

ISSN 1561-8331 (Print)

ISSN 2524-2342 (Online)

ФІЗИЧНАЯ ХІМІЯ
PHYSICAL CHEMISTRY

УДК 535.37+547.97

<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2025-61-2-95-104>

Поступила в редакцию 11.03.2025

Received 11.03.2025

Ф. Фань¹, В. А. Поводайло², А. П. Кадуцкий¹, Г. В. Малеев³, В. В. Шманай¹

¹*Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь*

²*Институт физики имени Б. И. Степанова Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь*

³*Институт физиологически активных веществ Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук (ИФВ РАН),
Московская область, Черноголовка, Россия*

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
ЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ В СОСТАВЕ КОНЬЮГАТОВ С ДНК**

Аннотация. Цианиновые красители – один из наиболее часто используемых классов флуоресцентных красителей. Все Cy5 флуоресцируют на длине волны около 660 нм, а Cy7 – в ближнем инфракрасном диапазоне длин волн (700–900 нм), что делает их предпочтительными для биологических исследований, так как в этой области почти отсутствует фоновая флуоресценция клеток. Интенсивность флуоресценции цианиновых красителей часто изменяется после конъюгации с биомолекулами, в том числе с нуклеиновыми кислотами. Кроме того, она может существенно изменяться в результате образования дуплекса модифицированной красителем одноцепочечной ДНК с комплементарной последовательностью. Исследованы физико-химические свойства ряда производных красителей Cy5 и Cy7 с заместителями разной длины в различных положениях молекул в составе конъюгатов с одноцепочечной и двухцепочечной ДНК.

Ключевые слова: цианиновые красители, ДНК, квантовый выход, флуоресценция, клик-реакция

Для цитирования. Физико-химические свойства новых производных цианиновых красителей в составе конъюгатов с ДНК / Ф. Фань, В. А. Поводайло, А. П. Кадуцкий [и др.] // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук. – 2025. – Т. 61, № 2. – С. 95–104. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2025-61-2-95-104>

F. Fan¹, V. A. Povedailo², A. P. Kadutskii¹, G. V. Maleev³, V. V. Shmanai¹

¹*Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

²*B. I. Stepanov Institute of Physics, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

³*Institute of Physiologically Active Compounds at Federal Research Center of Problems of Chemical Physics
and Medicinal Chemistry of Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Russia*

PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF NEW CYANINE DYE DERIVATIVES IN DNA CONJUGATES

Abstract. Cyanine dyes are one of the most commonly used classes of fluorescent probes. All Cy5 fluoresce at ~ 660 nm, while Cy7 emit in the near-infrared range (700–900 nm), making them particularly suitable for biomedical applications due to reduced tissue autofluorescence in this spectral region. The fluorescence intensity of cyanine dyes typically increases upon conjugation with biomolecules such as nucleic acids. Furthermore, their fluorescence can be significantly modulated through duplex formation between dye-modified single-stranded DNA and its complementary sequence. In this study, we investigated physicochemical properties of a series of Cy5 and Cy7 derivatives with substituents of varying lengths at distinct molecular positions in both single- and double-stranded DNA conjugates.

Keywords: cyanine dyes, DNA, quantum yield, fluorescence, click-reaction

For citation. Fan F., Povedailo V. A., Kadutskii A. P., Maleev G. V., Shmanai V. V. Physicochemical properties of new cyanine dye derivatives in DNA conjugates. *Vestsi Natsyyanal'най akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2025, vol. 61, no. 2, pp. 95–104 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2025-61-2-95-104>

Введение. Цианиновые красители широко используются для флуоресцентного мечення биомолекул, изучения структуры нуклеиновых кислот [1–5], изучения взаимодействия между белками и ДНК [6–8], в составе ДНК-зондов [9], для визуализации внутри организма [10–12] и в других приложениях.

Молекулы индоцианиновых красителей состоят из двух соединенных сопряженным полиметиновым мостиком фрагментов индола, которые могут содержать заместители. Распространенными индоцианиновыми красителями являются триметилцианины (Cy3), пентаметилцианины (Cy5) и гептаметилцианины (Cy7). Длины волн поглощения и флуоресценции цианиновых красителей зависят от длины полиметиновой цепи. С увеличением сопряженной системы увеличивается область делокализованных электронов, что приводит к уменьшению разницы энергий между основным и возбужденным состояниями. Как правило, при увеличении длины полиметиновой цепи на одну сопряженную углерод-углеродную двойную связь спектры поглощения и флуоресценции сдвигаются в (инфра)красную область более чем на 100 нм. Длины волн спектров поглощения и флуоресценции Cy3 расположены в диапазоне 540–560 нм, у Cy5 – 645–665 нм. Производные Cy7 имеют широкий диапазон длин волн поглощения и флуоресценции в зависимости от заместителей: максимум поглощения обычно находится в диапазоне 760–790 нм, а флуоресценции – в диапазоне 780–900 нм.

Помимо зависимости максимума поглощения и флуоресценции от длины полиметиновой цепи также от нее сильно зависит эффективность (квантовый выход) флуоресценции, так как красители подвергаются *цис-транс*-изомеризации в возбужденном состоянии, а *цис*-изомер не флуоресцирует. Таким образом, *цис-транс*-изомеризация конкурирует с эмиссией флуоресценции, что снижает ее интенсивность флуоресценции [13–15]. Энергия активации *цис-транс*-изомеризации, а также время жизни возбужденного состояния красителя увеличиваются с ростом длины полиметиновой цепи [16].

Было показано, что конъюгация цианиновых красителей с макромолекулами увеличивает энергию активации изомеризации, что приводит к усилению флуоресценции [17, 18]. М. Е. Sanborn и другие исследовали изменение флуоресценции после конъюгации Cy3 с одно- и двухцепочечной ДНК и пришли к выводу, что интенсивность флуоресценции Cy3, конъюгированного с одноцепочечной ДНК (оцДНК), возрастает вследствие взаимодействия между Cy3 и олигонуклеотидной цепочкой, которое нарушается после отжига с образованием двухцепочечной ДНК (дцДНК), в результате чего интенсивность флуоресценции конъюгата Cy3 двухцепочечной ДНК существенно снижается [19]. Известен также эффект увеличения интенсивности флуоресценции Protein-induced fluorescence enhancement (PIFE), который объясняют увеличением локальной вязкости [7] и который может также наблюдаться для нуклеиновых кислот.

