



УДК 547.789

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ВРЕМЯРАЗРЕШЕННОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ СЕЛЕКТИВНОСТИ ФЛУОРОГЕННЫХ КРАСИТЕЛЕЙ РЯДА АРИЛИДЕН-ИМИДАЗОЛОНОВ В ОТНОШЕНИИ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА¹

© 2024 г. А. Р. Гильванов^{*,#}, А. Ю. Смирнов^{*}, С. А. Краснова^{*}, И. Д. Соловьев^{**},
А. П. Савицкий^{**}, Ю. А. Богданова^{*}, М. С. Баранов^{*,***}

^{*} ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

^{**} Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН,
Россия, 119071 Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2

^{***} Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Поступила в редакцию 16.11.2023 г.

После доработки 26.11.2023 г.

Принята к публикации 27.11.2023 г.

С использованием флуоресцентной времяразрешенной микроскопии (FLIM) был изучен набор синтезированных ранее флуорогенов ряда арилиден-имидазолонов, преимущественно окрашивающих эндоплазматический ретикулум (ЭПР) живых клеток. Показано, что использование этого типа флуоресцентной микроскопии позволяет повысить селективность окрашивания ЭПР.

Ключевые слова: арилиден-имидазолон, флуорогены, ЭПР, время жизни флуоресценции, FLIM

DOI: 10.31857/S0132342324050129, **EDN:** LQOADH

ВВЕДЕНИЕ

Флуорогены – вещества, не обладающие собственной флуоресценцией в водных растворах, но приобретающие ее при их связывании с определенными целевыми молекулами (белками [1–4], нуклеиновыми кислотами [5] и др. [6–9]). Такая особенность позволяет в существенной степени сократить нецелевое мечение и фоновый сигнал, что делает флуорогены интереснейшим инструментом для использования во флуоресцентной микроскопии. Отдельного упоминания заслуживают флуорогены, основанные на арилиден-имидазолонах, чья структура аналогична структуре зрелого хромофора GFP [10].

Вещества данного типа характеризуются небольшим размером, обладают различными спектральными свойствами, высокой растворимостью в воде, кроме того, их несложно синтезировать [11]. Многие арилиден-имидазолон демонстрируют значительное увеличение интенсивности флуоресценции при переходе из водной среды в менее полярный растворитель, что делает их потенциальными флуоресцентными “сенсорами полярности”. Благодаря такому свойству на основе арилиден-имидазолонов были созданы флуорогенные красители (I), (II) [12], (III) [13] и (IV) [14], пригодные для селективного флуоресцентного окрашивания эндоплазматического ретикулума (ЭПР).

Сокращения: FLIM – флуоресцентная времяразрешенная микроскопия; КВФ – квантовый выход флуоресценции; ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

¹ Дополнительные материалы к этой статье доступны по doi 10.31857/S0132342324050129 для авторизованных пользователей.

[#] Автор для связи: (эл. почта: aidar_gilvanov@mail.ru).

ЭПР – клеточная органелла, формирующая сеть трубочек и карманов, отделенных от цитоплазмы одним замкнутым слоем липидной мембраны. ЭПР играет ключевую роль в трансляции, сборке и транспорте мембранных и секреторных белков [15, 16], липидов [17], а также выступает в качестве внутриклеточного депо ионов кальция [18]. Нарушение любой из вышеперечисленных функций ЭПР приводит к ярко выраженным патологиям [19–23], что делает ЭПР исключительно важным для наблюдения внутриклеточным объектом. При этом важно разделять ЭПР и другие липидные органеллы клетки, например, образующиеся из ЭПР липидные капли (адипосомы). Адипосомы были выделены в качестве самостоятельных клеточных органелл [24], имеющих собственные клеточные функции [25].

