

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ЭЛЕМЕНТООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ
им. А.Н. НЕСМЕЯНОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

УСТИМОВА МАРИЯ АЛЕКСЕЕВНА

**РАЗРАБОТКА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ РЕАГЕНТОВ НА ОСНОВЕ
СТИРИЛОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ДЛЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ
ВИЗУАЛИЗАЦИИ**

1.4.3 – органическая химия

1.4.4 – физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в лаборатории Фотоактивных супрамолекулярных систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (ИНЭОС РАН).

Научные руководители:

Федорова Ольга Анатольевна

доктор химических наук, профессор,
заведующая лабораторией фотоактивных
супрамолекулярных систем ИНЭОС РАН

Федоров Юрий Викторович

доктор химических наук, ведущий научный
сотрудник лаборатории по разработке хелаторов
и их конъюгатов с молекулами-векторами для
получения радиофарм-препаратов ИНЭОС РАН

Официальные оппоненты:

Кузьмин Владимир Александрович

доктор химических наук, профессор,
заведующий лабораторией процессов
фотосенсибилизации Федерального
государственного бюджетного учреждения
науки Институт биохимической физики им.
Н.М. Эмануэля Российской академии наук
(ИБХФ РАН)

Волкова Юлия Алексеевна

кандидат химических наук, старший научный
сотрудник лаборатории химии стероидных
соединений Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Институт
органической химии им. Н. Д. Зелинского
Российской академии наук (ИОХ РАН)

Ведущая организация:

**Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова»**

Защита состоится «15» июня 2023 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.161.01 по присуждению ученой степени кандидата химических наук при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН по адресу: 119991, г. Москва, ул. Вавилова, 28.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНЭОС РАН.

Автореферат диссертации разослан « ____ » мая 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.1.161.01,
кандидат химических наук



Ольшевская В.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В последние годы в молекулярной и клеточной биологии, в области биомедицины и биофизики особое внимание уделяется развитию новых методов исследования, основанных на использовании флуоресценции. Одной из причин этого является высочайшая чувствительность флуоресцентных методов, которая зачастую превосходит не только чувствительность методов, основанных на поглощении света, но и методов, базирующихся на использовании радиоактивных изотопов. Действительно, современные инструменты и методики позволяют регистрировать флуоресцентный сигнал даже от отдельных молекул, что способствовало появлению и развитию метода одномолекулярной флуоресцентной спектроскопии, широко востребованного для исследования отдельных молекул в их динамике.

Малые флуоресцентные молекулы являются незаменимыми инструментами в биологии, они повсеместно используются в качестве молекулярных зондов, индикаторов окружающей среды и клеточных красителей.

Молекула-метка может содержать реакционноспособную функциональную группу для ковалентного присоединения к представляющей интерес биомолекуле. С другой стороны, нефункционализирующая маркерная молекула способна демонстрировать сильное нековалентное взаимодействие с биомолекулой, что делает возможным образование стабильного комплекса. Нековалентное мечение биомолекул может включать ионные, электростатические, гидрофобные взаимодействия и связывание с помощью водородных связей. Хотя взаимодействия при нековалентном мечении значительно менее прочны, чем ковалентные связи, они происходят с большей скоростью и в физиологических условиях.

Степень разработанности темы исследования. Одними из используемых классов флуорофоров для биологии и медицины служат цианиновые и стироловые красители. Они нашли применение в том числе и в качестве красителей, нековалентно связывающихся с биологическими молекулами. При использовании данных красителей для нековалентного флуоресцентного мечения применяется эффект увеличения интенсивности флуоресцентного отклика, наблюдаемый в некоторых флуорогенных красителях при иммобилизации. В свободном, неиммобилизованном состоянии такие красители слабо флуоресцируют из-за наличия каналов безызлучательной релаксации возбужденного состояния, таких как образование нефлуоресцирующих «скрученных» TICT-состояний (*англ.* Twisted Intramolecular Charge Transfer, внутримолекулярный перенос заряда, приводящий к скрученному состоянию с переносом заряда) в полярных средах или *E-Z*-изомеризация по двойной C=C связи. В обоих случаях усиление флуоресценции может наблюдаться в полостях белков, способных затруднять внутреннее вращение или изомеризацию, как это было показано в ранних работах по получению антител, индуцирующих флуоресценцию флуорогенных молекулярных роторов и *транс*-стильбенов.

В настоящей диссертационной работе предметом исследования стали моно- и бисстириловые красители. Их характеристики соответствуют требованиям, предъявляемым к флуоресцентным реагентам, используемым для биохимических и медицинских целей. К ним относятся высокий квантовый выход флуоресценции, большой Стоксов сдвиг, высокая фотостабильность и низкая цитотоксичность. Кроме того, стироловые красители отличаются более простыми и доступными методами синтеза и высокой фотостабильностью по сравнению с широко используемыми в настоящее время цианиновыми красителями.

Цели и задачи работы. В ходе диссертационного исследования преследовались следующие цели:

1. Разработка методов получения новых моно- и бисстириловых производных различного состава и строения. Изучение их оптических и фотофизических свойств.
2. Исследование возможности использования фотоиндуцированного переноса энергии в структуре краун-содержащего бисхромофорного стирилового производного для распознавания различных катионов металлов в растворах и клетках.
3. Изучение взаимодействия бисстириловых производных, хромофоры которых соединены между собой через гетероциклические фрагменты (тип «голова к голове»), с ДНК. Анализ влияния структуры бисстириловых красителей на образование ДНК-индуцированных агрегатов.
4. Изучение окрашивания ДНК и РНК бисстириловыми красителями, хромофоры которых соединены через гетероциклический и О-фенильный фрагмент (тип «голова к хвосту»), в растворах и клетках.

Научная новизна. Разработаны методы синтеза неописанных ранее моностириловых производных, гомодимерных и гетеродимерных бисстириловых красителей.

Показано влияние комплексообразования краун-содержащего бисстирилового красителя с различными катионами металлов на оптические характеристики и протекание фотоиндуцированного переноса энергии между хромофорными фрагментами молекулы.

При взаимодействии с дц-ДНК симметричных бисстириловых красителей, хромофорные фрагменты которых были соединены через гетероциклический фрагмент, обнаружено образование агрегатов различной хиральности.

В работе впервые изучено взаимодействие бисстириловых красителей типа «голова-к-хвосту» с дц-ДНК тимуса теленка и РНК печени теленка. Обнаружены несимметричные бисстириловые красители, способные демонстрировать флуоресцентный отклик на присутствие ДНК, находящейся в смеси с РНК.

Найден и количественно охарактеризован фотоиндуцированный перенос энергии в несимметричных бисстириловых красителях, протекание которого сохраняется в комплексе с катионами металлов, с биомолекулой, а также во внутриклеточной среде.

На серии соединений одного состава, но с различной организацией стириловых фрагментов, выявлено влияние структурной организации бисстириловых красителей на связывание с ДНК.

Практическая и теоретическая и значимость. 1) Результаты проведенных исследований показали, что полученный краун-содержащий бисстириловый краситель может использоваться для распознавания катионов металлов различной природы и ратиометрического детектирования ионов Hg^{2+} в живых клетках A549. 2) Синтезированные бисстириловые красители при связывании с ДНК демонстрировали значительное разгорание флуоресценции, что свидетельствует о перспективности предложенных структур в качестве флуоресцентных маркеров для детектирования ДНК. 3) Бисстириловые красители типа «голова к хвосту» демонстрировали большую селективность при связывании с ДНК, чем с РНК и низкую токсичность, и могут использоваться для визуализации ДНК *in vitro*.

Методология и методы диссертационного исследования основаны на анализе литературных данных, разработке методов синтеза из коммерчески доступных реагентов. Все полученные соединения были охарактеризованы с использованием физико-химических методов анализа, включая 1H , ^{13}C ЯМР спектроскопию, в том числе двумерную, электронную спектроскопию и масс-спектрометрию. Комплексообразование синтезированных лигандов с

катионами металлов и ДНК/РНК изучалось с использованием оптической, КД- и ЯМР-спектроскопии, для расчета констант устойчивости комплексов использовали программу SpecFit-32. Для анализа результатов взаимодействия красителей с ДНК были проведены квантово-химические расчеты с использованием молекулярной динамики. Синтезированные красители исследовались в биологических экспериментах *in vitro* на клетках A549.

Основные положения, выносимые на защиту.

