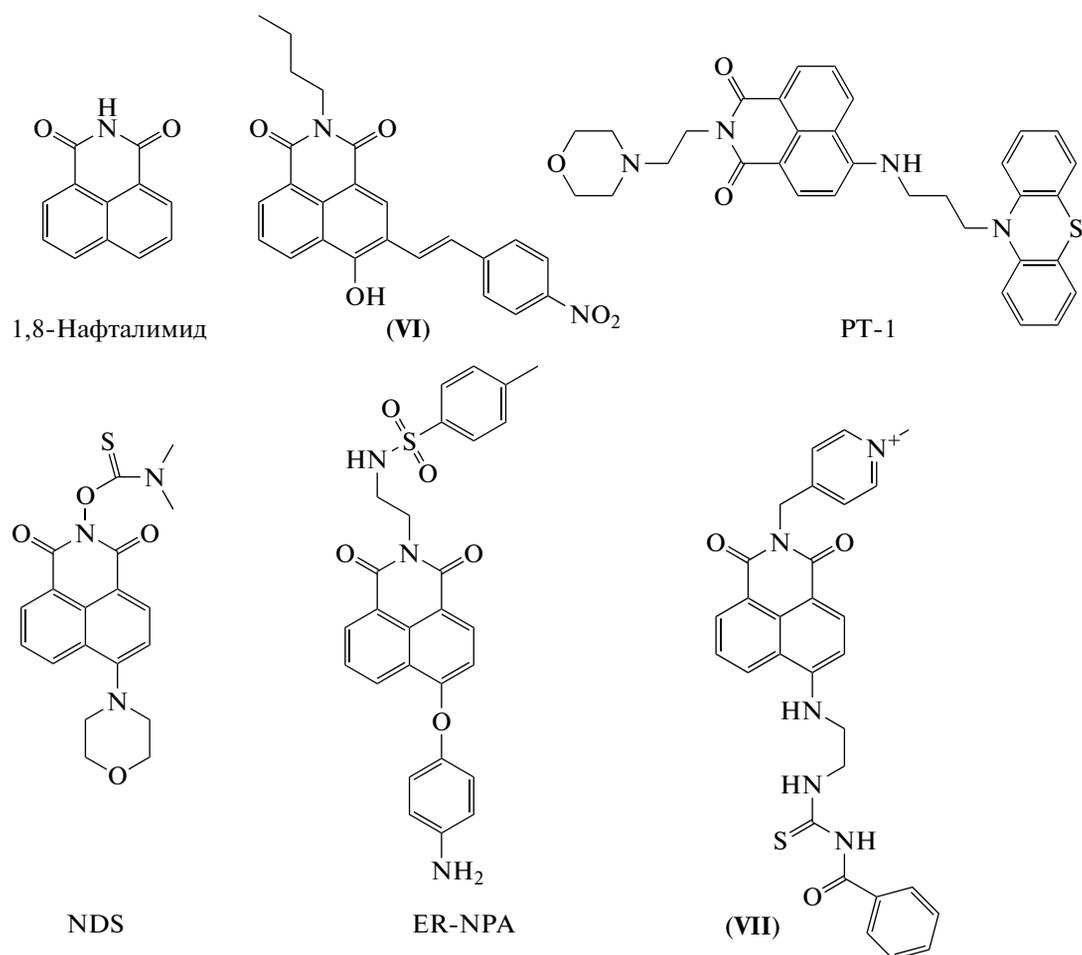


Рис. 11. Структурные формулы 1,8-нафталимида и новых флуоресцентных зондов на его основе.

связи в ER-NPA приводит к отщеплению остатка аминифенила и образованию гидроксильного аниона, что способствует процессу ИСТ и “включению” флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 450 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 550 \text{ нм}$). Зонд показал высокую чувствительность (ПО = 6.2 нМ) и селективность, а также стабильность и высокий уровень интенсивности флуоресценции при действии НОСІ в диапазоне рН 2–10. При реакции с НОСІ плато изменения интенсивности флуоресценции достигается в течение 60 с. ER-NPA был использован для регистрации экзо- и эндогенной НОСІ (при стимуляции LPS/PMA, а также туникамицином) в клетках HeLa методом конфокальной микроскопии в режиме двухфотонного возбуждения ($\lambda_{\text{возб}} = 800 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 550 \text{ нм}$). Данный зонд показал эффективность также в случае регистрации экзо- и эндогенной НОСІ (при стимуляции LPS/PMA) *in vivo* в эмбрионах аквариумных рыб *Danio rerio* [83].

В начале 2021 г. J. Xu et al. представили митохондриально-нацеленный зонд типа “включения” – соединение (VII) [84]. Остаток нафтали-

имида использован в качестве флуорофора, (2-аминоэтил)-тиомочевина – в качестве сайта реакции, а кватернизованный пиридиновый фрагмент – в качестве митохондриально-нацеленной группы. При взаимодействии с НОСІ происходит внутримолекулярная циклизация тиомочевинной группы зонда, что сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 370 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 488 \text{ нм}$). Зонд характеризуется избирательностью к НОСІ по сравнению с другими активными формами, относительно высокой чувствительностью (ПО = 230 нМ), большим рабочим диапазоном рН (рН 2–9), интенсивность флуоресценции достигает плато в течение 60 с. Хемосенсор был использован при визуализации экзогенной НОСІ в митохондриях клеток линии РС-12 (клетки феохромоцитомы крысы), а также для регистрации образования эндогенной НОСІ в клетках линии RAW264.7 при их стимуляции PMA [84].

Ни один из указанных в данном подразделе зондов не доступен для приобретения.

Иные малые молекулярные зонды

В 2016 г. группа ученых во главе с Y. Liu представила гибридный зонд “переключения” на основе “ядер” BODIPY и родамина – BRT (рис. 12) [85]. В отличие от предшественников, например, HRS1 и соединения (IV) (рис. 6), атом кислорода в родаминовом кольце заменен на атом серы. При действии HOCl тиогидразид родамина переходит в открытую форму, что сопровождается переносом энергии по механизму FRET от BODIPY к родамину ($\lambda_{\text{возб}} = 525 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 580/540 \text{ нм}$). Зонд показал высокую чувствительность (ПО = 38 нМ), селективность, а также скорость реакции (выход кинетической кривой изменения интенсивности флуоресценции на плато достигался в течение 15 с) в отношении HOCl по сравнению с другими окислителями. Однако “переключение” интенсивности флуоресценции зонда сильно зависит от pH (оптимум при pH 4.0–5.5). BRT был использован для регистрации методом конфокальной микроскопии продукции HOCl клетками линии RAW264.7 при их активации LPS [85].