Разделение ЭПР и липидных капель во флуоресцентной микроскопии не всегда возможно при использовании только интенсивметрических или спектральных данных о флуоресценции флуорогена. Однако флуоресценция флуорогенов характеризуется еще одним параметром – временем жизни. Время жизни флуоресценции характеризует среднее время, которое флуорофор проводит в возбужденном состоянии между актами поглощения и эмиссии фотона света [26]. Этот процесс в первую очередь зависит от природы самой молекулы, вследствие чего наблюдаемые при его измерении значения мало зависят от концентрации флуорофора или метода измерения. Тем не менее окружающая среда может существенно влиять на устойчивость возбужденной формы флуорогена и, соответственно, время жизни флуоресценции.

Флуоресцентная микроскопия времен жизни флуоресценции или флуоресцентная времяразрешенная микроскопия (FLIM) давно используется в исследовательской практике. Она позволяет детектировать изменения pH в живых клетках [27, 28], концентрацию ионов хлора [29], натрия [30], кальция [31, 32] и др. Также с ее помощью возможно проведение измерения внутриклеточной температуры [33], вязкости [34] и полярности [35]. Данные о различии времен жизни флуоресценции

красителей использовались ранее для различения липидных капель и других органелл клетки [36], а также для визуализации доменов в пределах одной фосфолипидной мембраны [37].

Целью данной работы стало изучение ряда синтезированных нами ранее флуорогенов, окрашивающих преимущественно ЭПР, с использованием FLIM.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании нами были изучены четыре флуорогена из группы арилиден-имидазолонов, представленных на схеме 1. Данные вещества были ранее синтезированы в нашей лаборатории и показали высокую селективность во флуоресцентном окрашивании ЭПР [12–14], однако помимо ЭПР в микроскопии также наблюдалось флуоресцентное мечение отдельных липидных капель (адипосом). Мы предположили, что различная полярность среды в ЭПР и адипосомах будет обуславливать различные времена жизни флуоресценции, что позволит разделить эти сигналы с помощью FLIM.

В первую очередь мы изучили времена жизни флуоресценции выбранных красителей в различных средах (табл. 1–4). Было установлено, что большинство веществ характеризуется би- или даже триэкспоненциальным характером спада флуоресценции, что говорит о существовании множества механизмов релаксации возбужденного состояния данных молекул. Наименее выраженным этот эффект оказался для сложноэфирного производного (I), у которого вклад второй из компонент всегда оставался низким. Чуть более сложной оказалась природа релаксации производного (II), у которого вклад второй компоненты заметно нарастал в полярных средах. Соединения (III) и (IV) характеризовались самой сложной природой спада флуоресценции, который в некоторых случаях описывался тремя отдельными компонентами со значительным вкладом, причем для соединения (IV) этот вклад увеличивался при переходе к менее полярным средам (например, толуолу, гексану или диоксану). Стоит отметить,

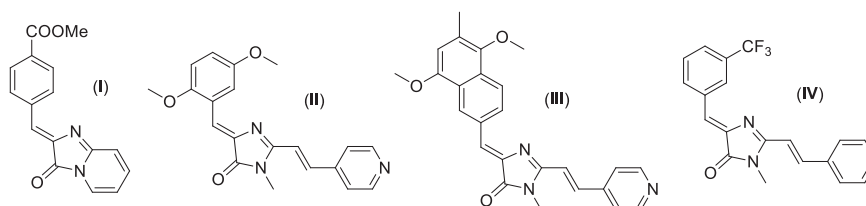


Схема 1. Структуры красителей ряда арилиден-имидазолонов, изученных в работе.

Таблица 1. Оптические свойства соединения (I) в разных растворителях

Растворитель	τ_1 , нс	A_1 , %	τ_2 , нс	A_2 , %	КВФ, % [12]
Et ₂ O	0.20	3	1.15	97	8.2
EtOAc	0.13	4	1.59	96	8.8
EtOH	0.08	7	1.26	93	4.6
MeOH	0.07	8	0.95	92	1.7
Ацетонитрил	0.07	3	2.09	97	8.9
CH ₂ Cl ₂	0.11	3	1.85	97	12.2
Диметилформамид	0.07	4	2.02	96	10.5
DMSO	0.10	5	1.99	95	9.3
Ацетон	0.05	3	1.92	97	10.2
Тетрагидрофуран	0.07	5	1.44	95	8.8
Толуол	0.09	8	1.04	92	5.9
Диоксан	0.08	7	1.24	93	6.3
Гексан	0.16	17	0.67	83	—

