
СИНТЕЗ І СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМІНЕСЦЕНТНІ ВЛАСТИВОСТІ НОВИХ АЛКІЛАМІНО-БЕТА- КЕТОЄНОЛЬНИХ СПОЛУК ТА МЕТАЛОКОМПЛЕКСІВ НА ЇХ ОСНОВІ ДЛЯ СТВОРЕННЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ ЗОНДІВ БІОМОЛЕКУЛ І ОПТИЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

В.І. Пехньо, В.Я. Черній, В.Б. Ковальська,
М.Ю. Лосицький, С.В. Черній, Я.М. Довбій, І.М. Третьякова

<https://doi.org/10.15407/akademperiodyka.444.053>

Флуоресцентна детекція є ефективним методом біологічних досліджень, призначеним для виявлення біополімерів, зокрема, нуклеїнових кислот, білків, та їх амілоїдних агрегатів (фібрил) як *in vitro* так і *in vivo* [1—3]. Амілоїдні фібрили є нерозчинними білковими агрегатами, які можуть утворюватися різними білками і поліпептидами і мають спільну структуру — складаються з β -складчастих ниток, скручених одна з одною [4]. Дослідження спонтанної агрегації білків є одним з актуальних завдань біомедичних досліджень, оскільки з нею пов'язано багато небезпечних захворювань людини, в тому числі й нейродегенеративних [5]. Крім участі в патологічних процесах, амілоїдні фібрили виконують важливі біологічні функції в бактеріальних клітинах [6, 7]. Амілоїдні фібрили широко вивчають і як компоненти для створення нових матеріалів, зокрема біомембран, гідрогелів та біосенсорів [8—11]. З літературних джерел [12—18] відомо, що флуоресцентні сполуки, наприклад тіофлавін, похідні куркуміну, ціанінові барвники, дають відгук при взаємодії з фібрилярними білками і використовуються для їх детекції.

Нами вперше запропоновано алкіламіно- β -кетоенольні барвники як флуоресцентні зонди, чутливі до амілоїдних фібрил [19]. Також встановлено, що позаплощинно координовані фталоціанінові комплекси [18, 20] можуть інгібувати процеси фібрилоутворення та змінювати морфологію кінцевих агрегатів білків.

Метою цієї науково-дослідної роботи є синтез і дослідження спектральної поведінки похідних дегідрасетової кислоти, фталоціанінових комплексів з позаплощинними лігандами на їх основі та алкіламіно- β -кетоенольних сполук у присутності білків та їх амілоїдних агрегатів.

Синтез похідних дегідрацетової кислоти як перспективних лігандів для створення нових координаційних сполук

Синтезовано барвники на основі похідних дегідрацетової кислоти (рис. 1) шляхом її взаємодії з кротоновим (L1), коричним (L2) та заміщеними ароматичними альдегідами (L3—L20). Одержані халкони являють собою гетероциклічні β-кетоенольні системи, що містять хелатний вузол та спряжений ненасичений ланцюг.

Будову одержаних сполук підтверджено даними ПМР-спектрів, у яких наявні характеристичні піки протонів ОН-груп β-кетоенольного фрагмента в області 17,3—18,6 м.ч.; СН-протона піранового циклу в області 5,9—6,3 м.ч., протонів метильної групи в області 2,25—2,30 м.ч. та інших характеристичних сигналів. Слід зауважити, що всі характеристичні сигнали піранового гетероциклу перебувають в одній області, незалежно від ароматичних замісників. Сигнали СН-протона піранового гетероциклу при переході від дейтерохлороформу до дейтеродиметилсульфоксиду змі-