В 2018 г. группа во главе с G.J. Song синтезировала новый зонд типа “переключения” RPM (рис. 12) [86]. В структуре хемосенсора в качестве донора энергии использован имидазо[1,5-*a*]пиридин, акцептора – модифицированный остаток родамина. Зонд обладает собственной флуоресценцией, характерной для имидазо[1,5-*a*]пиридина ($\lambda_{\text{возб}} = 400 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 462 \text{ нм}$). При реакции с HOCl карбонильная группа в имидазо[1,5-*a*]пиридине преобразуется в оксадиазол, что ослабляет его способность принимать электроны. С другой стороны, происходит открытие кольца родаминового фрагмента, что в итоге приводит к увеличению интенсивности флуоресценции в оранжевой области спектра при сохранении флуоресценции в синей области ($\lambda_{\text{возб}} = 400 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 587/462 \text{ нм}$). Авторы полагают, что подобный эффект обусловлен комбинацией ICT и TRET. RPM обладает высокой избирательностью по отношению к HOCl, быстрым ответом (плато изменения интенсивности флуоресценции достигается в течение 30 с), большим рабочим диапазоном pH (5.5–8.0), в пределах которого эффективность “переключения” максимальна и постоянна. Недостаток сенсора – сравнительно малая чувствительность (ПО = 2.08 мкМ). RPM был использован для визуализации методом конфокальной микроскопии образования HOCl клетками линии RAW264.7 при их стимуляции LPS [86].

Используя вышеописанный подход, H. Meng et al. в 2019 г. сконструировали ратиометрический зонд CR-Ly (рис. 12) [87]. “Ядра” кумарина и родамина были выбраны, соответственно, в качестве донора и акцептора энергии, а морфолиновый фрагмент – в качестве лизосомо-нацеленной группы. Механизм “переключения” CR-Ly и со-

единения (IV), описанного в подразделе о переходе к концепции зондов “переключения” (рис. 6), аналогичны. Диацилгидразин выступает в качестве сайта реакции с HOCl, после взаимодействия с которым родаминовый фрагмент претерпевает превращение из спироциклической формы в форму с раскрытым кольцом. При этом разблокировка процесса FRET приводит к “переключению” флуоресценции с кумарина на родамин ($\lambda_{\text{возб}} = 420 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 582/479 \text{ нм}$). CR-Ly характеризуется крайне высокой чувствительностью (ПО = 12 нМ) и селективностью по отношению к HOCl, относительно малым временем реакции (плато изменения интенсивности флуоресценции достигается в течение 50 с). Соотношение изменения интенсивности флуоресценции максимально и слабо зависит от pH в слабокислой области (pH 4–6), что соответствует целям разработки зонда для применения в лизосомах. Возможность визуализации продукции HOCl в лизосомах была показана на клетках линии RAW264.7 при их стимуляции LPS/PMA [87].

В 2018 г. D. Zheng et al. представили зонд типа “включения” Dcp-EPtz на основе фенотиазин-дицианоизофорона (рис. 12) [88]. Окисление атома серы при действии HOCl приводит к образованию альдегида в качестве продукта реакции, который характеризуется интенсивностью флуоресценции в красной области ($\lambda_{\text{возб}} = 475 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 618 \text{ нм}$) и большим стоксовым сдвигом (>143 нм). Dcp-EPtz обладает высокой селективностью в отношении HOCl по сравнению с другими окислителями, широким рабочим диапазоном pH 5–8. Однако вследствие образования интермедиатов радикальной природы интенсивность флуоресценции продукта реакции нестабильна в течение первых 300 с после начала реакции. Dcp-EPtz был использован для регистрации методом конфокальной микроскопии экзогенной HOCl в клетках линии L929 и продукции эндогенной HOCl в клетках линии RAW264.7 при их активации LPS/PMA [88].

В середине 2020 г. L. Liu et al. разработали и реализовали новый подход к регистрации базальной активности MPO [89]. В основу хемосенсора типа “включения” FD-301 (рис. 12) положена структура известного ингибитора MPO – гидразида 4-аминобензойной кислоты, связанного с помощью дибензоилгидразинового линкера с флуорофором – метиленовым синим. FD-301 специфически связывается с MPO благодаря гидразидному фрагменту, однако стерические затруднения, вызванные наличием метиленового синего, не приводят к ингибированию каталитической активности фермента. Мишенью реакции выступает гидразидный остаток, окисление которого HOCl приводит к разрыву связи и высвобождению флуорофора ($\lambda_{\text{возб}} = 620 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{исп}} = 686 \text{ нм}$). FD-301 обладает высокой чувствительностью