Красители Cy5 и Cy7 флуоресцируют в дальнем красном и ближнем инфракрасном диапазоне, что позволяет использовать их для визуализации биологических объектов в *in vivo* экспериментах, так как в этом диапазоне отсутствует фоновая флуоресценция биоматериалов [20]. Мы

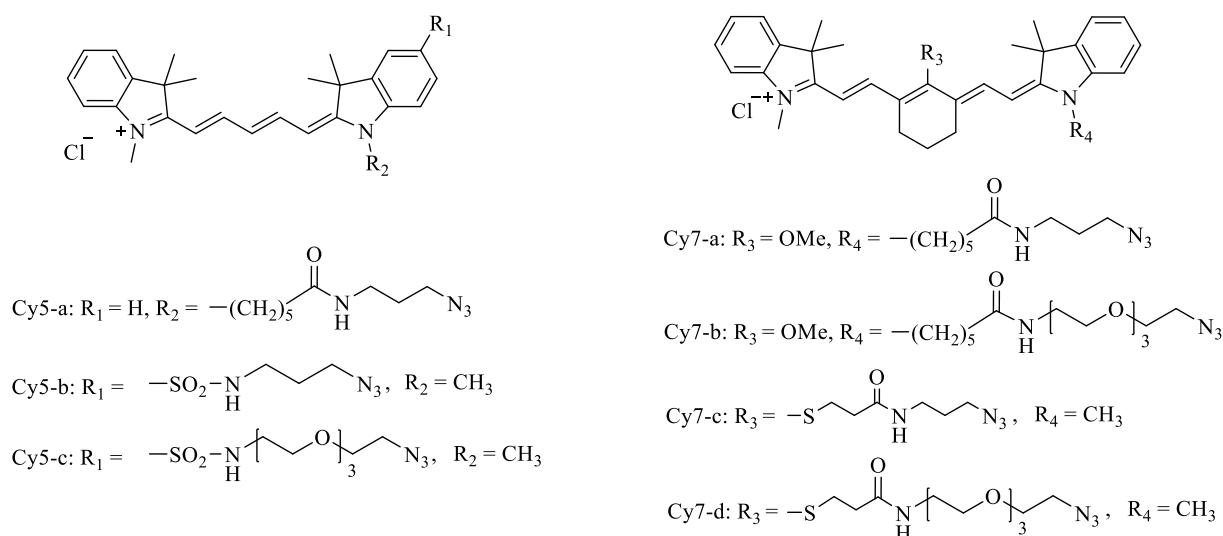


Рис.1. Структуры исследованных производных Cy5 (слева) и Cy7 (справа)

Fig. 1. Structures of the studied derivatives of Cy5 (left) and Cy7 (right)

исследовали зависимость флуоресценции от структуры нескольких новых производных красителей Су5 и Су7, связанных с одно/двухцепочечной ДНК различными линкерами в различных сайтах красителя.

Фотостабильность Су7 становится проблемой из-за его длинной полиметиновой цепи. Многие исследования показали, что введение жесткого циклического фрагмента в полиметиновую цепь может значительно улучшить стабильность и квантовый выход флуоресценции этого флуорофора [21–23], поэтому в данной работе мы исследовали производные Су7, содержащие циклогексенильный фрагмент. Структуры исследуемых красителей представлены на рис. 1.

Экспериментальная часть. Функциональные производные исследованных соединений предоставлены ОДО «Праймтех» (Минск, Беларусь). ДНК-олигонуклеотиды для конъюгации с красителями синтезированы на приборе BiosSet ASM-2000 по протоколу производителя.

Исследование физико-химических свойств полученных соединений проводилось в фосфатно-солевом буфере pH 7,4 при температуре 20 °С; спектры поглощения регистрировались на спектрофотометре Shimadzu UV 3600 Plus; стационарные спектры флуоресценции – на флуориметре Horiba Scientific Fluorolog 3 при возбуждении непрерывным излучением ксеноновой лампы. Спектральная ширина входной и выходной щелей монохроматора составляла 5 нм. Измерения проводились в кварцевой кювете 5 × 10 мм. Для сравнения эффективности флуоресценции были использованы относительные квантовые выходы флуоресценции красителей, рассчитанные по уравнению:

$$\eta = \frac{I}{I_{ref}} \cdot \frac{D_{ref}}{D} \cdot \frac{n^2}{n_{ref}^2},$$

где I и I_{ref} – интегральные интенсивности флуоресценции, D и D_{ref} – оптические плотности, n и n_{ref} – показатели преломления растворителя образца и стандарта сравнения соответственно.

Результаты и их обсуждение. Структуры и последовательности исследованных ДНК-олигонуклеотидов представлены на рис. 2.

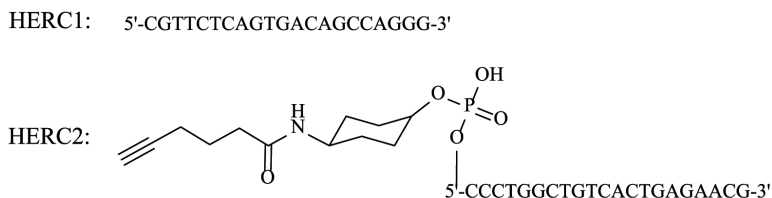


Рис. 2. Структуры и последовательности двух комплементарных олигонуклеотидов

Fig. 2. Structures and sequences of two complementary oligonucleotides

Один из одноцепочечных олигонуклеотидов имел терминальную алкиновую группу в 5'-положении для последующей конъюгации с азидным производным красителя, которую проводили с помощью медь-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения (CuAAC) [24, 25], как показано на рис. 3.