- Условия получения и синтез новых моностириловых производных, гомо- и гетеродимерных бисстириловых красителей различного состава и строения.
- Краун-содержащий бисстириловый краситель как сенсор для распознавания различных катионов металлов в среде ацетонитрила и для количественного определения ионов ртути в водной среде и *in vitro*.
- Использование FRET-процесса между хромофорами для создания красителей с большим Стоксовым сдвигом для биовизуализации.
- Бисстириловые красители как эффективные зонды для распознавания биомолекул ДНК/РНК.

Личный вклад автора. Автор диссертации участвовал в анализе литературных данных, обсуждении задач, решаемых в диссертационной работе, подготовке и проведении экспериментов, разработке методик синтеза новых соединений, интерпретации полученных результатов и их обобщении, формулировке основных научных выводов, а также в написании научных публикаций и представлении докладов по теме диссертации на конференциях различного уровня.

Достоверность полученных результатов в работе следует из надежного установления структур полученных в работе соединений совокупностью физико-химических методов анализа; отсутствие противоречий между выводами, сделанными в результате выполнения работы, и известными литературными данными; экспертной оценки ред.коллегий высокоцитируемых журналов, в которых были опубликованы результаты данной работы.

Апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 9 статей (6 – в научных изданиях, рекомендованных ВАК, 3 – в журнале, включенном в РИНЦ) и 12 тезисов докладов. Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях: 2nd International Symposium “Noncovalent Interactions in Synthesis, Catalysis, and Crystal Engineering” (Москва, Россия, 2022); Самоорганизация в «мягких» средах: достижения и современное состояние (Москва, Россия, 2022); XXIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов–2022» (Москва, Россия, 2022); VII Международная конференция «Супрамолекулярные системы на поверхности раздела» (Туапсе, Россия, 2021); The XII International Conference on Chemistry for Young Scientists «MENDELEEV 2021» (Санкт-Петербург, Россия, 2021); International Conference "Chemistry of Organoelement Compounds and Polymers 2019" (Москва, Россия, 2019); XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Санкт-Петербург, Россия, 2019); 1st International Conferences on Noncovalent Interactions (ICNI-2019) (Лиссабон, Португалия, 2019); VIII Молодежная конференция ИОХ РАН (Москва, Россия, 2019); Кластер конференций 2018 "Solvation, Crystallization, Smart materials" (Суздаль, Россия, 2018); IX международная конференция "Инновации в химии: достижения и перспективы" форума студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов - 2018" (Москва, Россия, 2018); 16th International seminar on inclusion compounds (ISIC 16) and 3rd Youth school on supramolecular and coordination chemistry (Казань, Россия, 2017).

Данная работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 18-33-20111, 19-03-00535, 19-03-00625, 20-33-90307, РНФ № 16-13-10226, 17-73-30036, 19-73-20187, 21-73-20158.

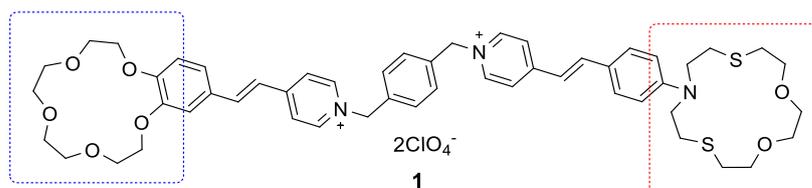
Автор выражает особую благодарность к.х.н. Панченко П.А., к.х.н. Рулевой А.Ю., к.х.н. Бердниковой Д.В., к.х.н. Цветкову В.Б., к.х.н. Павловой М.А., к.х.н. Алиеву Т.М., к.х.н. Токареву С.Д., Ефременко А.В., д.х.н. Феофанову А.В., Чмелюк Н.С. и к.х.н. Абакумову М.А. за участие в постановке экспериментов и обсуждении полученных результатов на разных этапах работы.

Объем и структура работы. Диссертация общим объемом 160 страниц состоит из введения, литературного обзора, обсуждения полученных результатов, экспериментальной части, выводов, списка литературы и содержит 88 схем, 7 таблиц, 40 рисунков. Список литературы включает 211 наименований.

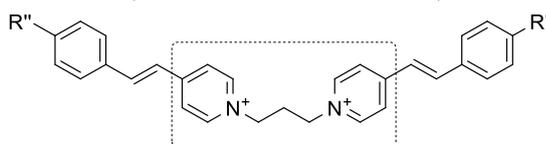
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

В ходе работы была синтезирована и исследована серия гомо- и гетеро-димерных бисстирилпиридиниевых красителей, содержащих в фенильном ядре алкокси- и диалкиламино- группы. Исходя из структурных особенностей, объекты исследования были разделены на четыре группы:

1. Бисстириловый краситель, содержащий два краун-эфирных фрагмента с различным сочетанием гетероатомов (**1**).



2. Бисстириловые красители симметричного (**2**, **3**) и несимметричного строения (**4**), хромофоры которых соединены между собой алифатическим линкером через гетероциклические фрагменты (тип «голова к голове»).

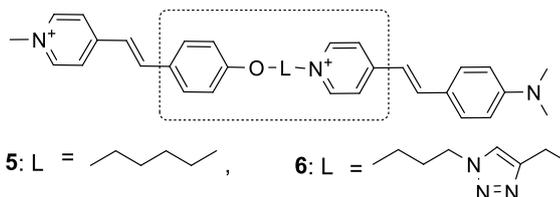


2: R' = R'' = OMe

3: R' = R'' = NMe₂

4: R' = OMe, R'' = NMe₂

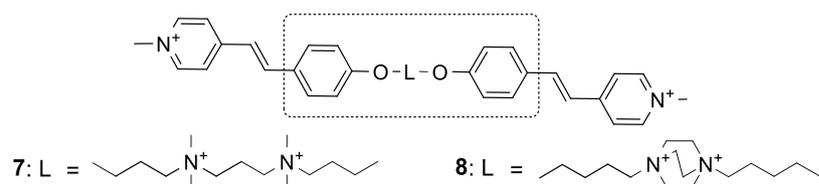
3. Бисстириловые красители несимметричного строения, хромофоры которых соединены между собой алифатическим (**5**) и триазолсодержащим линкером (**6**) через гетероциклический и О-фенильный фрагмент (тип «голова к хвосту»).



5: L =

6: L =

4. Бисстириловые красители симметричного строения (**7**, **8**), хромофоры которых соединены между собой линкером, содержащим положительно заряженные четвертичные атомы азота, через О-фенильные фрагменты (тип «хвост к хвосту»).



Синтез бисстириловых красителей

Синтез краун-содержащего бисстирилового красителя

Ранее в лаборатории фотоактивных супрамолекулярных систем ИНЭОС РАН были опробованы различные методы синтеза данного класса соединений. Для получения краун-содержащего бисстирилового красителя **1** была предложена следующая схема синтеза (Схема 1).