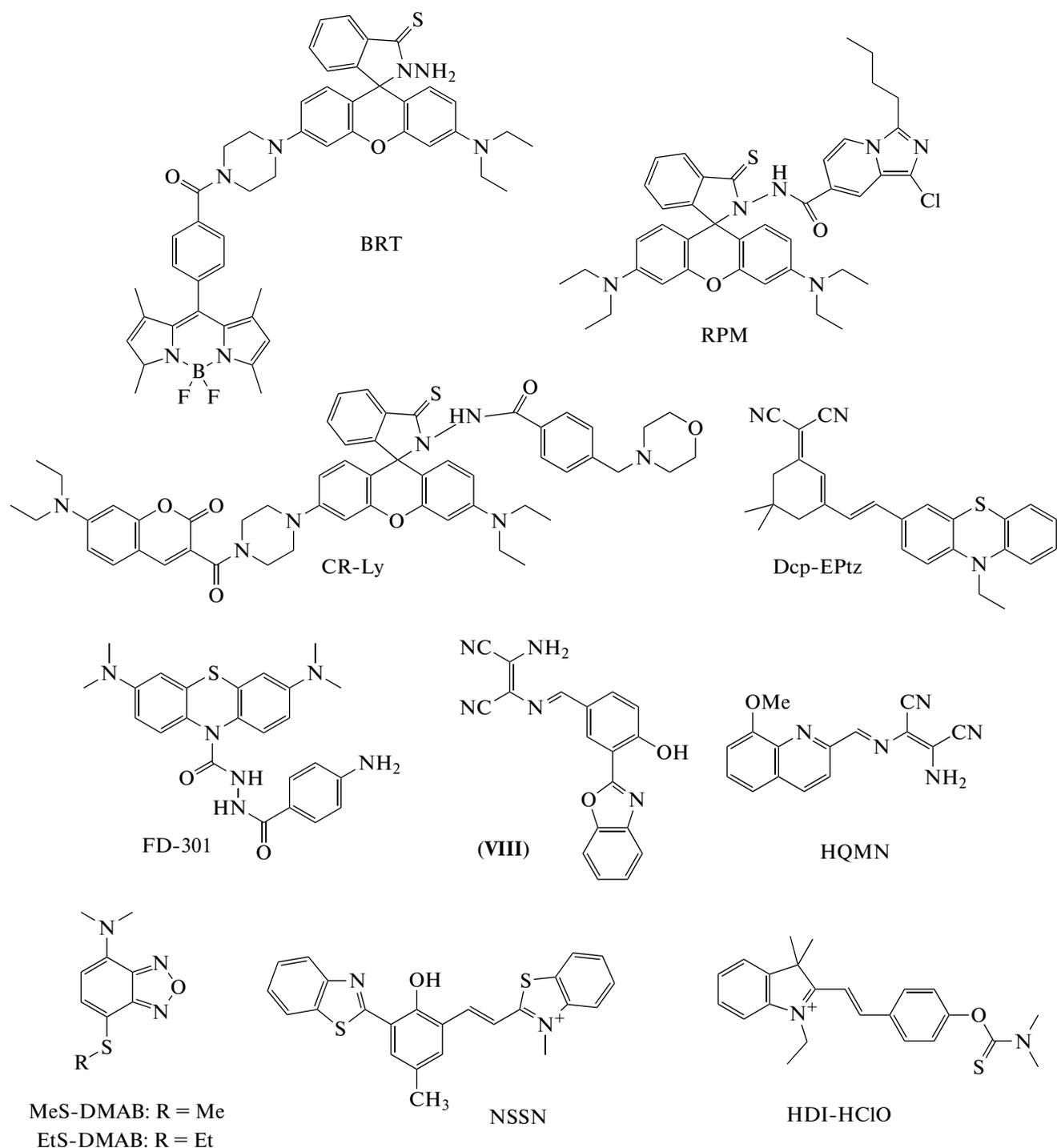


Рис. 12. Структурные формулы иных новых малых молекулярных флуоресцентных зондов.

(ПО = 44 нМ) и скоростью реакции с HOCl (плотность изменения интенсивности флуоресценции достигается за 10 с), широким рабочим диапазоном pH 3–8, селективностью в отношении HOCl по сравнению с другими окислителями. Хемосенсор был успешно апробирован при визуализации экзогенной HOCl в клетках линии RAW264.7, а так-

же спонтанной продукции эндогенной HOCl в клетках линии HL-60. FD-301 был применен для регистрации образования HOCl *in vivo* в модели артрита, индуцированного инъекцией λ -каррагинана в голеностопный сустав мыши, и *ex vivo* в модели язвенного колита мышей, индуцированного оральным приемом 5%-ного декстрана [89].

В 2018 г. L. Chen et al. предложили зонд типа “включения” (соединение (VIII)) для обнаружения HOCl на основе флуоресцентного “ядра” 2-(2'-гидроксифенил)бензоксазола (рис. 12) [90]. DAMN был выбран в качестве сайта реакции с HOCl. При реакции HOCl с зондом происходит превращение иминогруппы в альдегидную. Реакция сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 360$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 435$ нм) за счет ингибирования PET. Зонд характеризуется высокой чувствительностью, селективностью и скоростью реакции (плато интенсивности флуоресценции достигается в течение 30 с) в отношении HOCl. Хемосенсор был использован в режиме двухфотонного возбуждения ($\lambda_{\text{возб}} = 740$ нм) для регистрации образования HOCl в клетках линии RAW264.7 при их стимуляции LPS/IFN- γ /PMA, а также в срезах гиппокампа мыши при стимуляции PMA [90].

В 2018 г. группа ученых во главе с S. Das предложила зонд “переключения” на основе хинолина – HQMN (рис. 12) [91]. Как и у соединения (VIII), DAMN служит в качестве сайта реакции с HOCl. Полученный в ходе реакции зонда с HOCl альдегид характеризуется значительным сдвигом в синюю область максимума интенсивности флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 370$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 468/572$ нм). Зонд показал высокую селективность в отношении HOCl по сравнению с другими окислителями, а также большой сдвиг максимума испускания при действии HOCl (104 нм). Однако теоретический предел обнаружения HOCl (ПО = 787 нМ) в ~10 раз больше, чем у многих сенсоров, разработанных в последние годы, а плато интенсивности флуоресценции достигается в течение 100 с, что в ~3 раза больше, чем у зондов феноксазинового ряда, зондов на основе родола и др. С помощью HQMN показано увеличение спонтанной продукции HOCl в моноцитах больных сахарным диабетом по сравнению с моноцитами здоровых доноров [91].

В 2018 г. J. Sun et al. предложили два флуоресцентных зонда типа “включения” с бензофуразаном в качестве флуорофора – MeS-DMAB и EtS-DMAB (рис. 12) [92]. Тиоэфирная группа окисляется при действии HOCl до сульфоксида и сульфоновой группы для MeS-DMAB и EtS-DMAB соответственно, что приводит к увеличению интенсивности флуоресцентного сигнала за счет активации процесса ICT ($\lambda_{\text{возб}} = 440$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 610$ нм). Оба хемосенсора характеризуются большим стоксовым сдвигом (170 нм), высокой избирательностью в отношении HOCl, однако время достижения плато интенсивности флуоресценции после добавления HOCl составляет 30–40 мин. Поскольку чувствительность EtS-DMAB (ПО = 340 нМ) по отношению к HOCl выше в

сравнении с MeS-DMAB, он был использован для регистрации методом конфокальной микроскопии экзогенной HOCl в клетках линии HeLa и образования эндогенной HOCl в клетках линии RAW264.7 при их активации LPS/IFN- γ /PMA [92].

В 2020 г. Y. Huang et al. предложил зонд двойного действия NSSN для регистрации HOCl в митохондриях (рис. 12) [93]. Зонд содержит два бензотиазольных фрагмента и один остаток *n*-метилфенола между ними. Реакция с HOCl протекает по связи C=C, расположенной между *орто*-положением *n*-метилфенола и бензотиазола с последующим отщеплением бензотиазольного фрагмента. При этом наблюдается “переключение” интенсивности флуоресценции зонда с красной на желтую область спектра ($\lambda_{\text{возб}} = 450$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 540/670$ нм) предположительно за счет процесса ESIPT. При концентрации HOCl 30–70 мкМ спектр испускания флуоресценции смещается в красную область, и NSSN может быть использован в качестве зонда “включения” ($\lambda_{\text{возб}} = 450$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 552$ нм). Хемосенсор селективен в отношении HOCl, имеет низкий предел обнаружения (ПО = 130 нМ), рабочий диапазон лежит в области pH 7–10, однако время выхода на плато интенсивности флуоресценции составляет 5 мин. NSSN был использован для визуализации экзогенной HOCl в митохондриях клеток HeLa, а также при подкожной инъекции HOCl мышам [93].