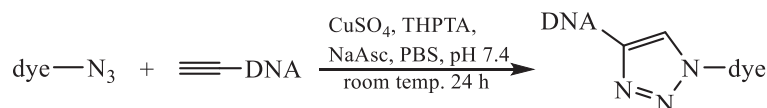


Рис. 3. Конъюгация красителей и ДНК с помощью реакции азид-алкинового циклоприсоединения

Fig. 3. Conjugation of dyes and DNA using azide-alkyne cycloaddition reaction

В результате регистрации спектров поглощения исследованных красителей, имеющих одинаковую структуру флуорофора, но разные заместители, установлено, что все Су5 имеют максимумы поглощения при длине волны около 640 нм, тогда как максимумы Су7 с заместителем, присоединенным к азоту индольной структуры (Су7-а и Су7-б), составляют 756–757 нм, а элек-

тронодонорный заместитель, расположенный на полиметиновом мостике и содержащий атом серы (Су7-с и Су7-d), приводит к сдвигу максимума поглощения в длинноволновую область примерно на 20 нм (около 776 нм). В табл. 1 приведены максимальные длины волн поглощения/флуоресценции шести исследованных красителей в водных растворах.

Таблица 1. Спектральные свойства красителей Су5 и Су7 в водных растворах

Table 1. Spectral properties of Cy5 and Cy7 dyes in aqueous solutions

Краситель	$\lambda_{ab}/\lambda_{fuo}$ (нм)	Сдвиг Стокса (нм)
Су7-а	757/779	22
Су7-б	756/779	23
Су7-с	775/800	25
Су7-д	777/800	23
Су5-а	641/656	15
Су5-б	639/655	16
Су5-с	638/655	17

После конъюгации с ДНК максимумы поглощения всех исследованных красителей в разной степени смещались в красную область. Максимум спектра поглощения Су7-а после конъюгации с оцДНК (767 нм) смещался на 10 нм и только на 5 нм – после конъюгации с дцДНК (762 нм). Максимумы спектров поглощения Су7-б, соответствующие конъюогатам с оцДНК и дцДНК, смещались на 10 нм и 5 нм (766 и 761 нм соответственно). В то же время максимумы спектров поглощения Су7-с после конъюгации с оцДНК и дцДНК смещались в красную сторону на 12 и 8 нм (787 и 783 нм соответственно). Для Су7-д после конъюгации с оцДНК и дцДНК, как и в случае Су7-с, смещение составило 12 (789) и 8 нм (785 нм).

Сдвиги максимумов спектров поглощения трех красителей Су5 после конъюгации не столь значительны, как для Су7. Максимумы поглощения Су5-а в составе конъюогатов с оцДНК и дцДНК находятся на длине волны 649 и 647 нм, то есть смещены на 8 и 6 нм. Максимумы спектра поглощения Су5-б, соответствующие конъюогации с оцДНК и дцДНК, сдвинуты в длинноволновую сторону на 7 (646) и 3 нм (642 нм). Максимумы спектра поглощения Су5-с, соответствующие конъюогации с оцДНК и дцДНК, смещены в длинноволновую сторону на 8 (646) и 5 нм (643 нм).

Установлено, что спектры поглощения Су7-с, d длинноволнее примерно на 20 нм, чем Су7-а, б. Полиметиновая цепь цианиновых красителей сама по себе оказывает сильное влияние на длины волн как поглощения, так и флуоресценции. Заместители в полиметиновой цепи также оказывают значительное влияние на спектры. Полученные результаты согласуются с выводами L. Stackova о том, что введение электронодонорной группы в полиметиновый мостик приводит к красному сдвигу поглощения [26]. Из четырех производных Су7, изученных в данной работе, заместители Су7-с, d соединены с полиметиновой цепью через атом серы, в то время как Су7-а, б имеют одну метоксильную группу. Меньшая электроотрицательность атома серы по сравнению с кислородом приводит к большей длине волны для максимумов поглощения Су7-с, d. Сравнение спектров поглощения конъюогатов красителей с ДНК показывает, что смещение спектров поглощения в длинноволновую сторону всех видов красителей после конъюогации с оцДНК больше, чем с дцДНК.

Для подтверждения степени влияния выявленного фактора для разных производных красителя Су7 проведены измерения интенсивности флуоресценции, результаты которых после нормирования представлены на рис. 4.

В отличие от спектров поглощения максимумы спектров флуоресценции красителя Су7 и его конъюогатов отличаются всего на 3–4 нм: 776 нм для Су7-а, б и Су7-с для 805 нм. Полученные данные по эффективности флуоресценции всех изученных веществ показаны на рис. 4, а более точные значения получены путем расчета суммарного излучения по спектрам флуоресценции: конъюогация Су7-а с дцДНК и оцДНК приводила к повышению эффективности флуоресценции примерно в 2,13 и 2,60 раза соответственно; Су7-б с дцДНК и оцДНК – 1,69 и 1,63 раза соот-