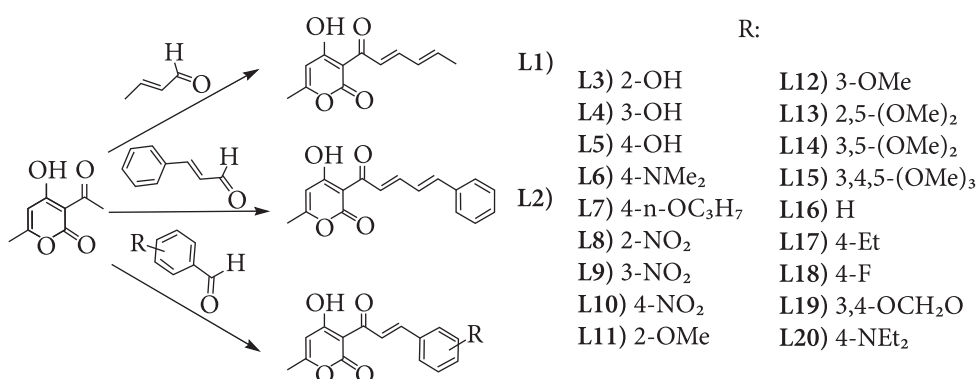


Рис. 1. Синтезовані барвники на основі похідних дегідрацетової кислоти

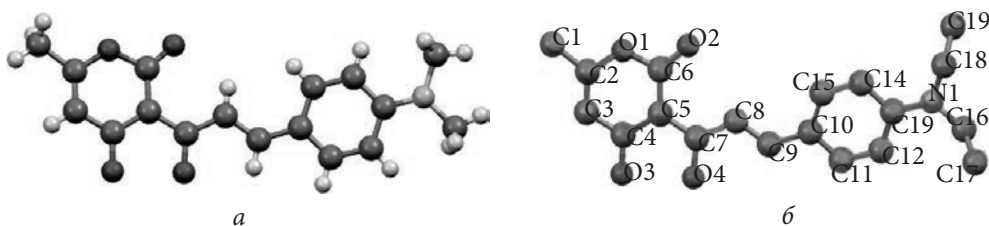


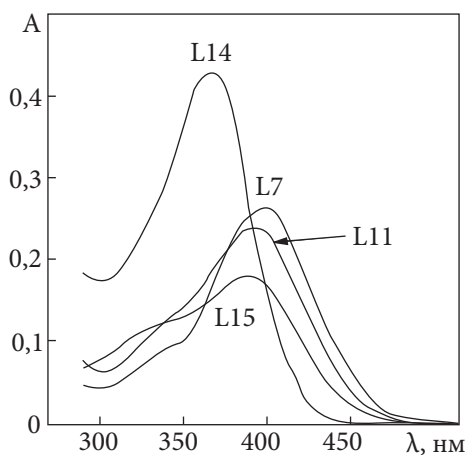
Рис. 2. Будова халконів (E)-3-(3-(4-(диметиламіно)феніл)акрилоїл)-4-гідрокси-6-метил-2H-піран-2-ону L6 (a) і (E)-3-(3-(4-(діетиламіно)феніл) акрилоїл)-4-гідрокси-6-метил-2H-піран-2-ону L20 (б)

Рис. 3. ЕСП конденсованих похідних дегідррацетової кислоти в толуолі

щуються приблизно на 0,3 м.ч. в область сильного поля. Характерним при переході від дейтерохлороформу до дейтеродиметилсульфоксиду є також уширення сигналу ОН-протона β -кетоенольного фрагмента.

Будову халконів **L6**, **L20** підтверджено також методом рентгенівської дифракції (рис. 2). За даними рентгеноструктурного аналізу (РСА) обидва халкони являють собою пласкі молекули, в яких арильний фрагмент розташований у *транс*-положенні відносно піранового гетероциклу. Протон β -кетоенольного фрагмента утворює шестичленний цикл за рахунок внутрішньомолекулярного водневого зв'язку.

Усі отримані сполуки є забарвленими і поглинають світло у видимій ділянці спектра в діапазоні 300—450 нм. Акцепторні замісники в ароматичному ядрі, такі як нітрогрупа, фтор, зсувають максимум поглинання в синю область; донорні замісники, наприклад диметил-, діетиламіногрупи, — у червону область. Типові електронні спектри поглинання (ЕСП) наведено на рис. 3.



Синтез алкіламіно- β -кетоенольних сполук

Синтез алкіламіно- β -кетоенолів ((2E, 5Z, 7E, 9E)-6-гідрокси-2-(алкіламіно)-10-фенілдека-2,5,7,9-тетраен-4-онів) (рис. 4) відбувається при взаємодії конденсованих похідних дегідррацетової кислоти з аліфатичними амінами шляхом розмикання піранового циклу халконів, хелатуючий фрагмент при цьому зберігається.

Механізм цієї реакції вивчався в дослідженнях [21, 22]. Вона відбувається через нуклеофільну атаку 6-вуглецевого атома піранового циклу, що приводить до його розмикання та декарбоксілювання. Нами виявлено, що на першому етапі цієї реакції взаємодія 4-гідрокси-6-метил-3-((2E,4E)-5-фенілпента-2,4-дієоіл-2H-піран-2-ону з амінами приводить до утворення відповідних солей. При нагріванні вони дисоціюють і одночасно аміногрупа атакує атом вуглецю метильної групи в пірановому кільці, що спричиняє його розмикання та наступне декарбоксілювання [21, 22]. У випадку *n*-алкіламінів утворення відповідних солей, розкриття кільця та декарбоксілювання відбувається досить легко, але ізоаміни реагують значно гірше і потребують більш високої температури реакції.