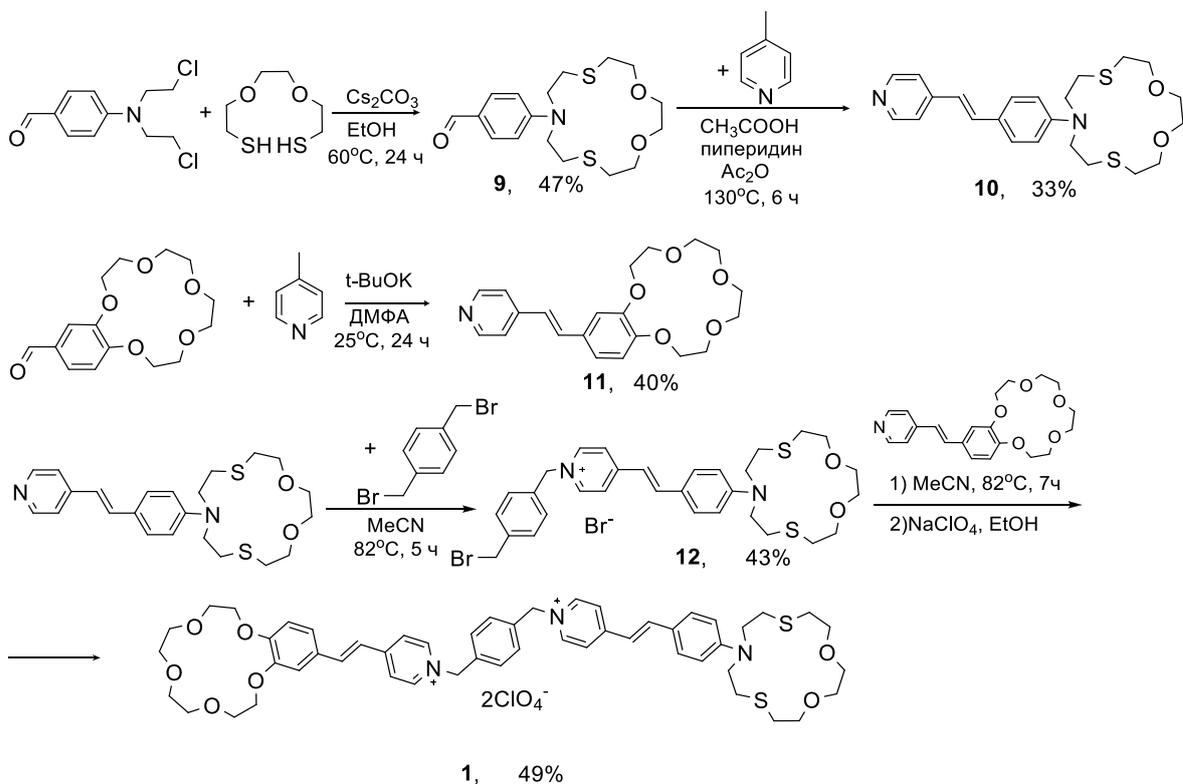


Схема 1

На первой стадии осуществлялся синтез двух незаряженных стириловых красителей, содержащих различные краун-эфирные фрагменты **10** и **11**. Для получения азадитиакраун-содержащего бензальдегида проводилась макроциклизация между 4-(бис(2-хлорэтил)амино)бензальдегидом и 2,2'-(этилендиокси)диэтантоиолом в сильно разбавленном растворе в присутствии карбоната цезия в качестве основания. Реакцию конденсации полученного бензальдегида **9** с 4-пиколином далее проводили в условиях кислотного катализа, поскольку проведение данной реакции в условиях кислотного (в среде уксусного ангидрида) или основного (в присутствии органического или неорганического основания) катализа не приводило к получению продукта. Для получения кислородсодержащего стирилпиридина **11** аналогично проводили реакцию конденсации между соответствующим бензальдегидом и 4-пиколином, но в присутствии *t*-BuOK в качестве основания. Следующим этапом была реакция кватернизации моностирилового красителя **10** *n*-бисбромметилбензолом. Заключительной стадией была кватернизация соединения **11** полученным полупродуктом **12**. Конечный бисстириловый краситель был переведен в перхлорат **1**.

Синтез бисстириловых красителей типа «голова к голове»

Для синтеза гомодимерных бисстириловых красителей, хромофорные фрагменты которых связаны между собой через гетероциклические фрагменты, была предложена схема синтеза, где на первом этапе реакцией конденсации 4-пиколина и соответствующего бензальдегида получали незаряженный моностириловый краситель (**13**, **14**) и далее его вводили в реакцию кватернизации с недостатком 1,3-дибромпропана (Схема 2). Выделение продуктов реакции **2**, **3** проводили с помощью колоночной хроматографии.

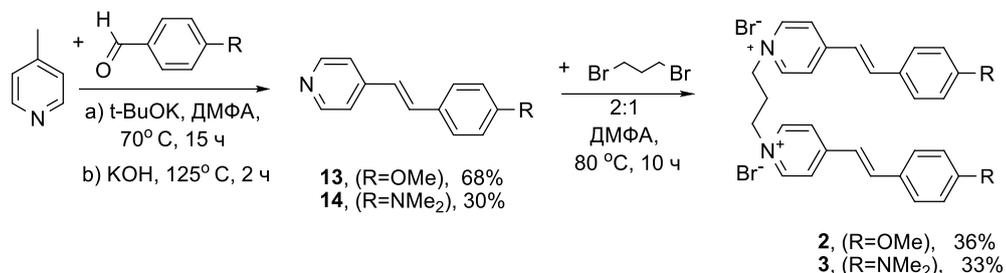


Схема 2

Для синтеза гетеродимерного красителя **4** было предложено несколько путей синтеза. По первому методу (Схема 3) вначале проводили кватернизацию 4-*n*-метоксистирилпиридиниевого красителя с 1,3-дибромпропаном. Далее полупродуктом **15** кватернизовали 4-пиколин, а на заключительной стадии проводили конденсацию с 4-диметиламинобензальдегидом. В ходе реакции по ТСХ наблюдали появление продукта конденсации, однако его выделение в чистом виде осложнялось тем, что исходное соединение **16** и конечный бисстириловый краситель **4** являются солями с двухзарядными катионами, и разделение такой смеси с помощью колоночной хроматографии не представляется возможным.

Метод 1

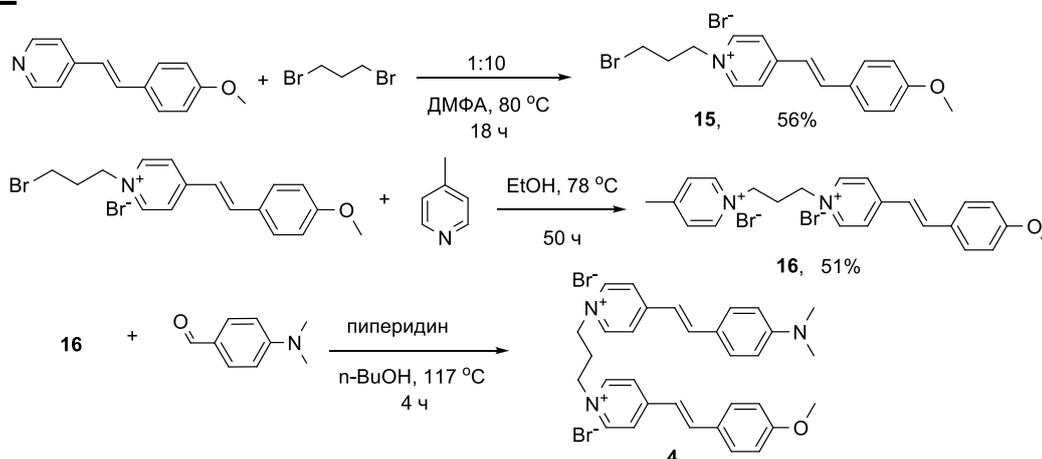


Схема 3

Поэтому был предложен альтернативный путь синтеза (метод 2, Схема 4), где на первом этапе проводили монокватернизацию стирилового красителя **14** с избытком 1,3-дибромпропана, и далее полученным полупродуктом **17** кватернизовали 4-*n*-метоксистирилпиридин. Были опробованы различные условия синтеза, но целевой продукт был получен только при добавлении йодида калия. С помощью элементного анализа было подтверждено содержание йода, которое соответствует расчётному значению, а также следовые количества брома, что говорит о наличии йода в молекуле в качестве противоиона.

Метод 2

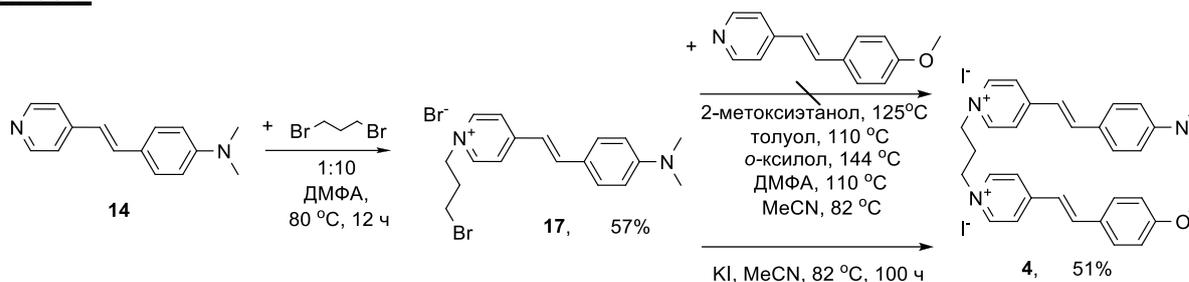


Схема 4

Синтез бисстириловых красителей типа «голова к хвосту»

Для получения гетеродимерного бисстирилового красителя, хромофорные фрагменты которого были соединены через гетероциклический и О-фенильный фрагмент алифатическим линкером, была предложена схема синтеза (метод 1, Схема 5), где на последней стадии проводилась реакция О-алкилирования. На первом этапе получали заряженный 4-гидроксистирилпиридиниевый краситель **18**. Поскольку реакция проводилась между 4-гидроксibenзальдегидом и тозилатом 1,4-диметилпиридиния, были подобраны более мягкие условия конденсации, где в качестве основания использовали пиперидин, а растворитель – этанол. Далее полученный моностирил **18** вводили в реакцию алкилирования с моностирилом **17**. Но выделить продукт в чистом виде и охарактеризовать не удалось.