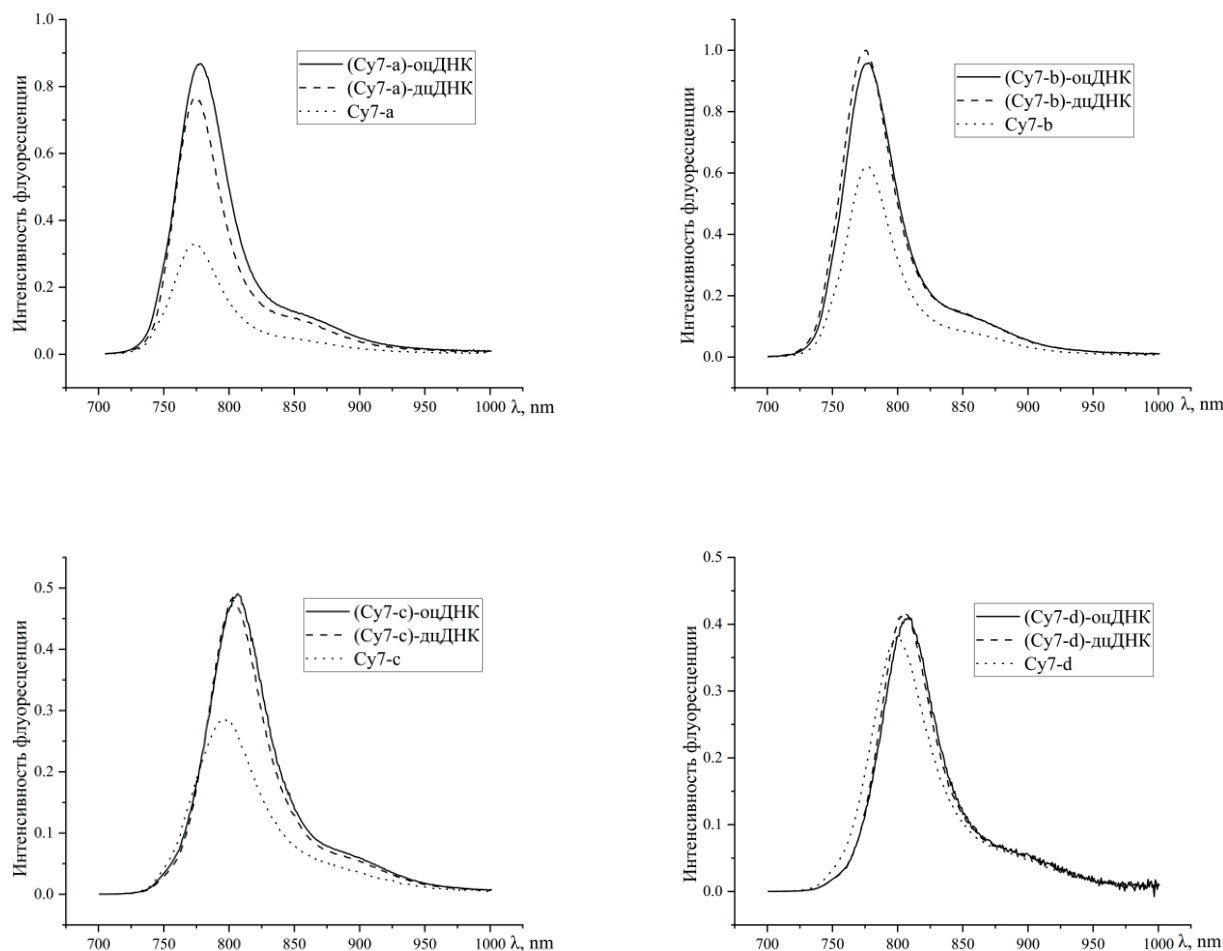


Рис. 4. Нормированные спектры флуоресценции четырех производных Cy7 и их конъюгатов с дцДНК и оцДНК (нормировано на максимальную интенсивность флуоресценции Cy7-b, конъюгированного с дцДНК, установленную как 1)

Fig. 4. Normalized fluorescence spectra of four Cy7 derivatives and their conjugates with dsDNA and ssDNA (normalized to the maximum fluorescence intensity of Cy7-b conjugated with dsDNA, set as 1)

ветственно; Cy7-с с дцДНК и оцДНК – 1,45 и 1,54 раза соответственно; Cy7-d с дцДНК и оцДНК – эффективность флуоресценции остается почти неизменной.

Сравнение четырех красителей между собой показало, что интенсивность флуоресценции Cy7-a, b с заместителями при атоме азота индольного кольца выше, чем у Cy7-с, d с заместителями в полиметиновой цепи. Следует учесть разную длину волны возбуждающего света двух типов красителей (745 нм для Cy7-a, b и 765 нм Cy7-с, d). В общем интенсивность флуоресценции красителей с длинными заместителями выше, чем у красителей с короткими заместителями.

Обобщая полученные результаты, можно сделать вывод, что конъюгация красителей Cy7 с ДНК действительно усиливает их флуоресценцию вне зависимости от того, является ДНК двух- или одноцепочечной. Добавление дополнительного фрагмента триэтиленгликоля в заместитель значительно увеличивает флуоресценцию красителя, возможно, за счет снижения склонности красителя к агрегации в присутствии фрагмента триэтиленгликоля.

Для того чтобы проверить, отличаются ли выявленные закономерности для Cy5 и Cy7, мы провели те же измерения флуоресценции для трех красителей Cy5 (длина волны возбуждения – 648 нм), результаты которых представлены на рис. 5.

Сравнение эффективности флуоресценции исследуемых веществ путем расчета интеграла по спектрам флуоресценции дало следующие результаты: конъюгация Cy5-a с дцДНК и оцДНК приводила к повышению интенсивности флуоресценции примерно в 1,74 и 2,15 раза; Cy5-b с дцДНК и оцДНК – 1,77 и 2,60 раза соответственно; Cy5-с с дцДНК и оцДНК – 1,26 и 1,78 раза