Таблица 2. Оптические свойства соединения (II) в разных растворителях

Растворитель	τ_1 , нс	A_1 , %	τ_2 , нс	A_2 , %	КВФ, % [12]
Et ₂ O	0.11	4	4.39	96	50.1
EtOAc	0.08	4	3.75	96	34.7
EtOH	0.11	59	0.51	41	16.0
MeOH	0.09	92	1.40	8	0.8
Ацетонитрил	0.12	5	1.75	95	8.7
CH ₂ Cl ₂	0.08	5	3.27	95	23.4
Диметилформамид	0.12	7	1.76	93	10.0
DMSO	0.14	12	1.47	88	7.1
Ацетон	0.07	7	2.38	93	16.0
Тетрагидрофуран	0.08	4	3.78	96	31.2
Толуол	0.10	5	4.03	95	38.3
Диоксан	0.08	5	4.04	95	41.1
Гексан	0.11	5	3.57	95	—

Таблица 3. Оптические свойства соединения (III) в разных растворителях

Растворитель	τ_1 , нс	A_1 , %	τ_2 , нс	A_2 , %	τ_3 , нс	A_3 , %	КВФ, % [13]
Et ₂ O	0.07	5	—	—	2.95	95	36.3
EtOAc	0.16	17	0.87	83	—	—	5.86
EtOH	Очень тусклый раствор						0.67
MeOH	Очень тусклый раствор						0.14
Ацетонитрил	Очень тусклый раствор						0.29
CH ₂ Cl ₂	0.15	32	0.63	57	2.72	11	2.89
Диметилформамид	Очень тусклый раствор						0.75
DMSO	Очень тусклый раствор						0.73
Ацетон	Очень тусклый раствор						0.57
Тетрагидрофуран	0.11	16	0.73	80	2.57	4	5.44
Толуол	0.10	6	—	—	3.25	94	46.2
Диоксан	0.09	8	—	—	2.48	92	28.4
Гексан	0.10	6	—	—	3.13	94	68.5

Таблица 4. Оптические свойства (IV) в разных растворителях

Растворитель	τ_1 , нс	A_1 , %	τ_2 , нс	A_2 , %	τ_3 , нс	A_3 , %	КВФ, % [14]
Et ₂ O	0.16	37	0.52	49	1.39	14	3.9
EtOAc	0.21	54	0.70	46	—	—	4.7
EtOH	0.15	78	0.52	22	—	—	2.3
MeOH	0.15	80	0.46	20	—	—	1.8
Ацетонитрил	0.14	43	0.46	57	—	—	2.3
CH ₂ Cl ₂	0.17	48	0.53	52	—	—	3.3
Диметилформамид	0.18	44	0.56	56	—	—	3.4
DMSO	0.17	41	0.57	59	—	—	3.7
Ацетон	0.18	55	0.54	45	—	—	3.1
Тетрагидрофуран	0.23	55	0.84	45	—	—	4.5
Толуол	0.15	23	0.56	46	1.52	31	7.5
Диоксан	0.13	21	0.52	49	1.49	30	7.7
Гексан	0.13	24	0.44	51	1.40	25	5.6

что во всех случаях мы не смогли выявить какой-то заметной корреляции между временами жизни и квантовыми выходами флуоресценции.

Затем мы изучили окрашивание клеточных культур этими красителями с использованием FLIM. Мы подтвердили, что инкубация клеток HeLa Kyoto с красителями (I–IV) в концентрациях 5–10 мкМ приводит к селективному окрашиванию ЭПР и отдельных липидных капель, однако фильтрация по времени жизни флуоресценции в некоторых случаях позволила различить эти клеточные структуры (рис. 1, а также рис. S1–S5 в дополнительных материалах).