В 2021 г. P. Luo совместно с X. Zhao представили зонд типа “включения” HDI-HClO (рис. 12) [94]. Зонд содержит фрагменты индоленина, фенола и, как и в некоторых других работах, *N,N*-диметилтиокарбамат в качестве сайта реакции с HOCl. При реакции хемосенсора с HOCl происходит активация ранее заблокированного процесса ICT, что приводит к “включению” зонда ($\lambda_{\text{возб}} = 440$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 520$ нм). HDI-HClO продемонстрировал высокую селективность и чувствительность (ПО = 8.3 нМ), быстрый выход на плато кинетической кривой изменения интенсивности флуоресценции (8 с), широкий рабочий диапазон pH 7–10. При этом следует отметить незначительное влияние биологических тиолов на интенсивность флуоресценции зонда в режиме кинетических исследований. HDI-HClO был апробирован при визуализации экзогенной HOCl в клетках линии HeLa, а также эндогенной HOCl в макрофагах RAW264.7 при их стимуляции LPS/PMA [94].

Ни один из указанных в данном подразделе зондов не доступен для приобретения.

Краткая характеристика новых малых молекулярных флуоресцентных зондов для регистрации HOCl приведена в табл. S1 (см. дополнительные материалы).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка чувствительных, селективных и биологически совместимых флуоресцентных зондов с целью регистрации реакционных соединений, в том числе НОСІ, в биологических объектах вызывает интерес многих ученых, особенно это стало заметно в последние 10 лет. За это время было разработано множество зондов на основе различных флуоресцентных “ядер”, групп распознавания, типов и механизмов изменения интенсивности флуоресценции. Сами зонды стали более специализированными и чаще применяемыми для мониторинга образования НОСІ с целью изучения ее участия в физиологических и патофизиологических процессах, а также выяснения роли этой молекулы в клеточной сигнализации.

В настоящем обзоре мы представили классификацию, стратегии обнаружения, а также достижения в разработке флуоресцентных зондов для обнаружения НОСІ в биологических объектах. Однако, несмотря на значительные успехи в этой области, существует ряд ограничений использования флуоресцентных зондов вне зависимости от их типа: 1) малый стоксов сдвиг, который приводит к потере чувствительности зонда вследствие поглощения испускаемого света; 2) меньшая скорость реакции сенсора с НОСІ по сравнению со скоростью реакции НОСІ с функциональными группами биомолекул, что затрудняет кинетические исследования функционального ответа клеток на внешние стимулы; 3) сложная процедура синтеза и, как следствие, коммерческая недоступность, высокая стоимость или низкая чистота продукта; 4) малый рабочий диапазон рН и/или его сдвиг в кислотные или щелочные области (за исключением случаев разработки зондов, нацеленных на определенную органеллу клетки-мишени); 5) низкая стабильность самого зонда (малое время хранения препарата) и/или фотообесцвечивание флуоресцентного продукта во время наблюдений; 6) влияние НОСІ и других АФК, АФГ и АФА на продукт реакции зонда с НОСІ; 7) малая селективность (высокая степень влияния других АФК, АФГ и АФА, а также ионов); 8) низкая чувствительность (большое значение ПО) и т.д. [16].

В настоящее время получен ряд зондов, лишенных большинства вышеперечисленных недостатков при их использовании в бесклеточных средах. Однако данный факт не гарантирует достаточную чувствительность этого же зонда в клеточных культурах. Принимая во внимание специфику клеточных систем, к зондам для регистрации НОСІ предъявляются некоторые дополнительные требования.

1) В идеале сенсор должен позволять производить избирательную оценку образования НОСІ во внутри- или внеклеточных областях. Поэтому

при конструировании зонда должен быть соблюден подходящий для конкретной задачи баланс между гидрофобностью и гидрофильностью зонда в контексте проницаемости для мембран, удержания в клетках и растворимости в физиологических средах [14].

2) В качестве растворителя для сенсора идеально использование воды или буферного раствора с физиологическим значением рН. В ряде случаев допускаются малые добавки органического растворителя. Большое содержание органических растворителей может нарушать физико-химические свойства биомолекул и влиять на жизнеспособность клеток. Однако большинство флуоресцентных зондов плохо растворимы в водных средах. В качестве растворителей или соразтворителей используют такие органические вещества, как *N,N*-диметилформамид, диметилсульфоксид, ацетонитрил, этанол, глицерин [95]. Следует помнить, что часто используемый диметилсульфоксид сам окисляется НОСІ [96]. Чаще других в качестве буферных растворов используют фосфатно-солевую буфер, *N*-2-гидроксиэтилпиперазин-*N*'-2-этансульфоновую кислоту (HEPES), 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол (Tris) и др. [95]. Однако применение двух последних соединений нежелательно ввиду их реакции с НОСІ [97].

3) Необходимо избегать сильного поглощения зонда в ультрафиолетовой области, а также совпадения спектров поглощения и/или возбуждения сенсора с полосами Сорс основных белков плазмы крови. Первую из этих проблем можно обойти, если использовать режим двухфотонного возбуждения хемосенсора, что, однако, не всегда реализуемо.

4) Зонд должен быть нетоксичным для клеток в используемых концентрациях на протяжении всего периода измерений (в зависимости от используемых методов промежутки времени варьируются от 30 мин до нескольких суток). При этом желательно наличие у зонда высокого молярного коэффициента поглощения, что дает возможность уменьшить его концентрацию, необходимую для экспериментов, и, следовательно, снизить вмешательство в изучаемые механизмы [14].

При разработке зонда, лишенного сразу нескольких недостатков, исследователи часто берут за основу некоторое удачное решение с целью его дальнейшей доработки. Так, среди тенденций в разработке и применении малых молекулярных зондов для регистрации НОСІ можно отметить частое использование DAMN в качестве мишени для НОСІ в составе сенсоров, например, в CSN [63], RO610 [78], соединениях (VIII) [90], HQMN [91]. Новой ветвью стало использование зондов на основе феноксазина (CB [70], RT-1 [73], BR-O [74], BR-1 [75], BC-2 и BC-3 [77]), а также гибридного флуорофора родола (RO610 [78], НКОСІ-4 и

его производные [79]). Вызывает интерес стратегия одновременной регистрации нескольких типов окислителей, реализованная, например, в работе R. Zhang et al. [67] на примере зонда FHZ.