Метод 1

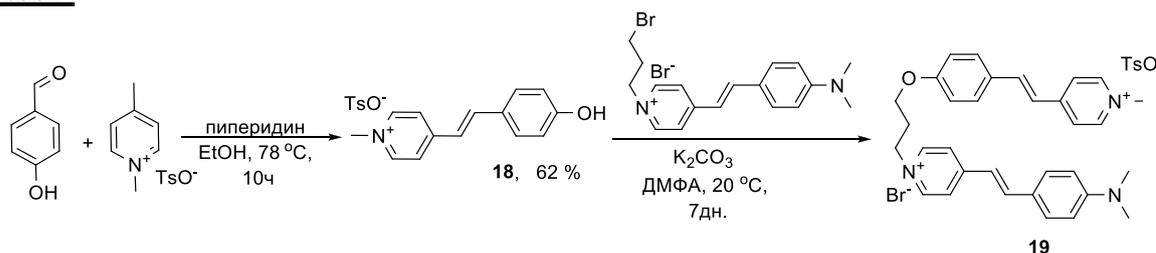


Схема 5

Была предложена альтернативная схема синтеза (метод 2, Схема 6) аналогичная получению несимметричного красителя **4**. На первой стадии проводилась реакция алкилирования 4-гидроксibenзальдегида и 1,4-дибромбутана. Затем полученный бензальдегид **20** вводили в реакцию конденсации с йодидом 1,4-диметилпиридиния в присутствии пиперидина в этаноле. Как и в схеме 4 заключительной стадией была реакция кватернизации 4-*n*-диметиламинострилпиридина и полупродукта **21** в присутствии йодида калия. В результате реакции был получен гетеродимерный краситель **5**, где по элементному анализу был подтвержден I⁻ в качестве противоиона.

Метод 2

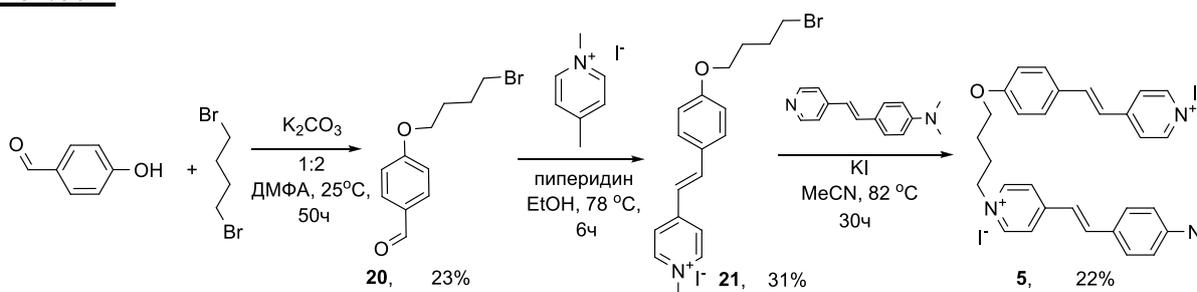


Схема 6

Объединение хромофоров в структуре бисстирилового красителя через гетероциклический и О-фенильный фрагмент было осуществлено с использованием клик-реакции с образованием

триазольного фрагмента в качестве линкера. Для синтеза такой структуры на первом этапе синтезировали моностириловые красители, содержащие азидную (**24**) и пропаргильную (**26**) группы (Схема 7). При получении азид-содержащего моностирилового красителя на первой стадии проводили реакцию кватернизации 4-пиколина с 1,3-дибромпропаном, где для получения моно-продукта использовался пятикратный избыток дибромид. Далее с использованием азид натрия проводили замену брома. Реакция конденсации 4-диметиламинобензальдегида и полупродукта **23** приводила к получению моностирилового красителя, содержащего азидную-группу (**24**). Для получения ацетилен-содержащего моностирилового красителя на первом этапе проводилась реакция алкилирования 4-гидроксибензальдегида и бромпропаргила. Далее реакция конденсации приводила к получению моностирилового красителя, содержащего ацетиленовую группу (**26**). Заключительной стадией получения бисстирилового красителя являлась клик-реакция, которая проводилась в присутствии основания DIPEA и каталитических количеств CuI, что не приводило к замещению противоиона Br⁻ на I⁻ в структуре красителя **6**.

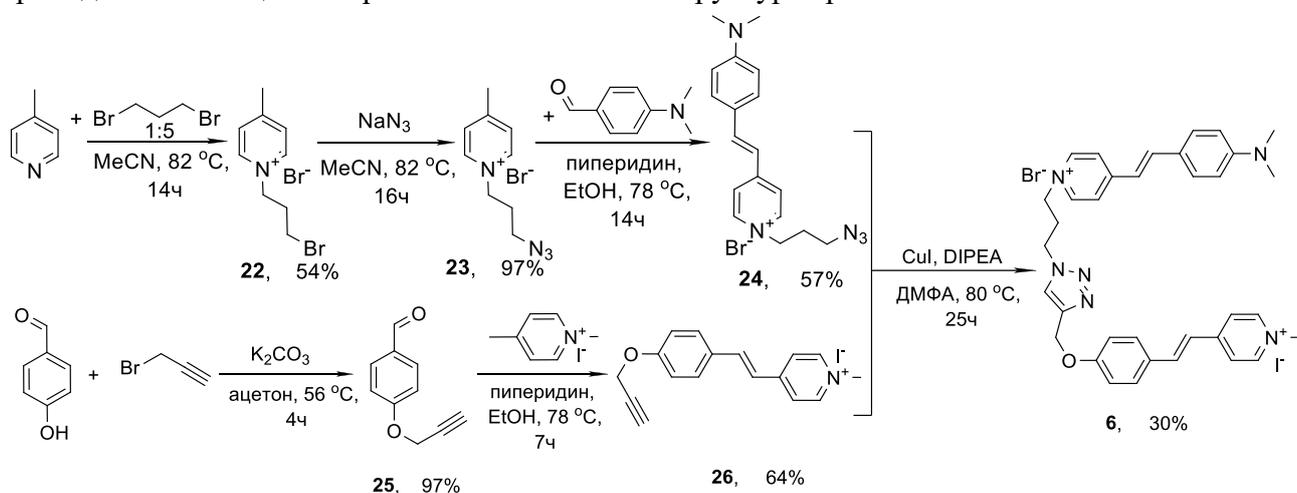


Схема 7

Полученные бисстириловые красители были выделены в виде *E*-изомеров, что было подтверждено величинами констант спин-спинового взаимодействия протонов C=C связи стироловых фрагментов, находящимся в интервале $J_{trans} \sim 15.6 - 16.2$ Гц. Структуры всех полученных соединений были доказаны с помощью методов ЯМР-спектроскопии, ИЭР-масс-спектрометрии и элементного анализа.

Оптические свойства бисстириловых красителей

В исследуемых нами структурах бисстириловых красителей присутствуют две различные хромофорные системы, где в качестве акцептора выступает 1-метил-пиридиниевый фрагмент, а в качестве донора - метокси- (**m₁**) и диметиламино- (**m₂**) фрагменты в *para*-положении фенильной группы. Спектр поглощения моностириловых красителей в воде характеризуется длинноволновой полосой поглощения (ДПП), соответствующей внутримолекулярному процессу переноса заряда с электронодонорной метокси- или диметиламино-группы на метилпиридиниевый фрагмент (Рисунок 1, Таблица 1). Максимум полосы поглощения красителя **m₁** при 370 нм расположен в более коротковолновой области относительно красителя **m₂** с максимумом при 445 нм, что объясняется различием в донорности фрагментов. Красители имеют большой Стоксов сдвиг (более 100 нм), максимумы эмиссии находятся в области 500 нм (краситель **m₁**) и 620 нм (краситель **m₂**). Невысокие значения квантовых выходов флуоресценции (1.2% - для красителя **m₁**, 0.26% - для красителя **m₂**) могут быть

объяснены фотоиндуцированными безызлучательными процессами релаксации: *E-Z*-изомеризацией и образованием ТИСТ-состояний, которые подавляют флуоресценцию красителей.