Характер спада интенсивности флуоресценции для описанных красителей в органеллах был во многом похож на тот, что наблюдался для различных растворителей (табл. 5). Так, для красителя (I) в клеточных культурах был характерен моноэкспоненциальный спад, в то время как спад флуоресценции красителей (II–IV) лучше описывался биэкспоненциальной кривой. Важно отметить, что реальный анализ изображений FLIM и разделение сигналов опирается не на отдельные компоненты, а на среднее время жизни флуоресценции, в связи с чем нами был проанализирован и этот параметр для различных клеточных локализаций (амплитудно-взвешенное время – t_m , табл. 5).

Как оказалось, инкубация с красителем (II) приводила только к равномерному окрашиванию ЭПР, без затрагивания адипосом. При этом зна-

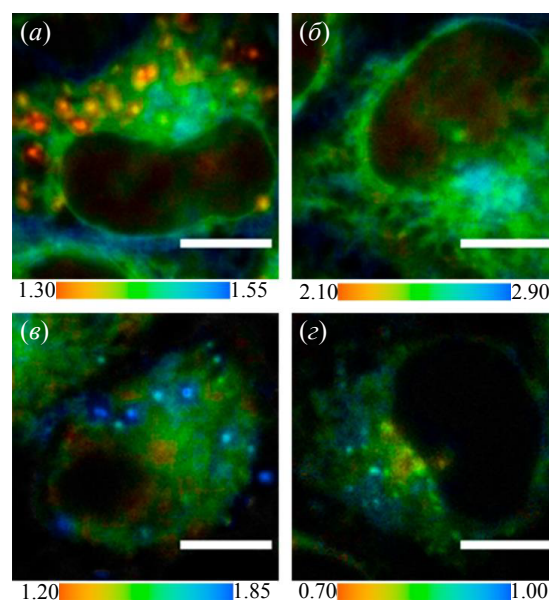


Рис. 1. Микрофотографии живых клеток HeLa Kyoto, окрашенных красителями (I) (а), (II) (б), (III) (в) и (IV) (г), полученные с использованием флуоресцентной времяразрешенной микроскопии. Цветовое кодирование отражает времена жизни флуоресценции красителей в зависимости от их окружения. Соответствующий диапазон времен жизни в наносекундах указан под каждой микрофотографией. Для красителей с двумя спектральными компонентами ((I), (III) и (IV)) в качестве значения времени жизни флуоресценции использовали амплитудно-взвешенное среднее время жизни. Масштабный отрезок – 5 мкм.

Таблица 5. Значения времени жизни флуоресценции анализируемых красителей в ЭПР и адипосомах

Краситель	Локализация	$\tau_1 \pm SD$, нс	A_1 , %	$\tau_2 \pm SD$, нс	A_2 , %	t_m , нс	Количество точек
(I)	ЭПР	1.447 ± 0.013	—	—	—	—	30
(II)		1.320 ± 0.117	44	3.627 ± 0.193	56	2.598 ± 0.042	30
(III)		0.643 ± 0.094	46	2.272 ± 0.153	54	1.514 ± 0.065	30
(IV)		0.646 ± 0.023	92	2.956 ± 0.703	8	0.807 ± 0.034	30
(I)	Адипосомы	1.351 ± 0.041	—	—	—	—	23
(II)		—	—	—	—	—	—
(III)		0.712 ± 0.171	40	2.457 ± 0.298	60	1.742 ± 0.102	13
(IV)		0.649 ± 0.033	89	2.668 ± 0.625	11	0.864 ± 0.032	17

чения среднего времени жизни флуоресценции в ЭПР ($t_m = 2.598$ нс) наиболее соответствуют значениям, полученным для данного красителя в ацетоне ($t_2 = 2.38$ нс).

Красители (I), (III) и (IV) окрашивали и адипосомы, и ЭПР. Разница в амплитудно-взвешенном среднем времени жизни флуоресценции между ЭПР и адипосомами различалась для каждого красителя.