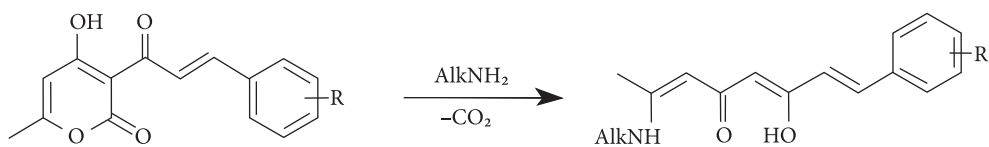


Рис. 4. Схема синтезу алкіламіно- β -кетоенолів (2E, 5Z, 7E, 9E)-6-гідрокси-2-(алкіламіно)-10-фенілдека-2,5,7,9-тетраєн-4-онів

Встановлено залежність перебігу цієї реакції від будови аліфатичного аміну. Так, при взаємодії конденсованих похідних дегідрасетової кислоти з третбутиламіном реакція зупиняється на стадії утворення третбутиламінової солі похідних дегідрасетової кислоти, розмикання піранового циклу не відбувається. Менш стерично ускладнені аміни утворюють кінцеві продукти з виходами близько 60 %.

Будову всіх одержаних сполук (рис. 5) встановлено методами ІЧ-, ЯМР- та хромато-мас-спектрометрії. ІЧ-спектри мають типовий вигляд для кетоенольних форм β -дикетонів, у них присутні смуги коливань ОН-груп в області 3000 см^{-1} , валентних коливань карбонільної С=О-групи, що знаходиться в кон'югації з подвійним вуглець—вуглецевим (С=С) зв'язком. За даними ^1H ЯМР- та хромато-мас-спектрометрії з'ясовано, що ці сполуки

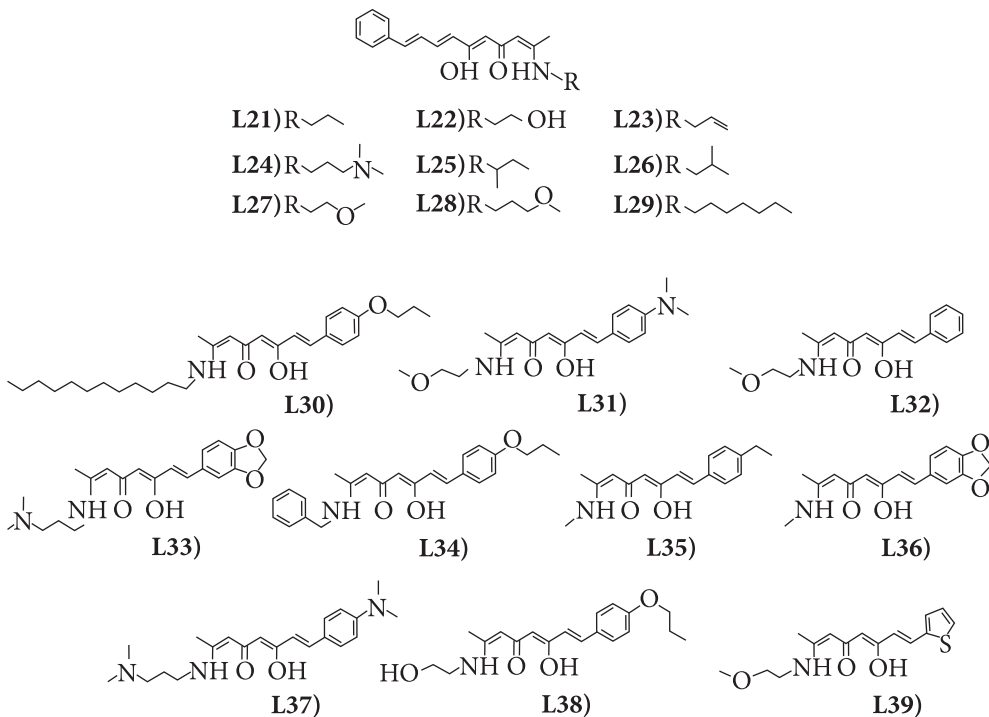


Рис. 5. Структури досліджуваних сполук

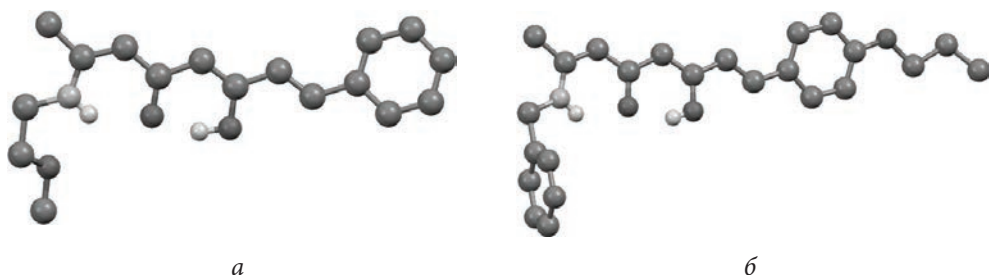


Рис. 6. Кристалічна будова алкіламіно- β -кетоенолів: (2E,5Z,7E)-6-гідрокси-2-(2-метоксигетиламіно)-8-фенілокта-2,5,7-триєн-4-он (**L32**) (а), та (2E,5Z,7E)-2-(бензиламіно)-6-гідрокси-8-(4-пропоксифеніл)-окта-2,5,7-триєн-4-он (**L34**) (б)

в розчині перебувають у двох ізомерних формах. Аналіз інтегральних інтенсивностей лабільних протонів у ПМР-спектрах не дає змоги одержати точні результати щодо співвідношення таутомерів у розчині, проте для серії (2E,5Z,7E,9E)-6-гідрокси-2-(алкіламіно)-10-фенілдека-2,5,7,9-тетраєн-4-онів нами було встановлено їх приблизне співвідношення від 70:30 у дейтерохлороформі до 90:10 у ДМСО та $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$.