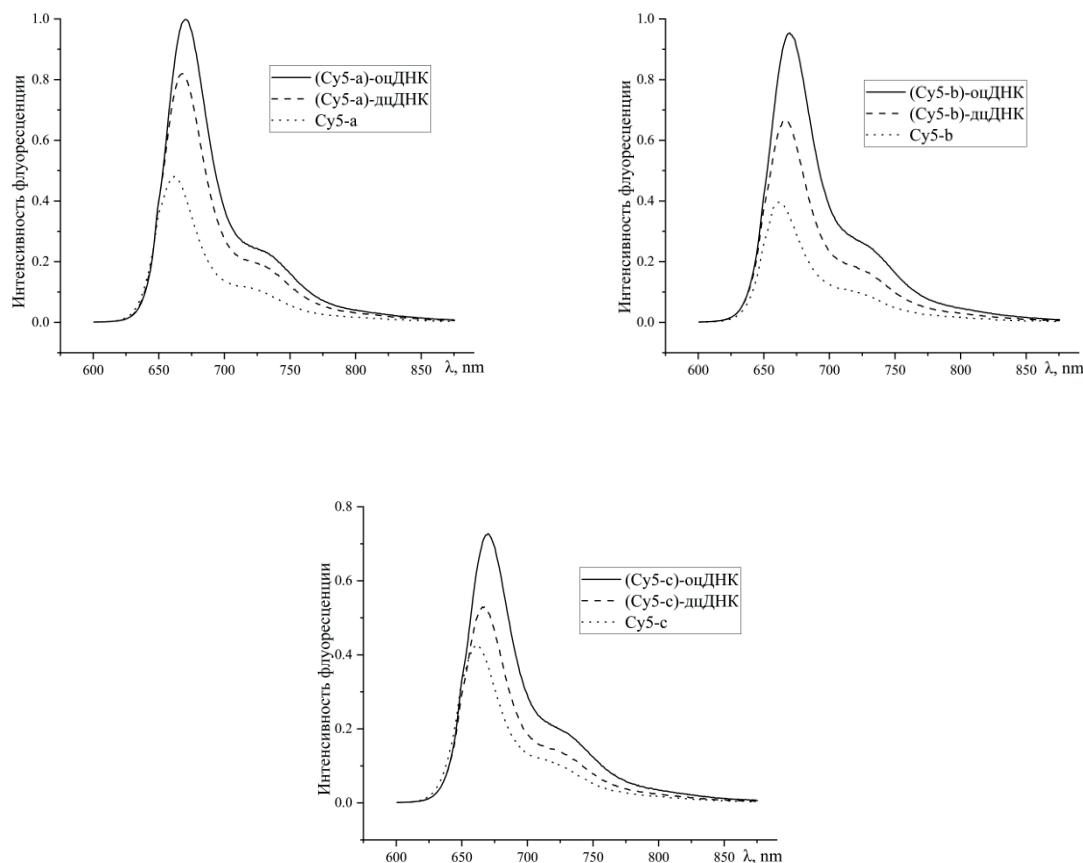


Рис. 5. Нормированные спектры флуоресценции трех производных Cy5 и их конъюгатов с дцДНК и оцДНК (нормировано на максимальную интенсивность флуоресценции Cy5-а, конъюгированного с оцДНК, установленную как 1)

Fig. 5. Normalized fluorescence spectra of three Cy5 derivatives and their conjugates with dsDNA and ssDNA (normalized to the maximum fluorescence intensity of Cy5-a conjugated with ssDNA, set as 1)

соответственно. Видно, что в отличие от красителей Cy7 эффективность флуоресценции конъюгата оцДНК с Cy5 значительно выше по сравнению с конъюгатом дцДНК с Cy5. Краситель Cy5-b имеет лишь немного меньшую эффективность флуоресценции по сравнению с коммерчески доступным Cy5-a.

Установлен неожиданный факт, что эффективность флуоресценции Cy5-с с более длинным заместителем немного выше, чем у Cy5-b, но после конъюгации Cy5-с с ДНК его флуоресценция уменьшается примерно на 20 % и становится ниже, чем у конъюгата Cy5-b с ДНК. Мы предположили, что длинный заместитель делает краситель и цепь ДНК более удаленными друг от друга,

Таблица 2. Нормализованные интенсивности флуоресценции различных производных Cy5 и Cy7 и их конъюгатов

Table 2. Normalized fluorescence intensity of different derivatives of Cy5 and Cy7 and their conjugates

Краситель	Интенсивность флуоресценции		
	Краситель	Краситель-оцДНК	Краситель-дцДНК
Cy7-a	1	2,60	2,13
Cy7-b	1	1,63	1,69
Cy7-c	1	1,54	1,45
Cy7-d	1	1,01	1,01
Cy5-a	1	2,15	1,74
Cy5-b	1	2,60	1,77
Cy5-c	1	1,78	1,26

в результате чего взаимодействие между красителем и ДНК ослабевает. Согласно теории М. Е. Sanborn цианиновый краситель взаимодействует с оцДНК, что приводит к усилению излучаемой им флуоресценции [19]. Что касается дцДНК, то согласно теории D. G. Norman Cy5 укладывается на конце дцДНК подобно дополнительной паре оснований [27]. По этой причине, возможно, длина линкеров также имеет существенное значение. Результаты измерений представлены в табл. 2.

Заключение. Таким образом, исследованы физико-химические свойства двух типов красителей Cy7 с заместителями, присоединенными к азоту индольного кольца или полиметиновому мостику. Каждый тип красителя, в свою очередь, получен в двух модификациях с разными длинами линкера. Мы ввели красители в ДНК по реакции азид-алкинового присоединения (клик-химия) и сравнили эффективность флуоресценции конъюгата одноцепочечной ДНК с таковой для двухцепочечной. Установлено, что заместитель, присоединенный к полиметиновой цепи через атом серы, в незначительной степени снижает флуоресценцию красителя и приводил к сдвигу максимума поглощения и флуоресценции в длинноволновую область. Красители с длинными заместителями имели более высокую эффективность флуоресценции, чем красители с обычными заместителями, что может быть связано с присутствием фрагмента триэтиленгликоля в длинном заместителе, который в определенной степени препятствовал агрегации красителей. Конъюгация красителей с ДНК делала флуоресценцию более интенсивной вне зависимости от того, одноцепочечная это ДНК или двухцепочечная.

Исследованы физико-химические свойства двух красителей Cy5 с заместителями разной длины, расположенными в положении 1 индольного кольца. Установлено, что Cy5-b с коротким линкером в составе конъюгата с ДНК обладал интенсивностью флуоресценции, сопоставимой с описанным ранее и коммерчески доступным Cy5-a. Cy5-c, имеющий длинный линкер, обладал более сильной флуоресценцией, чем Cy5-b (аналогично результатам для Cy7), но краситель Cy5-c с длинным заместителем в составе конъюгата флуоресцировал немного хуже, чем два других красителя Cy5. Разница между дцДНК и оцДНК была подтверждена на всех типах красителей Cy5: красители в составе конъюгатов с оцДНК флуоресцировали сильнее, чем с дцДНК.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проекты № Ф24В-006 и Х23РНФ-041) и фонда Китайского стипендиального совета (№ 202008400011). Авторы выражают благодарность М. Р. Ребковец и В. В. Каминской за синтез исследованных олигонуклеотидов.

Acknowledgements. This work has been performed with the financial support of Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (projects No. Ф24В-006 and Х23РНФ-041) and China Scholarship Council Foundation (No. 202008400011). The authors express their gratitude to M. R. Rebkovets and V. V. Kaminskaya for the synthesis of the studied oligonucleotides.