Так, для красителя (IV) значения средних времен жизни у ЭПР и адипосом практически совпадали (0.807 и 0.864 нс соответственно). Полученные значения соответствовали менее представленной спектральной компоненте в тетрагидрофуране ($t_2 = 0.84$ нс). Однако общее поведение не соответствовало ни одному из органических растворителей. Столь незначительная разница по амплитудно-взвешенному времени жизни флуоресценции не позволила осуществить фильтрацию адипосом на микрофотографиях.

Разница между средним временем жизни флуоресценции для ЭПР и адипосом в клетках, инкубированных с красителем (I), оказалась близка к 0.1 нс (1.447 и 1.351 нс соответственно). Данные значения соответствуют мажорным спектральным компонентам в ТГФ ($t_2 = 1.44$ нс) и этаноле ($t_2 = 1.26$ нс) соответственно.

Аналогично, для красителя (III) разница составляет ~0.2 нс (ЭПР – 1.514 нс, адипосомы – 1.742 нс), однако эти значения не соответствовали данным, полученным в органических растворителях.

Мы показали, что различие в амплитудно-взвешенном времени жизни флуоресценции в 0.1 нс и более (соединения (I) и (III)) делает возможным более корректное разделение микрофотографии по цветовым каналам и, как следствие, удаление областей с адипосомами (рис. 2), что, в свою очередь, позволяет повысить селективность окрашивания ЭПР для исследованных красителей.

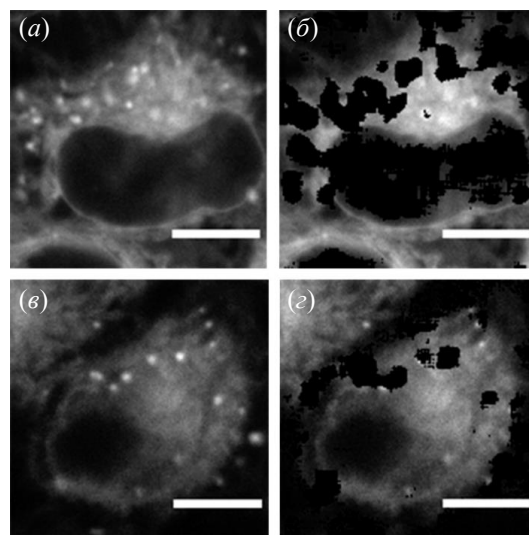


Рис. 2. Микрофотографии живых клеток HeLa Kyoto, окрашенных красителями (I) и (III) до (а, в соответственно) и после (б, г) удаления областей изображений, содержащих липидные капли. Удаление областей, содержащих липидные капли, осуществляли на основании различий времен жизни флуоресценции веществ при их окрашивании ЭПР и липидных капель. Масштабный отрезок – 5 мкм.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез флуорогенов. Соединения (I–IV) получены ранее в нашей лаборатории [12–14].

Спектроскопия времени жизни флуоресценции. Исследовали растворы соединений (I–IV) с концентрацией 1–15 мкМ в разных растворителях. Измерения производили с помощью время-разрешенного флуоресцентного спектрометра miniTau (Edinburgh Instruments, Великобритания) в окнах 10, 20 и 50 нс, разделенных на 1024 временных каналов. Для возбуждения флуоресценции применяли пикосекундный лазер EPL-450 (Edinburgh Instruments, Великобритания) с центральной длиной волны излучения 445.6 нм,

частотой повторений 20 МГц. Счет фотонов осуществляли в спектральных диапазонах 575–625 нм (соединение (I)) и 525–575 нм (соединения (II–IV)). Обработку и визуализацию данных проводили в программе Fluoracle 2.5.1 (Edinburgh Instruments, Великобритания).

Поддержание клеточной культуры. Для поддержания клеточной культуры использовали инкубатор MCO-175 (Sanyo, Япония). Клеточная культура раковой опухоли шейки матки человека HeLa Kyoto была получена из коллекции клеточных линий отдела биофотоники ИБХ РАН. Клетки культивировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в среде DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Cytiva, США), 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия). Для проведения микроскопии клетки высевали на 35-мм конфокальные чашки со смотровым окном 13 мм (SPL, Южная Корея).