Будову двох алкіламіно- β -кетоенолів визначено методом РСА (рис. 6).

Ці сполуки кристалізуються у вигляді жовтих пластин у моноклінній кристалічній ґратці (просторова група $P2_1/n$), мають планарне розташування полієнового ланцюга та фрагмента β -кетоенолу, що кон'югований з ароматичним кільцем. Планарна конфігурація β -кетоенольної групи також стабілізується Н-зв'язками між гідрокси- і кетогрупами. Аналогічно, водневий зв'язок існує між аміно- і кето групою. β -Кетоенольний фрагмент подібний до класичних β -кетоенолів. Довжини поліметинового ланцюга, природа замісників в ароматичній та аліфатичній частині молекули істотно не впливають на розміри та геометрію алкіламіно- β -кетоенолятного фрагмента. Приблизно рівні довжини зв'язків, відстані між атомами та кути свідчать про те, що всі ці сполуки мають подібні хелатуючі властивості.

Комплекси фталоціанінів цирконію і гафнію з позаплощинно координованими халконами й алкіламіно- β -кетоенолами та їх спектральні характеристики

Синтез нових сполук з розширеним спектром поглинання має як науковий, так і практичний інтерес, оскільки речовини, які здатні поглинати світло в ультрафіолетовій та видимій областях, можуть застосовуватися в різних пристроях (наприклад, сонячних елементах). Раніше нами було отримано фталоціаніни цирконію і гафнію з позаплощинно координованою дегідрацетовою кислотою [23]. Наявність хелатуючого фрагмента в халконах на основі дегідрацетової кислоти (**L1—L20**) та в молекулах

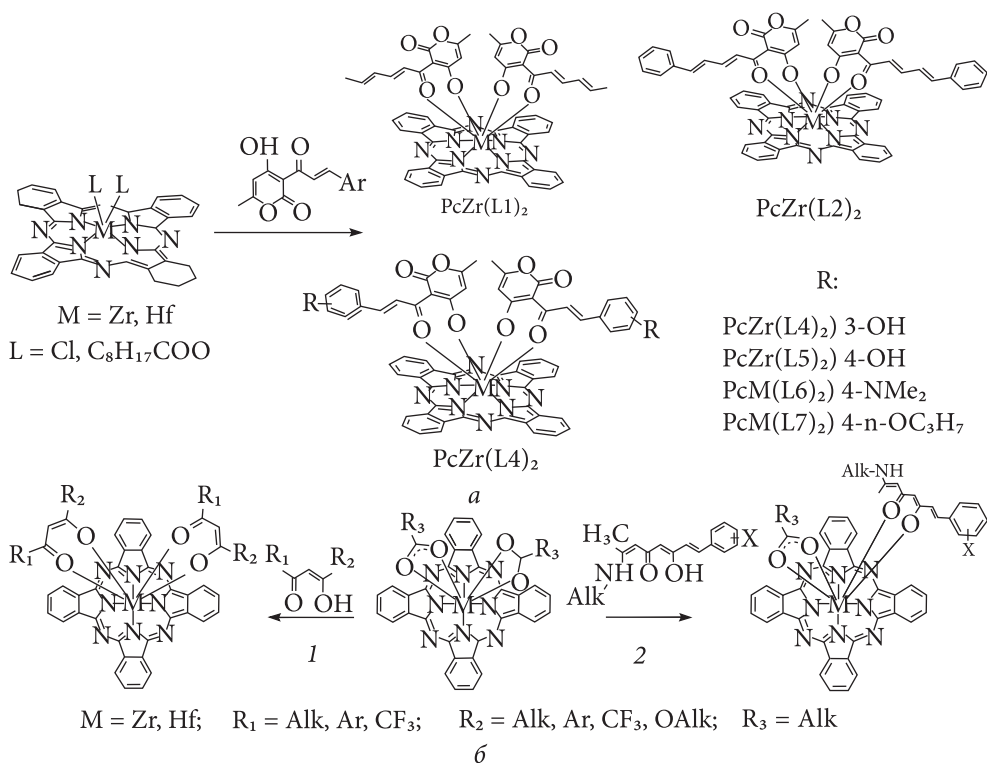


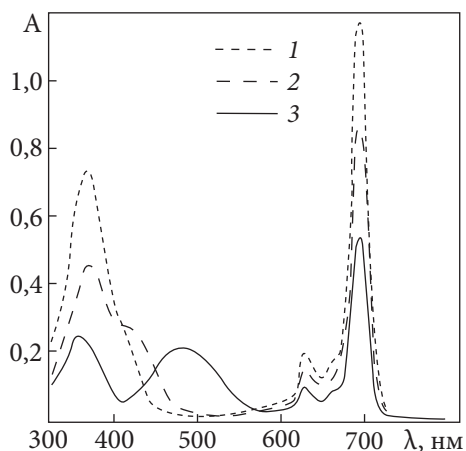
Рис. 7. Схема отримання фталоціанінових комплексів цирконію та гафнію з позаплощинно координуваними халконами (а) та схема реакції обміну карбоксилатних лігандів фталоціанінів цирконію та гафнію на β-дикарбонільні (б, (1)) та алкіламіно-β-кетоенолатні (б, (2))