Наблюдается усложнение структуры зондов за счет введения дополнительных мишеней для увеличения селективности и/или чувствительности датчиков, а также более частое использование пар донор–акцептор для создания зондов типа “переключения”. Общая тенденция – разработка зондов с большим стоксовым сдвигом и регистрацией в ближнем инфракрасном диапазоне (альтернативно – зондов с возможностью двухфотонного возбуждения), совместимых с часто используемыми длинами волн лазерного излучения (например, 488, 640, 750 нм и др.) [32, 33].

Из представленных в данном обзоре новых малых молекулярных зондов (табл. S1 в дополнительных материалах), в зависимости от целей исследования и исходя из данных, указанных авторами статей, для регистрации HOCl подходят следующие зонды:

- 1) по используемому методу регистрации HOCl:
 - а) для конфокальной микроскопии – все указанные зонды;
 - б) для проточной цитометрии – НКОСI-3 [64], СВ [70–72], НКОСI-4г [79];
 - в) для исследования в суспензиях клеток с использованием спектрофлуориметра – НКОСI-3 [64], СВ [70–72];
 - г) для кинетических исследований образования HOCl (время реакции <1 мин) – все зонды, кроме BCO и BETC (время реакции не определено) [62], FN-1 и FN-2 [69], RT-1 [73], BR-O [74], BR-1 [75], Dcp-EPTz [88], EtS-DMAB [92], NSSN [93];
- 2) для регистрации продукции HOCl в клеточных органеллах:
 - а) в митохондриях – FHZ (в цитоплазме и митохондриях) [67], НКОСI-4м [79], соединение (VII) [84], NSSN [93];
 - б) в лизосомах – NDS [82], CR-Ly [87];
 - в) в эндоплазматическом ретикулуме – ER-NPA [83];
- 3) для регистрации образования HOCl:
 - а) *in vivo* – FHZ [67], BR-1 [75], BC-3 [77], RO610 [78], ER-NPA [83], FD-301 [89], NSSN [93];
 - б) в срезах тканей – НКОСI-4г [79], соединение (VIII) [90];
- 4) использование ближнего инфракрасного диапазона или режима двухфотонного возбуждения:
 - а) CSN – “переключение” из красной области спектра в синюю ($\lambda_{\text{исп}} = 470/640$ нм) [63], NSSN –

“переключение” из красной области спектра в желтую ($\lambda_{\text{исп}} = 540/670$ нм) [93];

б) возбуждение и испускание в красной области спектра – BR-O [74], BR-1 [75] и BC-3 [77] ($\lambda_{\text{возб}} = 610$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 670$ нм), FD-301 ($\lambda_{\text{возб}} = 620$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 686$ нм) [89];

в) BRT – “переключение” из синей области спектра в оранжевую с сохранением красной полосы ($\lambda_{\text{исп}} = 587/462$ нм) [85];

г) возможность использования двухфотонного возбуждения – соединение (VIII) ($\lambda_{\text{возб}} = 740$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 435$ нм) [90], ER-NPA ($\lambda_{\text{возб}} = 800$ нм; $\lambda_{\text{исп}} = 550$ нм) [83].

К настоящему времени коммерчески доступны для приобретения следующие зонды: НКОСI-3 (CAS 2031170-80-4), FHZ (CAS 1883737-63-0), СВ (CAS 1562-90-9), НКОСI-4 (CAS 2031170-85-9) и НКОСI-4м (CAS 2031170-88-2).

В 2016–2021 гг. был достигнут несомненный прогресс в разработке малых молекулярных флуоресцентных зондов, а также их применении для визуализации HOCl как *in vitro*, так и *in vivo*. Однако многие проблемы, связанные с чувствительностью и селективностью зондов, скоростью их реакции с HOCl (для кинетических исследований), малым стоксовым сдвигом, использованием органических растворителей, а также малой фотостабильностью остаются актуальными и сейчас. В связи с этим при выборе хемосенсора для практического применения необходимо обратить внимание на ту совокупность характеристик зонда, которая наиболее оптимально позволит решить конкретно поставленную перед экспериментатором задачу. Кроме того, очень небольшое количество разработанных хемосенсоров доступно к непосредственному приобретению, что вызывает дополнительные затруднения у исследователей, но вместе с тем открывает возможность и необходимость дальнейшего конструирования и синтеза новых зондов для регистрации HOCl.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б20P-215), Российского фонда фундаментальных исследований (грант 20-515-00006), гранта Президента Российской Федерации МД-1901.2020.4.