Флуоресцентная времяразрешенная микроскопия (FLIM). Микроскопию времени жизни флуоресценции проводили при помощи микроскопа TE-2000U с 100× S Fluor 0.5–1.3 масляным объективом (Nikon, Япония), оборудованного сканирующим конфокальным модулем DCS-120 и детектором PMC-100-1 (Becker&Hickl, Германия). Источник Fianium WhiteLase SC-480-6 с акустооптическим фильтром (AOTF) (NKT Photonics, Дания) использовали для возбуждения флуоресценции, частота повторения импульсов – 60 МГц. Для проведения FLIM клеточную среду заменяли на раствор солей Хэнкса (ПанЭко, Россия) с добавлением 20 мМ HEPES (Corning, США), pH 7, содержащий один из красителей в концентрации 5 мкМ (I), (II) и (IV)) или 10 мкМ (III); красители разводили из 10 мМ стокового раствора в DMSO. Инкубацию в присутствии красителей осуществляли в течение 5 мин. Микроскопию проводили при комнатной температуре и использовали следующий набор эмиссионных фильтров: 580/40 (Omega Optical, США) – для красителей (I) и (II), HQ525/50m (Chroma Technology, США) – для красителя (III) и ET585/40 (Chroma Technology, США) – для красителя (IV). В зависимости от свойств красителей и их склонности к фотообесцвечиванию регистрировали следующее количество фотонов: 100 млн – для красителей (I) и (II), 40 млн – для красителя (III) и 80 млн – для красителя (IV). Флуоресцентные изображения и данные по времени жизни флуоресценции были получены и проанализированы с помощью программного пакета SPCImage (Becker&Hickl, Германия).