алкіламіно-β-кетоенолів (L21—L39) дала можливість отримати фталоціанінові комплекси цирконію та гафнію з ними (рис. 7а). Раніше нами було встановлено, що взаємодія біс-карбоксилатних комплексів фталоціанінів цирконію та гафнію з β-дикарбонільними сполуками приводить до утворення біс-заміщених комплексів (рис. 7б (1)) [24]. Проте при дослідженні реакції лігандного обміну біс-карбоксилатних комплексів фталоціанінів цирконію та гафнію з алкіламіно-β-кетоенолами отримано змішанолігандні карбоксилато-дикетонатні комплекси фталоціанінів цирконію та гафнію (рис. 7б (2)) [19]. Склад та будову отриманих комплексів встановлено методом ¹H ЯМР та мас-спектрометрії ESI.

В електронних спектрах поглинання фталоціанінових комплексів цирконію та гафнію з позаплощинно координуваними халконами присутні смуги поглинання, характерні для фталоціанінових сполук: смуга Sore в області 350 нм і Q-смуги при 690 нм (рис. 8). Введення позаплощинних лігандів приводить до певних змін в ЕСП комплексів. Смуга Sore у спектрі комплексу

Рис. 8. ЕСП фталоціанінових комплексів цирконію з похідними дегідрацетової кислоти в толуолі: 1 — PcZr(L17)_2 ; 2 — PcZr(L7)_2 ; 3 — PcZr(L6)_2

PcZr(L7)_2 має плече з максимумом близько 400 нм, яке відповідає поглинанню ліганду **L7**. У спектрі PcZr(L17)_2 суперпозиція зі смугою поглинання позаплощинного ліганду **L17** приводить до зростання інтенсивності та довгохвильового зсуву максимуму смуги *Sore* фталоціанінової системи. В ЕСП комплексу PcZr(L6)_2 спостерігається інтенсивна смуга поглинання ліганду у видимій області 400—550 нм (рис. 8). Застосування методу розкладання спектральних смуг на гаусові компоненти дозволило розрізнити максимуми поглинання лігандів у комплексах. Смути поглинання лігандів у більшості комплексів батохромно зміщені на 20—40 нм порівняно зі смугами поглинання вільного ліганду.



Спектри поглинання фталоціанінових комплексів цирконію та гафнію з алкіламіно- β -кетоенолами подібні до описаних вище комплексів з халконами, смуга, пов'язана з поглинанням β -кетоенольного ліганду, знаходиться в області 440 нм. Спектри флуоресценції характеризуються максимумом на 685—688 нм, який відповідає випромінюванню фталоціанінового макроциклу, тоді як випромінювання β -кетоенольного ліганду не спостерігається.

Спектрально-люмінесцентні властивості вільних алкіламіно- β -кетоенолів та в присутності нативних і фібрилярних білків

Одним з найзручніших методів аналізу біомолекул є використання нековалентних флуоресцентних зондів, які підвищують інтенсивність випромінювання в присутності молекул-мішеней. Нами досліджено можливість використання алкіламіно- β -кетоенольних сполук як зондів для детекції амілоїдних агрегатів білків [19]. Для встановлення флуоресцентного відгуку алкіламіно- β -кетоенольних барвників на основі коричневого альдегіду (**L21**—**L29**) на наявність амілоїдних агрегатів було досліджено спектральну поведінку цих барвників у буферному розчині в присутності амілоїдогенних білків інсуліну та лізоциму у фібрилярній формі. Отримані дані наведено в табл. 1.

Максимуми збудження досліджених барвників у вільному стані знаходяться в межах 414—427 нм, а максимуми випромінювання — в діапазоні

500—554 нм. Вони показують дуже слабку флуоресценцію (інтенсивність випромінювання 0,8—10,9 в.о.), а її підвищення в присутності нативних білків не перевищує 10 разів. Додавання інсуліну або лізоциму може приводити до зсуву максимумів спектра збудження та емісії як до більш довгих, так і до коротших довжин хвиль до 35 нм. Максимуми збудження в присутності білків знаходяться в межах 405—428 нм відповідно, тоді як положення максимумів випромінювання — 510—571 нм. Така поведінка характерна як для похідних (2E,5Z,7E,9E)-6-гідрокси-2-(алкіламіно)-10-фенілдека-2,5,7,9-тетраен-4-онів, так і для (2E,5Z,7E)-6-гідрокси-8-феніл-2-(алкіламіно)окта-2,5,7-тріен-4-онів.