Описание зондов на основе феноксазина и некоторых других поддержано Российским научным фондом (грант 20-15-00390), для выполнения которого запланировано их использование.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований, проведенных авторами данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов изучения.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Alfadda A.A., Sallam R.M.* // J. Biomed. Biotechnol. 2012. V. 2012. P. 936486–936499. <https://doi.org/10.1155/2012/936486>
2. *Milkovic L., Cipak Gasparovic A., Cindric M., Mouthuy P.A., Zarkovic N.* // Cells. 2019. V. 8. P. 793–806. <https://doi.org/10.3390/cells8080793>
3. *Phaniendra A., Jestadi D.B., Periyasamy L.* // Indian J. Clin. Biochem. 2015. V. 30. P. 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
4. *Winterbourn C.C.* // Toxicology. 2002. V. 181. P. 223–227. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00286-X](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00286-X)
5. *Arnhold J.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 8057–8084. <https://doi.org/10.3390/ijms21218057>
6. *Panasenko O.M., Gorudko I.V., Sokolov A.V.* // Biochemistry (Mosc.). 2013. V. 78. P. 1466–1489. <https://doi.org/10.1134/S0006297913130075>
7. *Ulfig A., Leichert L.I.* // Cell. Mol. Life Sci. 2021. V. 78. P. 385–414. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03591-y>
8. *Pattison D.I., Davies M.J.* // Chem. Res. Toxicol. 2001. V. 14. P. 1453–1464. <https://doi.org/10.1021/tx0155451>
9. *Zhang L., Wang X., Cueto R., Effi C., Zhang Y., Tan H., Qin X., Ji Y., Yang X., Wang H.* // Redox Biol. 2019. V. 26. P. 101284–101299. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101284>
10. *Chen X., Tian X., Shin I., Yoon J.* // Chem. Soc. Rev. 2011. V. 40. P. 4783–4804. <https://doi.org/10.1039/C1CS15037E>
11. *Burns J.M., Cooper W.J., Ferry J.L., King D.W., DiMento B.P., McNeill K., Miller C.J., Miller W.L., Peake B.M., Rusak S.A., Rose A.L., Waite T.D.* // Aquat. Sci. 2012. V. 74. P. 683–734. <https://doi.org/10.1007/s00027-012-0251-x>
12. *Hu J.J., Ye S., Yang D.* // Isr. J. Chem. 2017. V. 57. P. 251–258. <https://doi.org/10.1002/ijch.201600113>
13. *Yudhistira T., Mulay S.V., Kim Y., Halle M.B., Churchill D.G.* // Chem. Asian J. 2019. V. 14. P. 3048–3084. <https://doi.org/10.1002/asia.201900672>
14. *Chan J., Dodani S.C., Chang C.J.* // Nat. Chem. 2012. V. 4. P. 973–984. <https://doi.org/10.1038/nchem.1500>
15. *Dong S., Zhang L., Lin Y., Ding C., Lu C.* // Analyst. 2020. V. 145. P. 5068–5089. <https://doi.org/10.1039/D0AN00645A>
16. *Zhang R., Song B., Yuan J.* // TrAC Trends Anal. Chem. 2018. V. 99. P. 1–33. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.11.015>
17. *Wan J., Zhang X., Zhang K., Su Z.* // Rev. Anal. Chem. 2020. V. 39. P. 209–221. <https://doi.org/10.1515/revac-2020-0119>
18. *Tholen D.W., Linnet K., Kondratovich M., Armbruster D.A., Garrett P.E., Jones R.L., Kroll M.H., Lequin R.M., Pankratz T.J., Scassellati G.A., Schimmel H., Tsai J.* // Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline. CLSI document EP17-A. CLSI, Wayne, PA, 2004. <https://demo.nextlab.ir/Organization/Documents/CLSI-Standards/CLSI-EP17-A.aspx>
19. *Long G.L., Winefordner J.D.* // Anal. Chem. Am. Chem. Soc. 1983. V. 55. P. 712A–724A. <https://doi.org/10.1021/ac00258a001>
20. *Ruff F., Szabó D., Rábai J., Jalsovszky I., Farkas Ö.* // J. Phys. Org. Chem. 2019. V. 32. P. e4005. <https://doi.org/10.1002/poc.4005>
21. *Lin W., Long L., Chen B., Tan W.* // Chemistry. 2009. V. 15. P. 2305–2309. <https://doi.org/10.1002/chem.200802054>
22. *Yue Y., Huo F., Yin C., Escobedo J.O., Strongin R.M.* // Analyst. 2016. V. 141. P. 1859–1873. <https://doi.org/10.1039/C6AN00158K>
23. *Bai X., Ng K.K.H., Hu J.J., Ye S., Yang D.* // Annu. Rev. Biochem. 2019. V. 88. P. 605–633. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111754>
24. *Bartosz G.* // Clin. Chim. Acta. 2006. V. 368. P. 53–76. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.12.039>
25. *Zhang Y.R., Liu Y., Feng X., Zhao B.X.* // Sens. Actuators B Chem. 2017. V. 240. P. 18–36. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.08.066>
26. *Winterbourn C.C.* // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1840. P. 730–738. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.004>
27. *Gao P., Pan W., Li N., Tang B.* // Chem. Sci. 2019. V. 10. P. 6035–6071. <https://doi.org/10.1039/C9SC01652J>
28. *Fu Y., Finney N.S.* // RSC Adv. 2018. V. 8. P. 29051–29061. <https://doi.org/10.1039/C8RA02297F>
29. *Cao D., Zhu L., Liu Z., Lin W.* // J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev. 2020. V. 44. P. 100371. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2020.100371>
30. *Jiao Y., Zhu B., Chen J., Duan X.* // Theranostics. 2015. V. 5. P. 173–187. <https://doi.org/10.7150/thno.9860>
31. *Yuan L., Lin W., Xie Y., Chen B., Song J.* // Chemistry. 2012. V. 18. P. 2700–2706. <https://doi.org/10.1002/chem.201101918>