Обработка микрофотографий. Полученные микрофотографии в формате “SDT” импортиро-

вали в среду SPCImage с помощью программного компонента M1 SPC-150 Emulation v.9.87 (Main ® Send Data to SPCImage). В качестве области интереса выбирали наиболее равномерный по интенсивности участок ЭПР. Для выбранной области с использованием пространственного бининга устанавливали количество фотонов на пиксель не менее 300; порог визуализации флуоресценции (Threshold) – не менее 20; подбирали экспоненциальную функцию затухания (моноэкспоненциальное или биэкспоненциальное затухание). Заданные параметры принимали и осуществляли расчет матрицы затухания флуоресцентного сигнала (Calculate ® Decay Matrix) только в том случае, если значение распределения времени жизни флуоресценции соответствовало $\chi^2 \leq 1.3$. Далее устанавливали пороговые значения цветового кода на высоте не менее 5% от высоты пика полученной параметрической гистограммы, после чего изменяли цветовую палитру на дискретную и задавали цвета следующим образом: красный – для липидных капель, зеленый – для ЭПР и остальных областей клеток. Изображение с дискретным цветовым кодом и проекцию полной интенсивности в черно-белом цвете экспортировали в формате “TIFF”. Далее файлы обрабатывали с помощью программного пакета ImageJ (NIH, США): цветное изображение разделяли по цветовым каналам (Image ® Color ® Split Channels); изображение для красного канала отбрасывали, а изображение для зеленого канала сохраняли в формате “TIFF”.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием флуоресцентной времяразрешенной микроскопии (FLIM) был изучен набор синтезированных нами ранее флуорогенов ряда арилиден-имидазолонов, преимущественно окрашивающих ЭПР живых клеток. Проведено сравнение поведения красителей в живых клетках и в органических растворителях. Выраженной корреляции между временами жизни в различных средах, а также в адипосомах и ЭПР не выявлено. Показано, что в условиях FLIM фильтрация флуоресцентного окрашивания клеточных оргanelл по среднему времени жизни флуоресценции возможна при разнице значений от 0.1 нс. Таким образом в работе установлено, что использование этого типа флуоресцентной микроскопии позволяет повысить селективность окрашивания ЭПР изученными флуорогенными красителями.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания (номер госрегистрации 124020900020-4).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jana P., Patel N., Mukherjee T., Soppina V., Kanvah S. // New J. Chem. 2019. V. 43. P. 10859–10867. <https://doi.org/10.1039/C9NJ01972C>
2. Plamont M.-A., Billon-Denis E., Maurin S., Gauron C., Pimenta F.M., Specht C.G., Shi J., Quérard J., Pan B., Rossignol J., Moncoq K., Morellet N., Volovitch M., Lescop E., Chen Y., Triller A., Vríz S., Le Saux T., Jullien L., Gautier A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. P. 497–502. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513094113>
3. Szent-Gyorgyi C., Schmidt B.F., Creeger Y., Fisher G.W., Zakel K.L., Adler S., Fitzpatrick J.A.J., Woolford C.A., Yan Q., Vasilev K.V., Berget P.B., Bruchez M.P., Jarvik J.W., Waggoner A. // Nat. Biotechnol. 2008. V. 26. P. 235–240. <https://doi.org/10.1038/nbt1368>
4. Hori Y., Norinobu T., Sato M., Arita K., Shirakawa M., Kikuchi K. // J. Am. Chem. Soc. 2013. V. 135. P. 12360–12365. <https://doi.org/10.1021/ja405745v>
5. Schoen I., Ries J., Klotzsch E., Ewers H., Vogel V. // Nano Lett. 2011. V. 11. P. 4008–4011. <https://doi.org/10.1021/nl2025954>
6. Pal K., Samanta I., Gupta R.K., Goswami D., Koner A.L. // Chem. Commun. (Camb). 2018. V. 54. P. 10590–10593. <https://doi.org/10.1039/C8CC03962C>
7. Hu R., Chen B., Wang Z., Qin A., Zhao Z., Lou X., Tang B.Z. // Biomaterials. 2019. V. 203. P. 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.03.002>
8. Hu P.F., Liu B. // Org. Biomol. Chem. 2016. V. 14. P. 9931–9944. <https://doi.org/10.1039/C6OB01414C>
9. Collot M., Kreder R., Tatarets A.L., Patsenker L.D., Mely Y., Klymchenko A.S. // Chem. Commun. (Camb). 2015. V. 51. P. 17136–17139. <https://doi.org/10.1039/C5CC06094J>
10. Baleeva N.S., Baranov M.S. // Chem. Heterocycl. Comp. 2016. V. 52. P. 444–446. <https://doi.org/10.1007/s10593-016-1909-4>
11. Walker C.L., Lukyanov K.A., Yampolsky I.V., Mishin A.S., Bommarius A.S., Duraj-Thatte A.M., Azizi B., Tolbert L.M., Solntsev K.M. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2015. V. 27. P. 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.06.002>
12. Smirnov A.Y., Perfilov M.M., Zaitseva E.R., Zagudaylova M.B., Zaitseva S.O., Mishin A.S., Baranov M.S. // Dyes and Pigments. 2020. V. 177. P. 108258. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108258>
13. Perfilov M.M., Zaitseva E.R., Smirnov A.Y., Mikhaylov A.A., Baleeva N.S., Myasnyanko I.N., Mishin A.S., Baranov M.S. // Dyes and Pigments. 2022. V. 198. P. 110033. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.110033>
14. Perfilov M.M., Zaitseva E.R., Baleeva N.S., Kublitski V.S., Smirnov A.Y., Bogdanova Y.A., Krasnova S.A., Myasnyanko I.N., Mishin A.S., Baranov M.S. // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. P. 9923. <https://doi.org/10.3390/ijms24129923>
15. Braakman I., Hebert D.N. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2013. V. 5. P. a013201. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013201>
16. Viotti C. // Methods Mol. Biol. 2016. V. 1459. P. 3–29. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3804-9_1
17. Fagone P., Jackowski S. // J. Lipid Res. 2009. V. 50 Suppl. P. S311–S316. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800049-JLR200>
18. Clapham D.E. // Cell. 2007. V. 131. P. 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
19. Celik C., Lee S.Y.T., Yap W.S., Thibault G. // Prog. Lipid Res. 2023. V. 89. P. 101198. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101198>
20. Yousuf M.S., Maguire A.D., Simmen T., Kerr B.J. // Mol. Pain. 2020. V. 16. P. 1744806920946889. <https://doi.org/10.1177/1744806920946889>
21. Park S.-J., Li C., Chen Y.M. // Am. J. Pathol. 2021. V. 191. P. 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.11.006>
22. Jin C., Kumar P., Gracia-Sancho J., Dufour J.-F. // FEBS Lett. 2021. V. 595. P. 1411–1421. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14078>
23. Zeeshan H.M.A., Lee G.H., Kim H.-R., Chae H.-J. // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17. P. 327. <https://doi.org/10.3390/ijms17030327>
24. Farese R.V., Walther T.C. // Cell. 2009. V. 139. P. 855–860. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.005>
25. Onal G., Kutlu O., Gozuacik D., Dokmeci Emre S. // Lipids Health Dis. 2017. V. 16. P. 128. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0521-7>
26. Datta R., Heaster T.M., Sharick J.T., Gillette A.A., Skala M.C. // J. Biomed. Opt. 2020. V. 25. P. 1–43. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.25.7.071203>
27. Hille C., Berg M., Bressel L., Munzke D., Primus P., Löhmansröben H.-G., Dosche C. // Anal. Bioanal. Chem. 2008. V. 391. P. 1871–1879. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2147-0>
28. Koda K., Keller S., Kojima R., Kamiya M., Urano Y. // Anal. Chem. 2022. V. 94. P. 11264–11271. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c01840>