Для більшості досліджених алкіламіно- β -кетоенольних барвників додавання фібрилярних білків приводить до зсуву максимуму збудження та випромінювання до 28 нм у короткохвильову або довгохвильову ділянку спектра. Присутність фібрилярних білків приводить до підвищення інтенсивності флуоресценції барвника порівняно як з вільним барвником, так і з барвником у присутності нативних білків (рис. 9).

Найбільше зростання інтенсивності випромінювання в присутності фібрилярного інсуліну спостерігалось для барвників **L21** і **L22** (у 47 та 75 разів відповідно), що містять «короткі» нерозгалужені пропіламіно- і гідрокси-

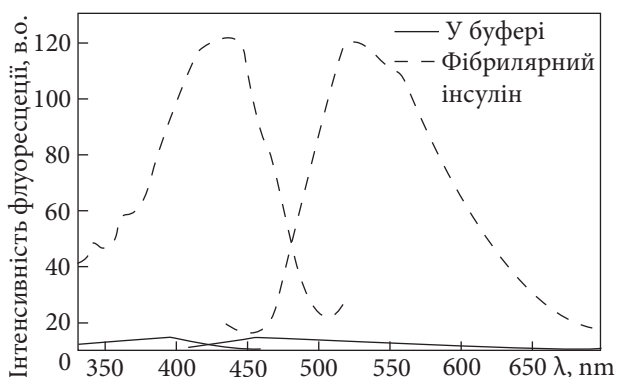
Т а б л и ц я 1

Спектрально-люмінесцентні властивості алкіламіно- β -кетоенольних барвників у водному буфері та у присутності фібрилярних (агрегованих) білків

Сполука	Барвник						
	Вільний			З фібрилярним інсуліном		З фібрилярним лізоцимом	
	λ_{ex} , нм	λ_{em} , нм	I_0 , в.о.	λ_{em} , нм	I^F , в.о.	λ_{em} , нм	I^F , в.о.
L21	427	542	1,7	528	80	517	10
L22	426	539	1,3	531	97	540	37
L23	415	545	2,6	528	49,7	532	5,9
L24	414	523	0,8	524	25	522	27,7
L25	417	554	5,5	528	20,9	543	8,5
L26	407	500	4,1	535	17	555	9,2
L27	415	535	3	525	45,8	526	22,7
L28	418	518	3	537	89	517	10
L29	413	549	10,9	538	16,7	532	15,8

λ_{ex} — найбільш довгохвильовий максимум спектра збудження флуоресценції; λ_{em} — максимум спектра емісії; I_0 , I^F — флуоресценція вільного барвника та в присутності амілоїдних фібрил, відповідно.

Рис. 9. Спектри збудження (ліворуч) та випромінювання флуоресценції (праворуч) барвника **L22** ((2E,5Z,7E,9E)-6-гідрокси-2-((2-гідроксиетил)аміно)-10-фенілдека-2,5,7,9-тетраєн-4-он) у TRIS-HCl буфері (суцільна крива) та в присутності фібрилярного інсуліну (пунктирна крива)



етиламіногрупи, а також для барвника **L28** (у 30 разів) з метоксипропіламіногрупою. Величина квантового виходу флуоресценції для барвників **L22** і **L24** у присутності фібрилярного інсуліну становить 12 та 15 % відповідно.

Було визначено також флуоресцентні властивості алкіламіно- β -кетоенольних барвників з похідними заміщених бензальдегідів (**L30**—**L39**) в присутності фібрилярного інсуліну (табл. 2). Так (2Z,5Z,7E)-8-(4-(диметиламіно)феніл)-6-гідрокси-2-((2-метоксиетил)аміно)окта-2,5,7-трієн-4-он (**L31**) по-

Т а б л и ц я 2

Спектрально-люмінесцентні властивості алкіламіно- β -кетоенольних барвників у присутності нативного і фібрилярного інсуліну

Сполука	Барвник						
	Вільний		З нативним інсуліном		З фібрилярним інсуліном		
	$\lambda_{em}(\lambda_{ex})$, нм	I_0 , в.о.	$\lambda_{em}(\lambda_{ex})$, нм	I^N , в.о.	$\lambda_{em}(\lambda_{ex})$, нм	I^F , в.о.	I^F / I^N
L30	539 (381)	7,2	520 (382)	8	507 (382)	10	1,2
L31	550 (424)	2,8	533 (415)	3,2	540 (458)	172	54
L32	503 (400)	<1	498 (401)	<1	500 (414)	18	>18
L33	507 (362)	<1	492 (364)	1,7	495 (421)	59	35
L34	512 (408)	29	510 (400)	23	500 (418)	80	3,5
L35	496 (414)	2	496 (417)	4	497 (417)	50	13
L36	505 (414)	<1	514 (414)	<1	500 (419)	36	>36
L37	529 (405)	3,1	524 (408)	3,4	552 (456)	76	22
L38	508 (400)	<1	499 (406)	<1	495 (427)	59	>59
L39	512 (414)	<1	514 (414)	<1	514 (424)	19	>19

λ_{ex} — найбільш довгохвильовий максимум спектра збудження флуоресценції; λ_{em} — максимум спектра емісії; I_0 , I^N , I^F — флуоресценція вільного барвника в присутності нативного та фібрилярного інсуліну, відповідно.