32. Wang L., Du W., Hu Z., Uvdal K., Li L., Huang W. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2019. V. 58. P. 14026–14043.
<https://doi.org/10.1002/anie.201901061>
33. Andina D., Leroux J.C., Luciani P. // *Chemistry*. 2017. V. 23. P. 13549–13573.
<https://doi.org/10.1002/chem.201702458>
34. Cao D., Liu Z., Verwilt P., Koo S., Jangili P., Kim J.S., Lin W. // *Chem. Rev.* 2019. V. 119. P. 10403–10519.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00145>
35. Kenmoku S., Urano Y., Kojima H., Nagano T. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 7313–7318.
<https://doi.org/10.1021/ja068740g>
36. Koide Y., Urano Y., Hanaoka K., Terai T., Nagano T. // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. V. 133. P. 5680–5682.
<https://doi.org/10.1021/ja111470n>
37. Chen X., Lee K.A., Ha E.M., Lee K.M., Seo Y.Y., Choi H.K., Kim H.N., Kim M.J., Cho C.S., Lee S.Y., Lee W.J., Yoon J. // *Chem. Commun.* 2011. V. 47. P. 4373–4375.
<https://doi.org/10.1039/C1CC10589B>
38. Zhou J., Li L., Shi W., Gao X., Li X., Ma H. // *Chem. Sci.* 2015. V. 6. P. 4884–4888.
<https://doi.org/10.1039/C5SC01562F>
39. Bruno J.G., Herman T.S., Cano V.L., Stribling L., Kiel J.L. // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 1999. V. 35. P. 376–382.
<https://doi.org/10.1007/s11626-999-0111-8>
40. Adachi Y., Kindzelskii A.L., Petty A.R., Huang J.B., Maeda N., Yotsumoto S., Aratani Y., Ohno N., Petty H.R. // *J. Immunol.* 2006. V. 176. P. 5033–5040.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.8.5033>
41. Yang Y.K., Cho H.J., Lee J., Shin I., Tae J. // *Org. Lett.* 2009. V. 11. P. 859–861.
<https://doi.org/10.1021/ol802822t>
42. Zhang Z., Zheng Y., Hang W., Yan X., Zhao Y. // *Talanta*. 2011. V. 85. P. 779–786.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.04.078>
43. Zhang Z., Deng C., Meng L., Zheng Y., Yan X. // *Anal. Methods*. 2015. V. 7. P. 107–114.
<https://doi.org/10.1039/C4AY02281E>
44. Setsukinai K.I., Urano Y., Kakinuma K., Majima H.J., Nagano T. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 3170–3175.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M209264200>
45. Cohn C.A., Pedigo C.E., Hylton S.N., Simon S.R., Schoonen M.A. // *Geochem. Trans.* 2009. V. 10. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1186/1467-4866-10-8>
46. Flemmig J., Zschaler J., Remmler J., Arnhold J. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 27913–27923.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.364299>
47. Flemmig J., Schwarz P., Bäcker I., Leichsenring A., Lange F., Arnhold J. // *J. Immunol. Methods*. 2014. V. 415. P. 46–56.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.09.003>
48. Shepherd J., Hilderbrand S.A., Waterman P., Heinecke J.W., Weissleder R., Libby P. // *Chem. Biol.* 2007. V. 14. P. 1221–1231.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.10.005>
49. Xu Q., Lee K.A., Lee S., Lee K.M., Lee W.J., Yoon J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. V. 135. P. 9944–9949.
<https://doi.org/10.1021/ja404649m>
50. Sun Z.N., Liu F.Q., Chen Y., Tam P.K.H., Yang D. // *Org. Lett.* 2008. V. 10. P. 2171–2174.
<https://doi.org/10.1021/ol800507m>
51. Yang D., Sun Z.N., Peng T., Wang H.L., Shen J.G., Chen Y., Tam P.K.H. // *Live Cell Imaging / Ed. Papkovsky D.* Humana Press, 2010. V. 591. P. 93–103.
<https://doi.org/10.1007/978-1-60761-404-3>
52. Hu J.J., Wong N.K., Gu Q., Bai X., Ye S., Yang D. // *Org. Lett.* 2014. V. 16. P. 3544–3547.
<https://doi.org/10.1021/ol501496n>
53. Murao S.L., Stevens F.J., Ito A., Huberman E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85. P. 1232–1236.
<https://doi.org/10.1073/pnas.85.4.1232>
54. Gai L., Mack J., Liu H., Xu Z., Lu H., Li Z. // *Sens. Actuators B Chem.* 2013. V. 182. P. 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.02.106>
55. Emrulloğlu M., Üçüncü M., Karakuş E. // *Chem. Commun.* 2013. V. 49. P. 7836–7838.
<https://doi.org/10.1039/C3CC44463E>
56. Liu S.R., Wu S.P. // *Org. Lett.* 2013. V. 15. P. 878–881.
<https://doi.org/10.1021/ol400011u>
57. Long L., Zhang D., Li X., Zhang J., Zhang C., Zhou L. // *Anal. Chim. Acta*. 2013. V. 775. P. 100–105.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.03.016>
58. Zhang Y.R., Chen X.P., Zhang J.Y., Yuan Q., Miao J.Y., Zhao B.X. // *Chem. Commun.* 2014. V. 50. P. 14241–14244.
<https://doi.org/10.1039/C4CC05976J>
59. Wang L., Long L., Zhou L., Wu Y., Zhang C., Han Z., Wang J., Da Z. // *RSC Adv.* 2014. V. 4. P. 59535–59540.
<https://doi.org/10.1039/C4RA10633D>
60. Goswami S., Aich K., Das S., Pakhira B., Ghoshal K., Quah C.K., Bhattacharyya M., Fun H.K., Sarkar S. // *Chem. Asian J.* 2015. V. 10. P. 694–700.
<https://doi.org/10.1002/asia.201403234>
61. Liu Z., Li G., Wang Y., Li J., Mi Y., Guo L., Xu W., Zou D., Li T., Wu Y. // *RSC Adv.* 2018. V. 8. P. 9519–9523.
<https://doi.org/10.1039/C7RA13419C>
62. Jin L., Tan X., Zhao C., Wang Q. // *Anal. Methods*. 2019. V. 11. P. 1916–1922.
<https://doi.org/10.1039/C9AY00105K>
63. Shi L., Yu H., Zeng X., Yang S., Gong S., Xiang H., Zhang K., Shao G. // *New J. Chem.* 2020. V. 44. P. 6232–6237.
<https://doi.org/10.1039/D0NJ00318B>
64. Hu J.J., Wong N.K., Lu M.Y., Chen X., Ye S., Zhao A.Q., Gao P., Kao R.Y.-T., Shen J., Yang D. // *Chem. Sci.* 2016. V. 7. P. 2094–2099.
<https://doi.org/10.1039/C5SC03855C>
65. Chang C.Y., Song M.J., Jeon S.B., Yoon H.J., Lee D.K., Kim I.H., Suk K., Choi D.K., Park E.J. // *Am. J. Pathol.* 2011. V. 179. P. 964–979.
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.04.033>