29. Hille C., Lahn M., Löhmansröben H.-G., Dosche C. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2009. V. 8. P. 319–327. <https://doi.org/10.1039/b813797h>
30. Despa S., Vecer J., Steels P., Ameloot M. // *Anal. Biochem.* 2000. V. 281. P. 159–175. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4560>
31. Jahn K., Hille C. // *PLoS One.* 2014. V. 9. P. e105334. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105334>
32. Wilms C.D., Eilers J. // *J. Microsc.* 2007. V. 225. P. 209–213. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2007.01746.x>
33. Okabe K., Inada N., Gota C., Harada Y., Funatsu T., Uchiyama S. // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. P. 705. <https://doi.org/10.1038/ncomms1714>
34. Kuimova M.K. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2012. V. 14. P. 12671–12686. <https://doi.org/10.1039/c2cp41674c>
35. Sha J., Liu W., Zheng X., Guo Y., Li X., Ren H., Qin Y., Wu J., Zhang W., Lee C.-S., Wang P. // *Anal. Chem.* 2023. V. 95. P. 15350–15356. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c03047>
36. Levitt J.A., Chung P.-H., Suhling K. // *J. Biomed. Opt.* 2015. V. 20. P. 96002. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.9.096002>
37. Stöckl M.T., Herrmann A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2010. V. 1798. P. 1444–1456. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.12.015>

The Use of Fluorescence Time-Resolved Microscopy to Increase the Endoplasmic Reticulum Selectivity of Arylidene-Imidazolones Fluorogenic Dyes

A. R. Gilvanov^{*,#}, A. Yu. Smirnov^{*}, S. A. Krasnova^{*}, I. D. Solovyev^{**}, A. P. Savitsky^{**}, Yu. A. Bogdanova^{*}, and M. S. Baranov^{*,***}

[#] E-mail: aidar_gilvanov@mail.ru

^{*} Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{**} A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
Leninskiy prosp. 33/2, 119071 Moscow, Russia

^{***} Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia

Using fluorescence time-resolved microscopy (FLIM), a number of previously synthesized fluorogenic aryliden-imidazolone analogues, predominantly staining the endoplasmic reticulum (ER) of living cells, were studied. It has been shown that the use of this type of fluorescence microscopy can increase the selectivity of ER staining.

Keywords: arylidene-imidazolones, fluorogens, ER, fluorescence lifetime, FLIM