Список используемых источников

1. Temperature dependence of interaction between double stranded DNA and Cy3 or Cy5 / X. Li, Y. Yin, X. Yang [et al.] // *Chemical Physics Letters*. – 2011. – Vol. 513, № 4–6. – P. 271–275. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2011.08.017>
2. Symmetric meso-chloro-substituted pentamethine cyanine dyes containing benzothiazolyl/benzoselenazolyl chromophores novel synthetic approach and studies on photophysical properties upon interaction with bio-objects / A. Kurutos, O. Ryzhova, V. Trusova [et al.] // *Journal of fluorescence*. – 2016. – Vol. 26, № 1. – P. 177–187. <https://doi.org/10.1007/s10895-015-1700-4>
3. Selective G-quadruplex DNA recognition by a new class of designed cyanines / R. Nanjunda, E. Owens, L. Mickelson [et al.] // *Molecules*. – 2013. – Vol. 18, № 11. – P. 13588–13607. <https://doi.org/10.3390/molecules181113588>
4. Yarmoluk, S. M. Symmetric cyanine dyes for detecting nucleic acids / S. M. Yarmoluk, V. B. Kovalska, M. Y. Losytskyy // *Biotechnic & Histochemistry*. – 2008. – Vol. 83, № 3–4. – P. 131–145. <https://doi.org/10.1080/10520290802383684>
5. Trans-cis isomerization kinetics of cyanine dyes reports on the folding states of exogeneous RNA G-quadruplexes in live cells / A. Kitamura, J. Tornmalm, B. Demirbay [et al.] // *Nucleic acids research*. – 2023. – Vol. 51, № 5. – P. e27–e27. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1255>
6. Demystifying PIFE: the photophysics behind the protein-induced fluorescence enhancement phenomenon in Cy3 / E. M. Stennett, M. A. Ciuba, S. Lin, M. Levitus // *The journal of physical chemistry letters*. – 2015. – Vol. 6, № 10. – P. 1819–1823. <https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.5b00613>
7. Initial state of DNA-Dye complex sets the stage for protein induced fluorescence modulation / F. Rashid, V.-S. Raducanu, M. S. Zaher [et al.] // *Nature communications*. – 2019. – Vol. 10, № 1. – P. 2104. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10137-9>
8. Hwang, H. Protein induced fluorescence enhancement (PIFE) for probing protein–nucleic acid interactions / H. Hwang, S. Myong // *Chemical Society Reviews*. – 2014. – Vol. 43, № 4. – P. 1221–1229. <https://doi.org/10.1039/C3CS60201J>

9. Development of fluorescence-based nucleic acid blot hybridization method using Cy5. 5 labeled DNA probes / Y. Cheng, N. Wang, Z. Ren, C. Xu // *Journal of Microbiological Methods*. – 2022. – Vol. 197. – P. 106479. <https://doi.org/10.1016/j.jmimet.2022.106479>
10. A near-infrared fluorescent heptamethine indocyanine dye with preferential tumor accumulation for in vivo imaging / C. Zhang, T. Liu, Y. Su [et al.] // *Biomaterials*. – 2010. – Vol. 31, № 25. – P. 6612–6617. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.007>
11. Comparative study of the optical and heat generation properties of IR820 and indocyanine green / A. Fernandez-Fernandez, R. Manchanda, T. Lei [et al.] // *Molecular imaging*. – 2012. – Vol. 11, № 2. – P. 99–113. <https://doi.org/10.2310/7290.2011.00031>
12. Cyanine dyes as contrast agents for near-infrared imaging in vivo: acute tolerance, pharmacokinetics, and fluorescence imaging / B. Ebert, B. Riefke, U. Sukowski, K. Licha // *Journal of biomedical optics*. – 2011. – Vol. 16, № 6. – P. 066003. <https://doi.org/10.1117/1.3585678>
13. Pronkin, P. Isomerization and properties of isomers of carbocyanine dyes / P. Pronkin, A. Tatikolov // *Sci*. – 2019. – Vol. 1, № 1. – P. 19. <https://doi.org/10.3390/sci1010019>
14. Cy3B™: improving the performance of cyanine dyes / M. Cooper, A. Ebner, M. Briggs [et al.] // *Journal of Fluorescence*. – 2004. – Vol. 14, № 2. – P. 145–150. <https://doi.org/10.1023/B:JOFL.0000016286.62641.59>
15. Widengren, J. Characterization of photoinduced isomerization and back-isomerization of the cyanine dye Cy5 by fluorescence correlation spectroscopy / J. Widengren, P. Schwille // *The Journal of Physical Chemistry A*. – 2000. – Vol. 104, № 27. – P. 6416–6428. <https://doi.org/10.1021/jp000059s>
16. Ultrafast radiationless deactivation of organic dyes: evidence for a two-state two-mode pathway in polymethine cyanines / A. Sanchez-Galvez, P. Hunt, M. A. Robb [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2000. – Vol. 122, № 12. – P. 2911–2924. <https://doi.org/10.1021/ja993985x>
17. Fluorescent properties of cyanine dyes as a matter of the environment / F. Fan, V. A. Povedailo, I. L. Lysenko [et al.] // *Journal of Fluorescence*. – 2024. – Vol. 34, № 2. – P. 925–933. <https://doi.org/10.1007/s10895-023-03321-0>
18. Analysis of microviscosity and reaction coordinate concepts in isomerization dynamics described by Kramers' theory / E. Åkesson, A. Hakkarainen, E. Laitinen [et al.] // *The Journal of Chemical Physics*. – 1991. – Vol. 95, № 9. – P. 6508–6523. <https://doi.org/10.1063/1.461521>
19. Fluorescence properties and photophysics of the sulfoindocyanine Cy3 linked covalently to DNA / M. E. Sanborn, B. K. Connolly, K. Gurunathan, M. Levitus // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2007. – Vol. 111, № 37. – P. 11064–11074. <https://doi.org/10.1021/jp072912u>
20. Near-infrared heptamethine cyanine dyes: a new tracer for solid-phase immunoassays / R. J. Williams, J. M. Peralta, V. C. W. Tsang [et al.] // *Applied Spectroscopy*. – 1997. – Vol. 51, № 6. – P. 836–843. <https://doi.org/10.1366/0003702971941115>
21. Far-red to near infrared analyte-responsive fluorescent probes based on organic fluorophore platforms for fluorescence imaging / L. Yuan, W. Lin, K. Zheng [et al.] // *Chemical Society Reviews*. – 2013. – Vol. 42, № 2. – P. 622–661. <https://doi.org/10.1039/C2CS35313J>
22. Near-infrared heptamethine cyanines (Cy7): from structure, property to application / L. Feng, W. Chen, X. Ma [et al.] // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2020. – Vol. 18, № 46. – P. 9385–9397. <https://doi.org/10.1039/D0OB01962C>
23. Levitz, A. Introduction of various substitutions to the methine bridge of heptamethine cyanine dyes Via substituted dianil linkers / A. Levitz, F. Marmarchi, M. Henary // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2018. – Vol. 17, № 10. – P. 1409–1416. <https://doi.org/10.1039/c8pp00218e>
24. A stepwise huisgen cycloaddition process: copper (I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes / V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless // *Angewandte Chemie*. – 2002. – Vol. 114, № 14. – P. 2708–2711. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::aid-anie2596>3.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::aid-anie2596>3.0.co;2-4)
25. Tornøe, C. W. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper (I)-catalyzed 1, 3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides / C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal // *The Journal of Organic Chemistry*. – 2002. – Vol. 67, № 9. – P. 3057–3064. <https://doi.org/10.1021/jo011148j>
26. Deciphering the structure–property relations in substituted heptamethine cyanines / L. Stackova E. Muchová, M. Russo [et al.] // *The Journal of Organic Chemistry*. – 2020. – Vol. 85, № 15. – P. 9776–9790. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c01104>
27. The structure of cyanine 5 terminally attached to double-stranded DNA: implications for FRET studies / A. Iqbal, L. Wang, K. C. Thompson [et al.] // *Biochemistry*. – 2008. – Vol. 47, № 30. – P. 7857–7862. <https://doi.org/10.1021/bi800773f>