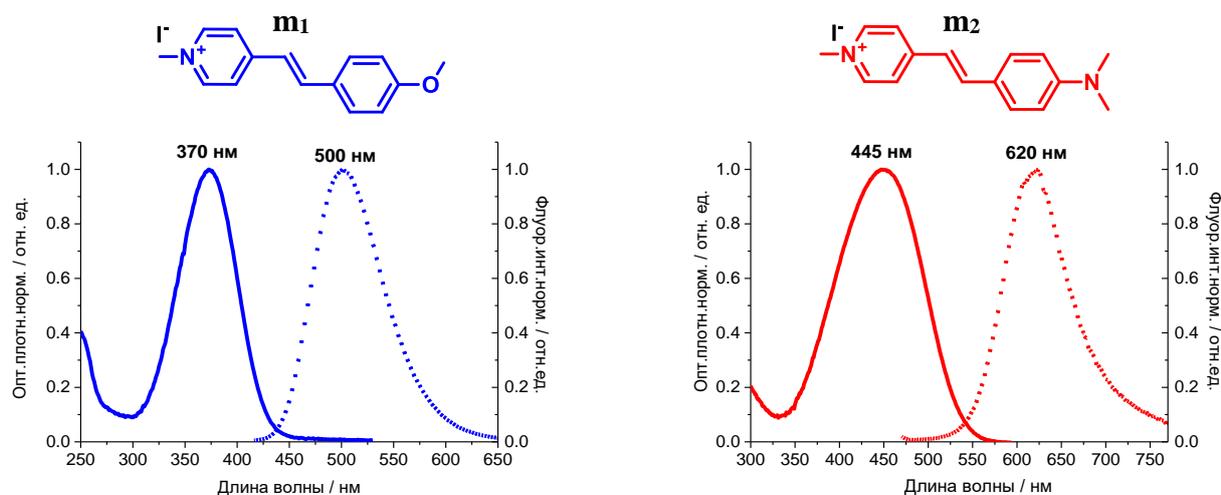


Рисунок 1. Нормализованные спектры поглощения и флуоресценции моностириловых красителей **m₁**, **m₂** в натрий-фосфатном буфере.

Таблица 1. Основные характеристики спектров поглощения и эмиссии соединений **m₁**, **m₂**, **1-6** в натрий-фосфатном буфере (кроме **1*** – в MeCN).

Соединение	$\lambda_{\text{макс}}^{\text{полг}}$, нм	$\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}}$, нм	ε_{λ} , $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	$\varphi^{\text{фл}}$, %	Стоксов сдвиг, cm^{-1}
m₁	372	500	26960	1.2	6882
m₂	450	620	28800	0.26	6093
1*	415, 486	618	31800, 29600	1.9	4395
1	402, 469	603	32700, 22950	1.5	4738
2	380	510, 694	47435	0.47	6708
3	468	627	58235	0.05	5419
4	401, 503	500, 623	35850, 20650	0.04	4938, 3829
5	380, 471	502, 610	49715, 19440	0.12	6396, 4838
6	380, 482	508, 617	40940, 24640	0.08	6631, 4539

Для симметричных бисстириловых красителей **2**, **3** максимумы ДПП батохромно сдвинуты (~8-18 нм) по сравнению с максимумами соответствующих моностириловых красителей **m₁**, **m₂** (Рисунок 2, Таблица 1), что может быть объяснено повышенной поляризацией хромофоров и, следовательно, более выраженным ИСТ-взаимодействием (*англ.*, Intramolecular Charge Transfer, внутримолекулярный перенос заряда), обусловленным близостью двух положительных зарядов в структуре. Поскольку гомодимерные красители **2**, **3** содержат в структуре два одинаковых хромофора, их значения коэффициентов экстинкции примерно в 2 раза выше аналогичных значений для красителей **m₁**, **m₂**. Максимумы эмиссии бисстириловых красителей **2**, **3** также оказались батохромно сдвинуты (~7-10 нм) относительно максимумов флуоресценции моностириловых красителей, а значения квантовых выходов флуоресценции оказались ниже. В спектре испускания метокси-бисстирилового красителя **2** помимо коротковолновой полосы при 510 нм присутствует широкая полоса с максимумом 694 нм, которая соответствует флуоресценции эксимера данного соединения (Рисунок 2b).

На спектрах поглощения гетеродимерных бисстириловых красителей **4**, **5**, **6** наблюдаются две полосы с максимумами в области 390 и 500 нм (Рисунок 3, Таблица 1), что соответствует

наличию двух различных хромофоров в структуре красителей. Однако максимумы ДПП бисстириловых красителей батохромно сдвинуты по сравнению с моностириловыми, причем наиболее сильные сдвиги наблюдаются у красителя **4**. Также сильно отличаются коэффициенты экстинкции монохромофоров в структуре бисстирила, это объясняется тем, что более широкая полоса поглощения диметиламино-хромофора накладывается на полосу метокси-хромофора. Несмотря на схожесть структуры красителей **4-6** их спектры испускания заметно различались (Рисунок 3). Во всех трех случаях красители облучались светом короткой длины волны (~380-400 нм), при этом в случае красителей **4, 6** наблюдалась двухполосная флуоресценция с максимумами при 500 и 617 нм, а для красителя **5** спектр представлял собой полосу при 500 нм с плечом при 610 нм. При облучении красителей светом длиной волны ~480 нм спектр флуоресценции характеризовался однополосным сигналом при 620 нм.

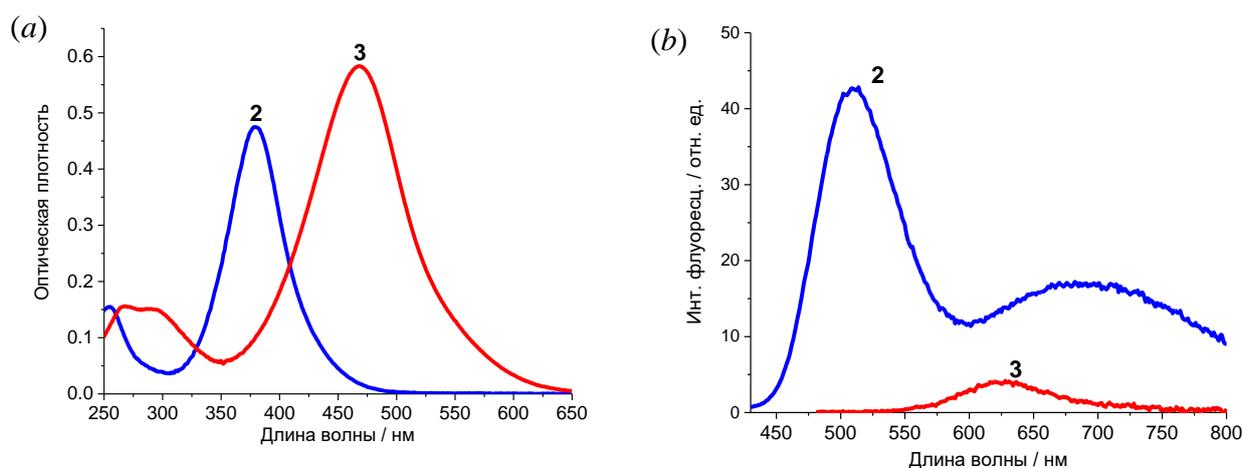


Рисунок 2. Спектры поглощения (a) и флуоресценции (b) бисстириловых красителей **2, 3** в натрий-фосфатном буфере ($C = 10 \mu\text{M}$), $\lambda_{\text{возб}}^2 = 360 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{возб}}^3 = 470 \text{ нм}$.