**Квантовий вихід флуоресценції вибраних вільних барвників
і в присутності фібрилярного інсуліну**

Сполука	Вільний барвник, %	З фібрилярним інсуліном, %	Сполука	Вільний барвник, %	З фібрилярним інсуліном, %
L31	0,52	47	L37	0,49	30
L32	0,04	28	L38	0,15	38

казав ефективність на рівні Тіофлавіну Т, який використовується як «золотий стандарт» для детекції амілоїдних фібрил.

Квантові виходи флуоресценції в присутності фібрилярного інсуліну для найбільш ефективних барвників є досить високими і становлять 28—47 % (табл. 3).

Отже, в роботі синтезовано серію халконів та алкіламіно- β -кетоенольних барвників на основі дегідрацетової кислоти. Встановлено їх індивідуальність та досліджено фізико-хімічні властивості. Будову сполук **L6**, **L20**, **L32**, **L34** встановлено методом РСА. Отримано низку фталоціанінових комплексів цирконію та гафнію з цими β -кетоенольними лігандами, досліджено їх спектрально-люмінесцентні властивості. Встановлено, що одержані комплекси здатні поглинати світло в широкому спектральному діапазоні від 300 до 700 нм.

Досліджено низку нових функціоналізованих (2Z,5Z,7E)-6-гідрокси-2-(алкіламіно)-8-арилокта-2,5,7-триєн-4-онів як зондів для флуоресцентного виявлення амілоїдних агрегатів білків. Хімічні переваги цих барвників полягають в тому, що їх можна отримати з недорогих, доступних вихідних сполук за досить простою двостадійною методикою, яка не потребує процедури хроматографічного розділення. Залежно від природи замісників ці барвники можуть збільшувати інтенсивність випромінювання в десятки разів за наявності фібрилярних агрегатів, але вони практично не чутливі до нативних білків. Досліджені барвники мають зелено-жовту емісію в області 495—540 нм. Для найбільш ефективною сполуки **L31** квантовий вихід флуоресценції при зв'язуванні з фібрилами інсуліну досягає 47 %, тоді як для вільного барвника ця величина становить близько 0,5 %. За своїми сенсорними властивостями цей барвник перевершує властивості Тіофлавіну Т, який є стандартом для детекції амілоїдних фібрил. Отже, алкіламіно- β -кетоенольні барвники є перспективними як флуоресцентні зонди для виявлення β -складчастих білкових агрегатів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Hawe A., Sutter M., Jiskoot W. Extrinsic fluorescent dyes as tools protein characterization. *Pharm. Res.* 2008. Vol. 25, No. 7. P. 1487—1499.
2. Tokar V.P., Losytskyy M.Yu., Ohulchansky T.V., Kryvorotenko D.V., Kovalska V.B., Balanda A.O., Dmytruk I.M., Prokopets V.M., Yarmoluk S.M., Yashchuk V.M. Styryl dyes as two-photon excited fluorescent probes for DNA detection and two-photon laser scanning fluorescence microscopy of living cells. *J. Fluoresc.* 2010. Vol. 20, No. 4. P. 865—872.
3. Yarmoluk S.M., Kovalska V.B., Volkova K.D. Optimized Dyes for Protein and Nucleic Acid Detection. In: Wolfbeis O., Demchenko A. (eds) *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology*. III. Springer Series on Fluorescence (Methods and Applications). Vol. 113. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. P. 161—199.
4. Sunde M., Serpell L.C., Bartlam M., Fraser P.E., Pepys M.B., Blake C.C. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J. Mol. Biol.* 1997. Vol. 273, No. 4. P. 729—739.
5. Ang E.-T., Tai Y.-K., Lo S.-Q., Seet R., Soong T.-W. Neurodegenerative diseases: exercising towards neurogenesis and neuroregeneration. *Front. Aging Neurosci.* 2010. Vol. 2. P. 25.
6. Jackson M., Hewitt E. Why are Functional Amyloids Non-Toxic in Humans? *Biomolecules.* 2017. Vol. 7, No. 4. P. E71.
7. Hewetson A., Do H. Q., Myers C., Muthusubramanian A., Sutton R.B., Wylie B.J., Cornwall G.A. Functional Amyloids in Reproduction. *Biomolecules.* 2017. Vol. 7, No. 4. P. E46.
8. Wei G., Su Z., Reynolds N.P., Reynolds P., Arosio P., Hamley I.W., Gazit E., Mezzenga R. Self-assembling peptide and protein amyloids: from structure to tailored function in nanotechnology. *Chem. Soc. Rev.* 2017. Vol. 46, No. 15. P. 4661—4708.
9. Romero D., Aguilar C., Losick R., Kolter R. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. Vol. 107, No. 5. P. 2230—2234.
10. Li C.X., Adamcik J., Mezzenga R. Biodegradable nanocomposites of amyloid fibrils and graphene with shape-memory and enzyme-sensing properties. *Nat. Nanotechnol.* 2012. Vol. 7, No. 7. P. 421—427.
11. Jacob R.S., Ghosh D., Singh P.K. et al. Self healing hydrogels composed of amyloid nano fibrils for cell culture and stem cell differentiation. *Biomaterials.* 2015. Vol. 54, No. 5. P. 97—105.
12. Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal. Biochem.* 1989. Vol. 177, No. 2. P. 244—249.
13. Klunk W., Wang Y., Huang G. Uncharged thioflavin-T derivatives bind to amyloid-beta protein with high affinity and readily enter the brain. *Life Sci.* 2001. Vol. 69, No. 13. P. 1471—1484.
14. Schmidt M., Schuck T., Sheridan S. The fluorescent congo red derivative, trans,trans)-1-bromo-2,5-bis-(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styrylbenzene (BSB), labels diverse beta-pleated sheet structures in postmortem human neurodegenerative disease brains. *Am. J. Pathol.* 2001. Vol. 159, No. 3. P. 937—943.
15. Volkova K., Kovalska V., Inshin D. Novel fluorescent trimethine cyanine dye 7519 for amyloid fibril inhibition assay. *Biotech. Histochem.* 2011. Vol. 86, No. 3. P. 188—191.
16. Kovalska V., Losytskyy M., Tolmachev O. Yu., Slominskii L., Segers-Nolten G.M.J., Subramaniam V., Yarmoluk S.M. Tri- and pentamethine cyanine dyes for fluorescent detection of a-synuclein oligomeric aggregates. *J. Fluoresc.* 2012. Vol. 22, No. 6. P. 1441—1448.