References

1. Li X., Yin Y., Yang X., Zhi Z., Zhao X. Temperature dependence of interaction between double stranded DNA and Cy3 or Cy5. *Chemical Physics Letters*, 2011, vol. 513, no. 4–6, pp. 271–275. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2011.08.017>
2. Kurutos A., Ryzhova O., Trusova V., Gorbenko G., Gadjev N., Deligeorgiev T. Symmetric meso-chloro-substituted pentamethine cyanine dyes containing benzothiazolyl/benzoselenazolyl chromophores novel synthetic approach and studies on photophysical properties upon interaction with bio-objects. *Journal of fluorescence*, 2016, no. 26, no. 1, pp. 177–187. <https://doi.org/10.1007/s10895-015-1700-4>
3. Nanjunda R., Owens E. A., Mickelson L., Dost T. L., Stroeve E. M., Huynh H. T., Germann M. W., Henary M. M., Wilson W. D. Selective G-quadruplex DNA recognition by a new class of designed cyanines. *Molecules*, 2013, vol. 18, no. 11, pp. 13588–13607. <https://doi.org/10.3390/molecules181113588>
4. Yarmoluk S. M., Kovalska V. B., Losytskyy M. Y. Symmetric cyanine dyes for detecting nucleic acids. *Biotechnic & Histochemistry*, 2008, vol. 83, no. 3–4, pp. 131–145. <https://doi.org/10.1080/10520290802383684>