66. Agrawal I., Sharma N., Saxena S., Arvind S., Chakraborty D., Chakraborty D.B., Jha D., Ghatak S., Epari S., Gupta T., Jha S. // *iScience*. 2021. V. 24. P. 101968–101978.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101968>
67. Zhang R., Zhao J., Han G., Liu Z., Liu C., Zhang C., Liu B., Jiang C., Liu R., Zhao T., Han M.Y., Zhang Z. // *J. Am. Chem. Soc.* 2016. V. 138. P. 3769–3778.
<https://doi.org/10.1021/jacs.5b12848>
68. Zhou Y., Wang Y.K., Wang X.F., Zhang Y.J., Wang C.K. // *Chin. Phys. B*. 2017. V. 26. P. 083102-1–083102-7.
<https://doi.org/10.1088/1674-1056/26/8/083102>
69. Lv J., Wang F., Wei T., Chen X. // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2017. V. 56. P. 3757–3764.
<https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b00381>
70. Козлов С.О., Кудрявцев И.В., Грудина Н.А., Костевич В.А., Панасенко О.М., Соколов А.В., Васильев В.Б. // *Acta Biomedica Scientifica*. 2016. Т. 1. С. 86–91.
https://doi.org/10.12737/article_590823a4895537.04307905
71. Sokolov A.V., Kostevich V.A., Kozlov S.O., Donskyi I.S., Vlasova I.I., Rudenko A.O., Zakharova E.T., Vasilyev V.B., Panasenko O.M. // *Free Radic. Res.* 2015. V. 49. P. 777–789.
<https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1017478>
72. Lutsenko V.E., Grigorieva D.V., Gorudko I.V., Cherenkevich S.N., Gorbunov N.N., Kostevich V.A., Panasenko O.M., Sokolov A.V. // *Med. Acad. J.* 2019. V. 19. P. 63–71.
<https://doi.org/10.17816/MAJ19263-71>
73. Choi M.G., Lee Y.J., Lee K.M., Park K.Y., Park T.J., Chang S.K. // *Analyst*. 2019. V. 144. P. 7263–7269.
<https://doi.org/10.1039/C9AN01884K>
74. Yang J., Yao Y., Shen Y., Xu Y., Lv G., Li C. // *ZAAC*. 2020. V. 646. P. 431–436.
<https://doi.org/10.1002/zaac.202000127>
75. Yang J., Zheng W., Shen Y., Xu Y., Lv G., Li C. // *J. Lumin.* 2020. V. 226. P. 117460–117466.
<https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2020.117460>
76. Hansra P., Moran E.L., Fornasier V.L., Bogoch E.R. // *Inflammation*. 2000. V. 24. P. 141–155.
<https://doi.org/10.1023/A:1007033610430>
77. Zheng W., Yang J., Shen Y., Yao Y., Lv G., Hao S., Li C. // *Dyes Pigments*. 2020. V. 179. P. 108404–108410.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108404>
78. Zhang Y., Ma L., Tang C., Pan S., Shi D., Wang S., Li M., Guo Y. // *J. Mater. Chem. B*. 2018. V. 6. P. 725–731.
<https://doi.org/10.1039/C7TB02862H>
79. Bai X., Yang B., Chen H., Shen J., Yang D. // *Org. Chem. Front.* 2020. V. 7. P. 993–996.
<https://doi.org/10.1039/D0QO00081G>
80. Li J., Yin C., Liu T., Wen Y., Huo F. // *Sens. Actuators B Chem.* 2017. V. 252. P. 1112–1117.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.07.171>
81. Liu C., Jiao X., He S., Zhao L., Zeng X. // *Talanta*. 2017. V. 174. P. 234–242.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.012>
82. Jiao C., Liu Y., Pang J., Lu W., Zhang P., Wang Y. // *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 2020. V. 392. P. 112399–112405.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.112399>
83. Yang T., Sun J., Yao W., Gao F. // *Dyes Pigments*. 2020. V. 180. P. 108435–108442.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108435>
84. Xu J., Wang C., Ma Q., Zhang H., Tian M., Sun J., Wang B., Chen Y. // *ACS Omega*. 2021. V. 6. P. 14399–14409.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.1c01271>
85. Liu Y., Zhao Z.M., Miao J.Y., Zhao B.X. // *Anal. Chim. Acta*. 2016. V. 921. P. 77–83.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.03.045>
86. Song G.J., Ma H.L., Luo J., Cao X.Q., Zhao B.X. // *Dyes Pigments*. 2018. V. 148. P. 206–211.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.09.022>
87. Meng H., Huang X.Q., Lin Y., Yang D.Y., Lv Y.J., Cao X.Q., Zhang G.X., Dong J., Shen S.L. // *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2019. V. 223. P. 117355–117360.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117355>
88. Zheng D., Qiu X., Liu C., Jiao X., He S., Zhao L., Zeng X. // *New J. Chem.* 2018. V. 42. P. 5135–5141.
<https://doi.org/10.1039/C8NJ00279G>
89. Liu L., Wei P., Yuan W., Liu Z., Xue F., Zhang X., Yi T. // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. P. 10971–10978.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04601>
90. Chen L., Park S.J., Wu D., Kim H.M., Yoon J. // *Dyes Pigments*. 2018. V. 158. P. 526–532.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.01.027>
91. Das S., Aich K., Patra L., Ghoshal K., Gharami S., Bhattacharyya M., Mondal T.K. // *Tetrahedron Lett.* 2018. V. 59. P. 1130–1135.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.02.023>
92. Sun J., Zhang L., Hu Y., Fang J. // *Sens. Actuators B Chem.* 2018. V. 266. P. 447–454.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.124>
93. Huang Y., Zhang Y., Huo F., Liu Y., Yin C. // *Dyes Pigments*. 2020. V. 179. P. 108387–108393.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108387>
94. Luo P., Zhao X. // *ACS Omega*. 2021. V. 6. P. 12287–12292.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.1c01102>
95. Wu D., Chen L., Xu Q., Chen X., Yoon J. // *Acc. Chem. Res.* 2019. V. 52. P. 2158–2168.
<https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00307>
96. Imaizumi N., Kanayama T., Oikawa K. // *Analyst*. 1995. V. 120. P. 1983–1987.
<https://doi.org/10.1039/AN9952001983>
97. Prütz W.A. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1996. V. 332. P. 110–120.
<https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0322>

Fluorescent Probes for HOCl Detection in Living Cells

V. E. Reut*, I. V. Gorudko*, D. V. Grigorieva*, A. V. Sokolov**, ***, and O. M. Panasenko***, #

#Phone: +7(499)246-44-90, e-mail: o-panas@mail.ru

*Belarusian State University, prosp. Nezavisimosti 4, Minsk, 220030 Belarus

**FGBNU "Institute of Experimental Medicine", ul. Academica Pavlova 12, St. Petersburg, 197376 Russia

***Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, ul. Malaya Pirogovskaya 1a, Moscow, 119435 Russia

Hypochlorous acid (HOCl) plays important role not only in immune system protecting the organism from pathogens, but also, due to its high reactivity, provokes the development and complication of many diseases. Therefore, the development of highly sensitive and selective for HOCl biosensors, including fluorescent probes, for better understanding the roles of HOCl in living systems, is of a great importance. Nevertheless, there are many difficulties, associated with HOCl registration in biological probes (chemo- and photostability, cytotoxicity, fluorescence and absorption characteristics, selectivity, sensitivity etc.). Thus, the development of new chemosensors has been relevant for many years. In this review, we describe classification of small molecular probes for HOCl detection in biological systems, as well as summarize results of the development of chemosensors, their photophysical properties, and biological applications. Particular attention is paid to the achievements in this area over 2016–2021 years. A number of problems related to design and application of small molecular probes were formulated. Due to the absence of a "gold standard" among the HOCl chemosensors, associated among others with the commercial unavailability or complex methods of synthesizing new sensors, some recommendations are given on the field of chemosensors application mentioned. Trends in the development of fluorescent chemosensors for HOCl visualization in living cells were outlined.

Keywords: fluorescence, fluorescent probes, reactive oxygen species, reactive halogen species, hypochlorous acid, chemosensors