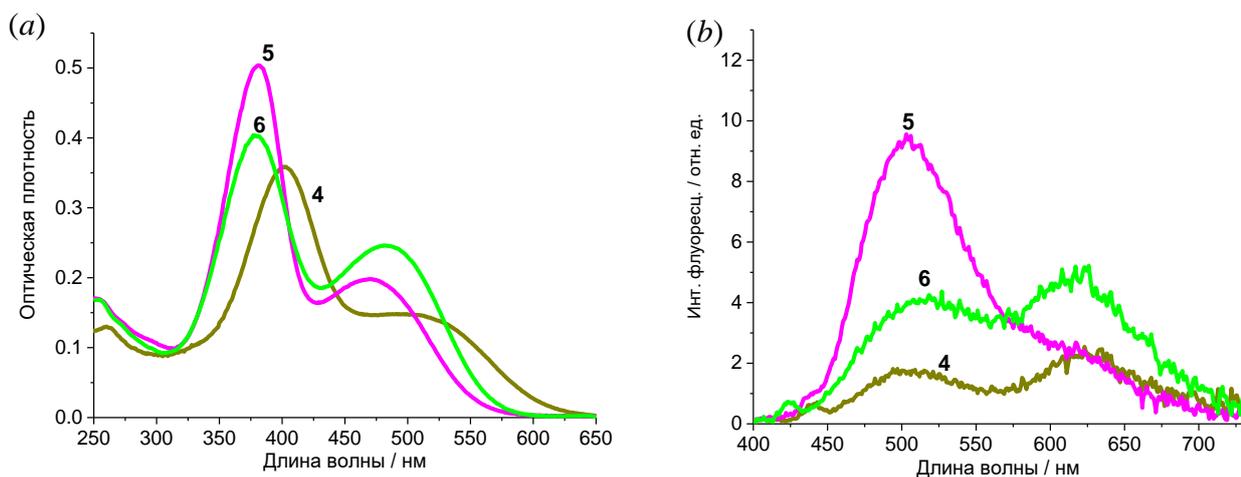


Рисунок 3. Спектры поглощения (a) и флуоресценции (b) бисстириловых красителей **4, 5, 6** в натрий-фосфатном буфере ($C = 10 \mu\text{M}$), $\lambda_{\text{возб}}^4 = \lambda_{\text{возб}}^5 = 380 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{возб}}^6 = 370 \text{ нм}$.

Квантовые выходы флуоресценции красителей **4, 5, 6** достаточно низки и лежат в диапазоне 0.04 - 0.12 % (Таблица 1). Полученные спектры испускания несимметричных красителей при облучении светом короткой длины волны (~380-400 нм) свидетельствуют о возможности протекания процесса фотоиндуцированного внутримолекулярного переноса энергии между хромофорами красителя.

Фотоиндуцированный безызлучательный перенос энергии в несимметричных бисстириловых красителях 1, 4, 5, 6

В исследуемых нами несимметричных красителях **1**, **4**, **5**, **6** донором энергии электронного возбуждения является хромофор, содержащий алкокси-фрагмент (О-хромофор), максимум ДПП которого располагается в области 390 нм. В качестве акцептора энергии выступает диалкиламино-моностириловый фрагмент (N-хромофор), максимум ДПП которого находится в области 480 нм. Как показано на рисунке 4, условие перекрывания спектра флуоресценции донора энергии (О-хромофор) со спектром поглощения акцептора энергии (N-хромофор) выполняется, что обеспечивает возможность протекания резонансного переноса энергии (FRET) в рассматриваемых бисхромофорных системах.

Для эффективности FRET расстояние между донором и акцептором должно находиться в диапазоне приблизительно 10-100 Å. Расстояния между хромофорами (r) было найдено из оптимизированной геометрии основного состояния каждого из бисстириловых красителей **1**, **4**, **5**, **6**, значения которых лежат в диапазоне 12.3 – 18.8 Å (Таблица 2).

Таблица 2. Расчётное расстояние между хромофорами в структурах бисстириловых красителей **1**, **4**, **5**, **6**.

Соединение	1	4	5	6
Расчетное r / Å	15.3	12.3	15.6	18.8

Также для оценки возможности протекания переноса энергии было проведено электрохимическое исследование. Анализ полученных вольтамперограмм позволил рассчитать значения уровней энергии ВЗМО (высшая занятая молекулярная орбиталь) – НСМО (низшая свободная молекулярная орбиталь) хромофоров, взаимное расположение которых изображено на рисунке 5.

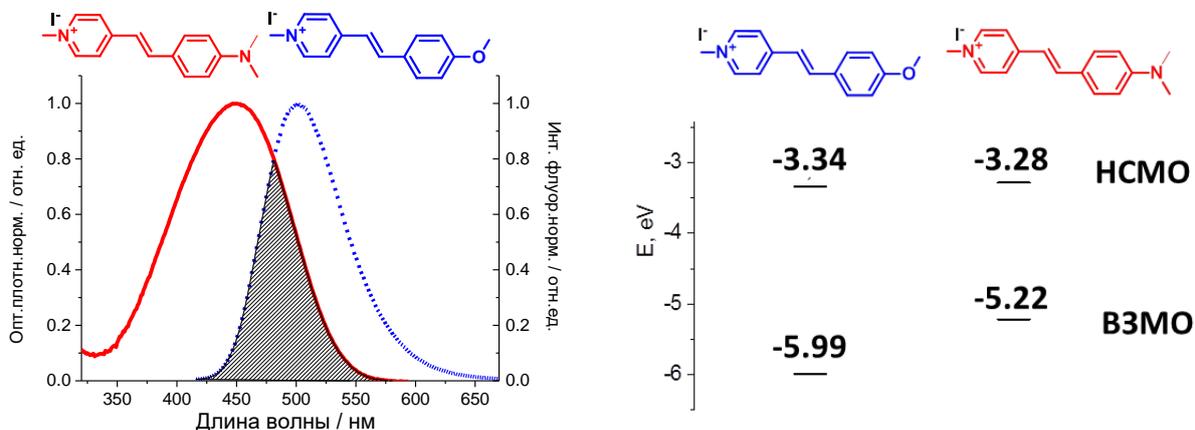


Рисунок 4. Перекрывание спектра флуоресценции красителя m_1 и спектра поглощения красителя m_2 . **Рисунок 5.** Взаимное расположение ВЗМО-НСМО красителей m_1 и m_2 , полученное из электрохимических данных.

Как показано на рисунке 5, НСМО О-хромофора и N-хромофора близки по энергии. Они расположены на положительно заряженных пиридиниевых фрагментах. ВЗМО обоих хромофоров локализованы на донорных алкокси- и диалкиламино-фрагментах. Энергетическая щель ВЗМО-НСМО у красителя m_2 меньше, чем у m_1 , поэтому протекание переноса энергии от О-хромофора к N-хромофору в системе, содержащей два таких моностириловых фрагмента возможно.

Для фотоиндуцированного переноса энергии характерно полное или частичное тушение флуоресценции хромофора-донора, что мы использовали для расчёта эффективности протекания данного процесса (Рисунок 6). Используя интенсивности излучения бисхромофора **6** и эквимольярной смеси m_1 и m_2 при 500 нм, где акцепторный хромофор не флуоресцирует, эффективность переноса энергии была рассчитана согласно уравнению (1) и составила 93%

$$\Phi_{\text{RET}} = 1 - \frac{I}{I_0} = 93\% \quad (1)$$

Аналогично были рассчитаны значения эффективности переноса энергии для красителей **1**, **4**, **5** (Таблица 3), значения которых превышали 80%.

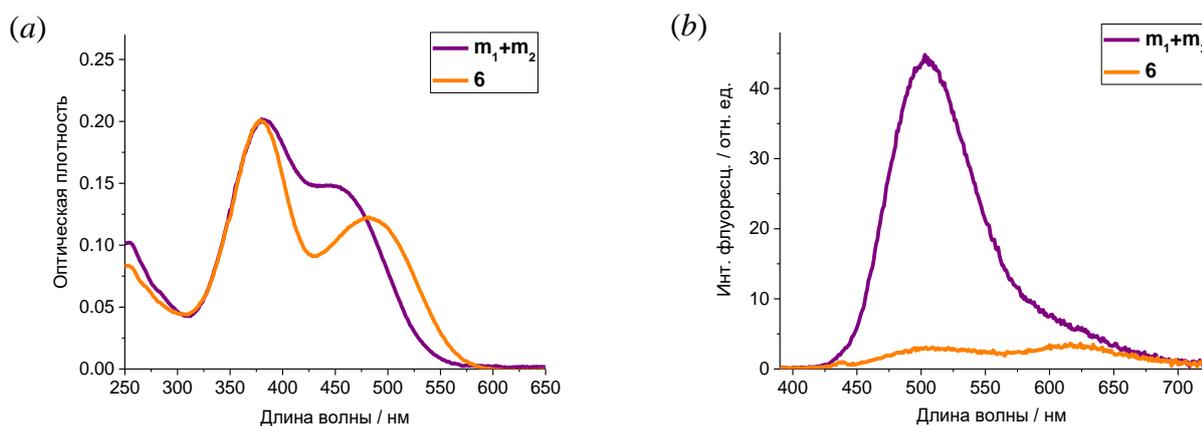


Рисунок 6. Спектры поглощения (a) и флуоресценции (b) бисстирилового красителя **6** и эквимольярной смеси моностириловых красителей m_1 и m_2 в натрий-фосфатном буфере при ($C_6 = C_{m1} = C_{m2} = 20 \mu\text{M}$), $\lambda_{\text{возб}}^{m1+m2} = \lambda_{\text{возб}}^6 = 380 \text{ нм}$.