5. Kitamura A., Tornmalm J., Demirbay B., Piguet J., Kinjo M., Widengren J. Trans-cis isomerization kinetics of cyanine dyes reports on the folding states of exogeneous RNA G-quadruplexes in live cells. *Nucleic acids research*, 2023, vol. 51, no. 5, pp. e27–e27. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1255>
6. Stennett E. M., Ciuba M. A., Lin S., Levitus M. Demystifying PIFE: the photophysics behind the protein-induced fluorescence enhancement phenomenon in Cy3. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2015, vol. 6, no. 10, pp. 1819–1823. <https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.5b00613>
7. Rashid F., Raducanu V. S., Zaher M. S., Tehseen M., Habuchi S., Hamdan S. M. Initial state of DNA-Dye complex sets the stage for protein induced fluorescence modulation. *Nature Communications*, 2019, vol. 10, no. 1, pp. 2104. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10137-9>
8. Hwang H., Myong S. Protein induced fluorescence enhancement (PIFE) for probing protein–nucleic acid interactions. *Chemical Society Reviews*, 2014, vol. 43, no. 4, pp. 1221–1229. <https://doi.org/10.1039/C3CS60201J>
9. Cheng Y., Wang N., Ren Z., Xu C. Development of fluorescence-based nucleic acid blot hybridization method using Cy5. 5 labeled DNA probes. *Journal of Microbiological Methods*, 2022, vol. 197, pp. 106479. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106479>
10. Zhang C., Liu T., Su Y., Luo S., Zhu Y., Tan X., Fan S., Zhang L., Zhou Y., Cheng T., Shi C. A near-infrared fluorescent heptamethine indocyanine dye with preferential tumor accumulation for in vivo imaging. *Biomaterials*, 2010, vol. 31, no. 25, pp. 6612–6617. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.007>
11. Fernandez-Fernandez A., Manchanda R., Lei T., Carvajal D. A., Tang Y., Kazmi S. Z. R., McGoron A. J. Comparative study of the optical and heat generation properties of IR820 and indocyanine green. *Molecular Imaging*, 2012, vol. 11, no. 2, pp. 99–113. <https://doi.org/10.2310/7290.2011.00031>
12. Ebert B., Riefke B., Sukowski U., Licha K. Cyanine dyes as contrast agents for near-infrared imaging in vivo: acute tolerance, pharmacokinetics, and fluorescence imaging. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, vol. 16, no. 6, pp. 066003. <https://doi.org/10.1117/1.3585678>
13. Pronkin P., Tatikolov A. Isomerization and properties of isomers of carbocyanine dyes. *Sci*, 2019, vol. 1, no. 1, pp. 19. <https://doi.org/10.3390/sci1010019>
14. Cooper M., Ebner A., Briggs M., Burrows M., Gardner N., Richardson R., West R. Cy3B™: improving the performance of cyanine dyes. *Journal of Fluorescence*, 2004, vol. 14, no. 2, pp. 145–150. <https://doi.org/10.1023/B:JOFL.0000016286.62641.59>
15. Widengren J., Schwille P. Characterization of photoinduced isomerization and back-isomerization of the cyanine dye Cy5 by fluorescence correlation spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2000, vol. 104, no. 27, pp. 6416–6428. <https://doi.org/10.1021/jp000059s>
16. Sanchez-Galvez A., Hunt P., Robb M. A., Olivucci M., Vreven T., Schlegel H. B. Ultrafast radiationless deactivation of organic dyes: evidence for a two-state two-mode pathway in polymethine cyanines. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, vol. 122, no. 12, pp. 2911–2924. <https://doi.org/10.1021/ja993985x>
17. Fan F., Povedailo V. A., Lysenko I. L., Seviarynchuk T. P., Sharko O. L., Mazunin I. O., Shmanai V. V. Fluorescent properties of cyanine dyes as a matter of the environment. *Journal of Fluorescence*, 2024, vol. 34, no. 2, pp. 925–933. <https://doi.org/10.1007/s10895-023-03321-0>
18. Åkesson E., Hakkarainen A., Laitinen E., Helenius V., Gillbro T., Korppi-Tommola J., Sundström V. Analysis of microviscosity and reaction coordinate concepts in isomerization dynamics described by Kramers' theory. *The Journal of Chemical Physics*, 1991, vol. 95, no. 9, pp. 6508–6523. <https://doi.org/10.1063/1.461521>
19. Sanborn M. E., Connolly B. K., Gurunathan K., Levitus M. Fluorescence properties and photophysics of the sulfoindocyanine Cy3 linked covalently to DNA. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2007, vol. 111, no. 37, pp. 11064–11074. <https://doi.org/10.1021/jp072912u>
20. Williams R. J., Peralta J. M., Tsang V. C., Narayanan N., Casay G. A., Lipowska M., Strekowski L., Patonay G. Near-infrared heptamethine cyanine dyes: a new tracer for solid-phase immunoassays. *Applied Spectroscopy*, 1997, vol. 51, no. 6, pp. 836–843. <https://doi.org/10.1366/0003702971941115>
21. Yuan L., Lin W., Zheng K., He L., Huang W. Far-red to near infrared analyte-responsive fluorescent probes based on organic fluorophore platforms for fluorescence imaging. *Chemical Society Reviews*, 2013, vol. 42, no. 2, pp. 622–661. <https://doi.org/10.1039/C2CS35313J>
22. Feng L., Chen W., Ma X., Liu S., Yin J. Near-infrared heptamethine cyanines (Cy7): from structure, property to application. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2020, vol. 18, no. 46, pp. 9385–9397. <https://doi.org/10.1039/D0OB01962C>
23. Levitz A., Marmarchi F., Henary M. Introduction of various substitutions to the methine bridge of heptamethine cyanine dyes via substituted dianil linkers. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2018, vol. 17, no. 10, pp. 1409–1416. <https://doi.org/10.1039/c8pp00218e>
24. Rostovtsev V. V., Green L. G., Fokin V. V., Sharpless K. B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper (I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie*, 2002, vol. 114, no. 14, pp. 2708–2711. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::aid-anie2596>3.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::aid-anie2596>3.0.co;2-4)
25. Tornøe C. W., Christensen C., Meldal M. Peptidotriazoles on solid phase [1,2,3]-triazoles by regioselective copper (I)-catalyzed 1, 3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *The Journal of Organic Chemistry*, 2002, vol. 67, no. 9, pp. 3057–3064. <https://doi.org/10.1021/jo011148j>
26. Stackova L., Muchova E., Russo M., Slavicek P., Stacko P., Klán P. Deciphering the structure–property relations in substituted heptamethine cyanines. *The Journal of Organic Chemistry*, 2020, vol. 85, no. 15, pp. 9776–9790. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c01104>
27. Iqbal A., Wang L., Thompson K. C., Lilley D. M., Norman D. G. The structure of cyanine 5 terminally attached to double-stranded DNA: implications for FRET studies. *Biochemistry*, 2008, vol. 47, no. 30, pp. 7857–7862. <https://doi.org/10.1021/bi800773f>

Информация об авторах

Фань Фань – аспирант. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: zwth6230@gmail.com

Поведайло Владимир Александрович – доктор физико-математических наук, главный научный сотрудник. Институт физики НАН Беларуси (пр-т Независимости, 68, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: poved@dragon.bas-net.by

Кадуцкий Алексей Петрович – научный сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kadutskii@gmail.com

Малеев Григорий Владимирович – старший научный сотрудник. Институт физиологически активных веществ Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук (ИФАВ РАН) (пр-т академика Семенова, 1, 142432, Черноголовка, РФ). E-mail: g.maleev@ipac.ac.ru

Шманай Вадим Владимирович – кандидат химических наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: v.shmanai@gmail.com

Information about the authors

Fan Fan – Postgraduate Student. Institute of Physical-Organic Chemistry of the National Academy of Science of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zwth6230@gmail.com

Povedailo Vladimir A. – Dr. Sc. (Physics and Mathematics), Chief Researcher. Institute of Physics of the National Academy of Science of Belarus (68, Nezavisimosti Ave., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: poved@dragon.bas-net.by

Kadutskii Aleksey P. – Researcher. Institute of Physical-Organic Chemistry of the National Academy of Science of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kadutskii@gmail.com

Maleev Grigoriy V. – Senior Researcher. Institute of Physiologically Active Compounds at Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry of Russian Academy of Sciences, (1, Academician Semenov Ave., Chernogolovka, Moscow region, 142432, Russian Federation). E-mail: g.maleev@ipac.ac.ru

Shmanai Vadim V. – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Physical-Organic Chemistry of the National Academy of Science of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: v.shmanai@gmail.com