17. Volkova K., Losytsky M., Fal K.O., Derevyanko N.O., Slominskii Yu.L., Tolmachev O.I., Yarmoluk S.M. Hydroxy and methoxy substituted thiocarbocyanines for fluorescent detection of amyloid formation. *J. Fluoresc.* 2011. Vol. 21, No. 2. P. 775—784.

18. Kovalska V., Losytsky M., Chernii V., Volkova K., Tretyakova I., Cherepanov V., Yarmoluk S., Volkov S. Studies of anti-fibrillogenic activity of phthalocyanines of zirconium containing out-of-plane ligands. *Bioorg. Med. Chem.* 2012. Vol. 20, No. 1. P. 330—334.

19. Kovalska V., Chernii S., Losytsky M., Dovbii Y., Tretyakova I., Czerwieńiec R., Chernii V., Yarmoluk S., Volkov S. β -ketoenole dyes: Synthesis and study as fluorescent sensors for protein amyloid aggregates. *Dyes Pigments.* 2016. Vol. 132, No. 9. P. 274—281.

20. Kovalska V., Cherepanov V., Losytsky M., Chernii S., Senenko A., Chernii V., Tretyakova I., Yarmoluk S., Volkov S. Anti-fibrillogenic properties of phthalocyanines: Effect of the out-of-plane ligands. *Bioorg. Med. Chem.* 2014. Vol. 22, No. 24. P. 6918—6923.

21. Ait-Baziz N., Rachedi Y., Hamdi M., Silva A.M.S., Balegroune F., Thierry R., Sellier N. 4-Hydroxy-6-methyl-3-(5-phenyl-2E,4E-pentadien-1-yl)-2H-pyran-2-one: Synthesis and Reactivity with Amines. *J. Heterocycl. Chem.* 2004. Vol. 35, No. 4. P. 587—591.

22. Chergui D., Hamdi M., Baboulene M. Reactivity of 3-Cinnamoyl-2-pyrone Towards Primary Amines. *J. Heterocycl. Chem.* 1987. Vol. 18. P. 1721—1724.

23. Черний В.Я., Довбий Я.М., Третьякова И.Н., Волков С.В. Синтез и свойства фталоцианиновых комплексов циркония и гафния с дегидрацетовой кислотой. *Укр. хим. журн.* 2015. Т. 81, № 1. С. 3—7.

24. Tomachynski L.A., Tretyakova I.N., Chernii V.Ya., Volkov S., Kovalska V., Legendziewicz J., Gerasymchuk Yu., Radzki S. Synthesis and spectral properties of Zr(IV) and Hf(IV) phthalocyanines with β -diketonates as axial ligands. *Inorg. Chim. Acta.* 2008. Vol. 361. P. 2569—2581.