Таблица 3. Значения эффективности FRET-процесса в бисстириловых красителях **1**, **4**, **5**, **6**.

Соединение	1 *	4	5	6
Эффективность FRET, %	84	97	81	93

* - для красителя **1** приводится эффективность переноса энергии в воде, где в качестве эквимольярной смеси использовалась смесь соответствующих краун-содержащих моностириловых красителей.

Комплексообразование краун-содержащего бисстирилового красителя **1** с катионами металлов в MeCN

Ранее в нашей лаборатории с помощью спектрофотометрического титрования было изучено комплексообразование бисстирилового красителя **1** с катионами Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , H^+ , Hg^{2+} , Ag^+ . Выбор анализируемых ионов металлов проводился на основе предыдущего изучения сотрудниками нашей лаборатории комплексообразования различных хромофоров, содержащих аналогичные краун-эфирные фрагменты. В данной работе с помощью методов спектроскопии и флуориметрии исследовалось влияние комплексообразования на процесс фотоиндуцированного переноса энергии в красителе **1**.

Активными центрами связывания бисстирилового красителя такой структуры являются краун-эфирные фрагменты. Комплексообразование с ионами металлов приводит к гипсохромным сдвигам как спектров поглощения, так и флуоресценции соответствующей хромофорной части связывающего лиганда (Таблица 4, Рисунок 7). Это происходит за счет взаимодействия катиона с неподеленной электронной парой атомов кислорода или азота краун-эфирного фрагмента, входящей в хромофорную систему молекулы красителя. Величина гипсохромных сдвигов зависит от природы иона металла.

Оптические свойства и константы устойчивости комплексов бисстирилового красителя с катионами были рассчитаны с использованием данных прямого спектрофотометрического титрования с помощью программы SpecFit-32 (Таблица 4). Для Ca^{2+} и Mg^{2+} значение $\lg K$ составили 4.07 ± 0.01 и 3.92 ± 0.01 , для комплекса с Hg^{2+} $\lg K$ оказался больше 7, что находится за пределами возможностей определения значения констант данным методом.

На рисунке 7 представлены спектры поглощения красителя **1** в комплексе с ионами металлов. Среди исследуемых металлов, взаимодействующих с бензо-15-краун-5 эфиром, наиболее сильные сдвиги полосы при 415 нм и более высокие константы устойчивости показали ионы Mg^{2+} и Ca^{2+} . В случае комплексообразования азадитиакраун-эфира с катионами H^+ и Hg^{2+} сильное гипсохромное смещение претерпевала ДПП при 487 нм.

Таблица 4. Оптические свойства и константы устойчивости комплексов бисстирилового красителя с катионами $1 \cdot \text{M}^{n+}$ в MeCN.

Соединение	$\lambda_{\text{погл макс}}$, нм	$\lambda_{\text{фл макс}}$, нм	$\varphi^{\text{фл}}$, %	$\lg K$
1	415, 487	620, 565	1.9	-
1 · Mg^{2+}	367, 487	623	1.6	3.92 ± 0.01
1 · Ca^{2+}	368, 487	623	1.6	4.07 ± 0.01
1 · Na^+	389, 487	623, 532	2.0	3.01 ± 0.02
1 · Li^+	391, 487	623, 532	1.9	3.46 ± 0.02
1 · Ba^{2+} (1:1)	378, 487	623, 526	1.7	4.2 ± 0.16
1 · Ba^{2+} (2:1)	490, 413, 373	-	-	8.7 ± 0.25
(1 · Hg^{2+})· Mg^{2+}	364	584	-	4.26 ± 0.02
(1 · Hg^{2+})· Na^+	377	578	-	3.03 ± 0.02
1 · Ag^+	412, 443	605	5.4	2.77 ± 0.01
1 · Hg^{2+}	399, 369	575	4.3	>7
1 · H^+	394, 341	559	3.0	5 ± 0.1

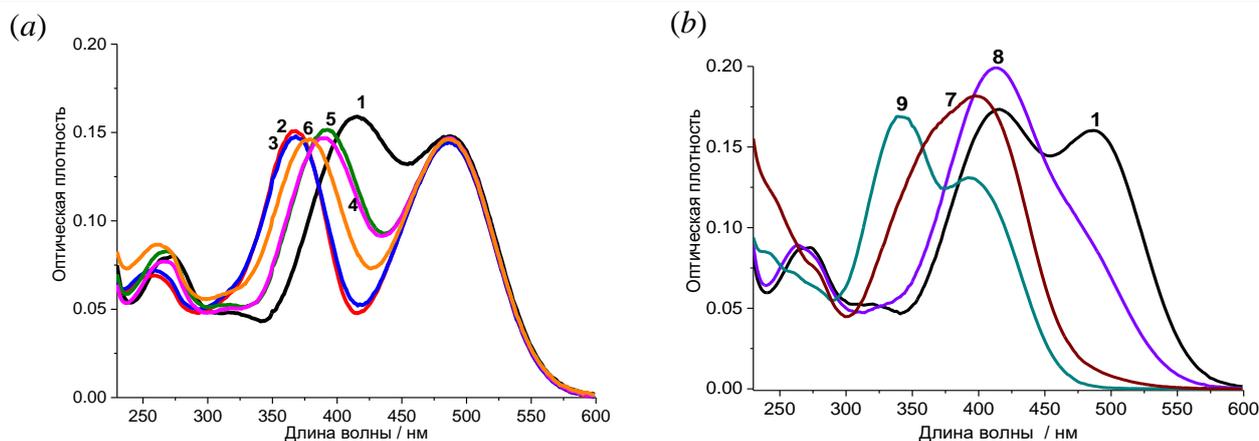


Рисунок 7. Спектры поглощения бисстирилового красителя **1** (1); а) комплекса **1**· Mg^{2+} (2); комплекса **1**· Ca^{2+} (3); комплекса **1**· Na^+ (4); комплекса **1**· Li^+ (5); комплекс **1**· Ba^{2+} (6); б) комплекса **1**· Hg^{2+} (7); комплекса **1**· Ag^+ (8); комплекса **1**· H^+ (9); $C_1 = 5 \mu\text{M}$, $C_{\text{M}^+} = 5 \text{ mM}$ (кроме Hg^{2+} , $C_{\text{Hg}^{2+}} = 5 \mu\text{M}$), в MeCN.

Максимум спектра флуоресценции бисстирилового красителя **1** в ацетонитриле при возбуждении $\lambda_{\text{возб}} = 490 \text{ нм}$ находится в области около 620 нм, а при облучении $\lambda_{\text{возб}} = 415 \text{ нм}$ - при $\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}} = 620 \text{ нм}$ с плечом при 550 нм. Появление плеча вызвано неполным переносом энергии, флуоресценция при 550 нм принадлежит хромофору с кислородным краун-эфиром.

Максимумы и квантовые выходы флуоресценции красителя **1** и его комплексов приведены в таблице 4.

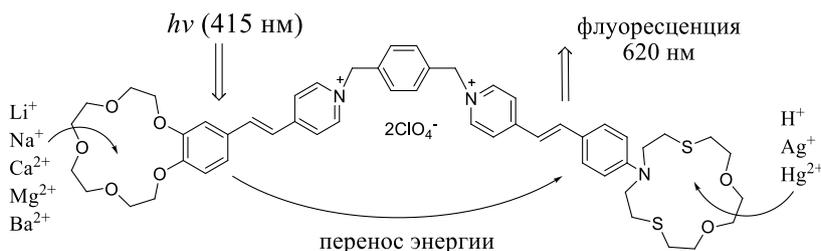


Схема 8

Для изучения влияния комплексообразования на процесс переноса энергии нами были проведены флуориметрические исследования бисстирилового красителя **1** с добавлением катионов металлов при возбуждении $\lambda_{\text{возб}} = 415$ нм и $\lambda_{\text{возб}} = 490$ нм (Схема 8). Комплексообразование красителя с катионами металлов приводит к сдвигу соответствующей полосы поглощения и флуоресценции в коротковолновую область спектра. Таким образом, при связывании красителем **1** катионов щелочных и щелочно-земельных металлов интенсивность поглощения на длине волны 415 нм, которую мы использовали для возбуждения, уменьшается, что приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции красителя в комплексе с металлами (Рисунок 8а). Очевидно, что тушение флуоресценции зависит от величины сдвига полосы поглощения хромофора с бензо-15-краун-5-эфиром. Наибольший сдвиг вызывает наибольшее уменьшение интенсивности поглощения при 415 нм. На рисунке 8а показана флуоресценция комплексов красителя **1** с Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} . Интенсивность флуоресценции с максимумом при 620 нм является самой низкой для комплексов с Mg^{2+} и Ca^{2+} и самой высокой для комплексов с Na^+ и Li^+ . Это также согласуется с полученными значениями констант связывания комплексов.

Связывание катионов H^+ , Hg^{2+} , Ag^+ с азидитиакраун-эфиром вызывает существенный сдвиг полосы поглощения соответствующего хромофора и ухудшает перекрывание спектров флуоресценции донора энергии (О-хромофора) и поглощения акцептора энергии (N-хромофора). В этом случае при облучении комплекса $\lambda_{\text{возб}} = 415$ нм перенос энергии будет затруднен, в результате чего спектр флуоресценции будет содержать полосы соответствующие обоим хромофорам, как с бензокраун-эфиром, так и с азидитиакраун-эфиром (Рисунок 8б).

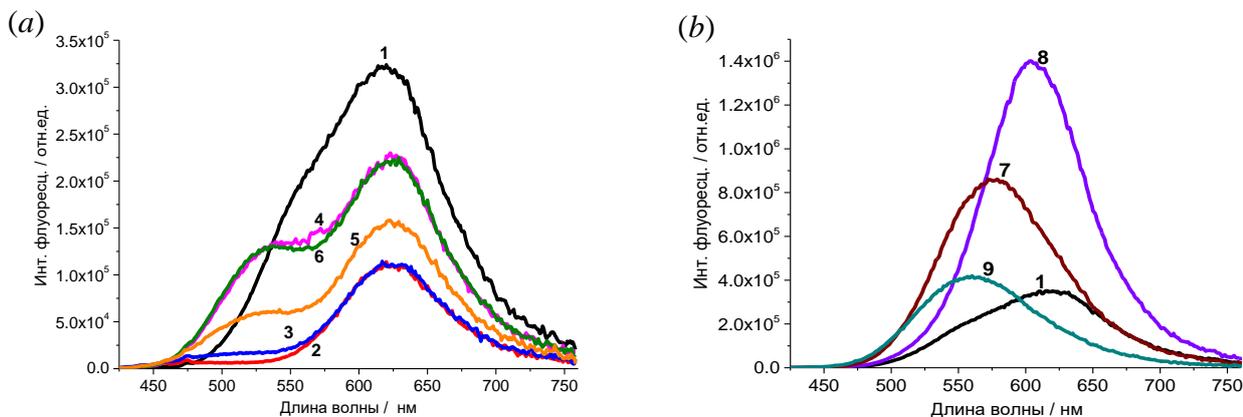


Рисунок 8. Спектры флуоресценции бисстирилового красителя **1** (1); а) комплекса **1**- Mg^{2+} (2); комплекса **1**- Ca^{2+} (3); комплекса **1**- Na^+ (4); комплекса **1**- Li^+ (5); комплекс **1**- Ba^{2+} (6); б) комплекса **1**- Hg^{2+} (7); комплекса **1**- Ag^+ (8); комплекса **1**- H^+ (9) при $\lambda_{\text{возб}} = 415$ нм, $C_1 = 5$ μM , $C_{\text{M}^+} = 5$ мМ, (кроме соли Hg^{2+} $C_{\text{Hg}^{2+}} = 0.02$ мМ) в MeCN.

Комплексообразование красителя с катионами по кислородному краун-эфиру позволяет настраивать эффективность переноса энергии. Таким образом, данный бисстириловый краситель может использоваться для ратиометрического флуоресцентного детектирования ионов, поскольку сигнал, получаемый при переносе энергии при $\lambda_{\text{возб}} = 415$ нм, может генерировать индивидуальный флуоресцентный отклик в области 600 нм для каждого из исследуемых катионов, связывающихся с макроциклами. При этом при возбуждении $\lambda_{\text{возб}} = 490$ нм спектр флуоресценции красителя **1** практически не изменяется в присутствии катионов, координированных через бензокраун-эфир.

Таким образом, комбинация двух флуорофоров и двух активных центров связывания, расположенных в одной системе бисстирилового красителя **1**, дает информацию о типе связанных ионов металлов и позволяет различать металлы, скоординированные с одним и тем же макроциклическим центром.

Комплексообразование краун-содержащего бисстирилового красителя **1** с катионом ртути в воде

Для определения возможности использования лиганда **1** в качестве сенсора на ионы металлов в биологических средах далее было проведено исследование по связыванию красителя **1** с катионами металлов в водном растворе. В водной среде добавление катионов Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} не приводило к существенным изменениям в спектрах поглощения и флуоресценции красителя **1**. В тех же условиях постепенное добавление аликвот Hg^{2+} к раствору лиганда **1** резко снижало оптическую плотность при 470 нм при одновременном росте интенсивности коротковолновой полосы на спектрах поглощения (Рисунок 9а). На спектре испускания при возбуждении на длине волны 380 нм добавление Hg^{2+} приводило к усилению сигнала флуоресценции и его гипсохромному сдвигу (Рисунок 9б). По данным спектрофотометрического и спектрофлуориметрического титрования были рассчитаны значения константы устойчивости комплекса 1:1 с помощью программы SpecFit-32 (Таблица 5).

Далее была исследована возможность применения красителя **1** для флуоресцентной визуализации Hg^{2+} в живых клетках. С помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии было обнаружено, что краситель **1** проникает в клетки аденокарциномы легкого человека A549 и накапливается в лизосомах.

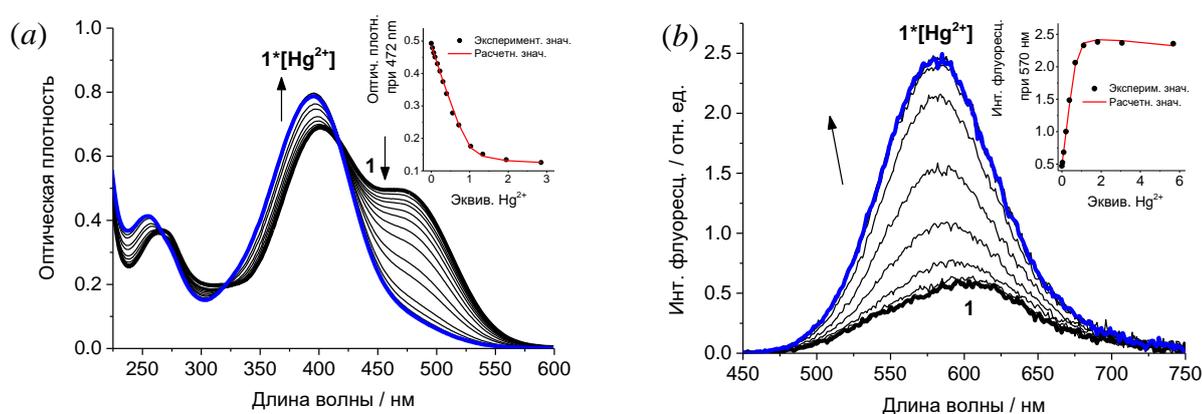


Рисунок 9. Спектрофотометрическое (a) и спектрофлуориметрическое (b) титрование бисстирилового красителя **1** солью $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ в ацетатном буфере (pH 6.0) при $\lambda_{\text{возб}} = 380$ нм, $C_1 = 20$ μM .

Таблица 5. Оптические свойства бисстирилового красителя **1**, $1 \cdot \text{Hg}^{2+}$ и константы устойчивости комплексов соединения **1** с Hg^{2+} в ацетатном буфере при pH 6.0.

Соединение	$\lambda_{\text{макс}}^{\text{полг}}$, нм	ε_{λ} , $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}}$, нм	$\varphi^{\text{фл}}$, % ₁	$\lg K$	
					Спектрофотометр. титрование	Спектрофлуориметр. титрование
(1)·	402; 469	32700, 22950	603 (380)	1.5	-	-
(1)· Hg^{2+}	395	40 970	581 (380)	4.1	6.27 ± 0.12	6.24 ± 0.11

Наблюдаемые различия в спектрах внутриклеточной флуоресценции **1** и (**1**)· Hg^{2+} при облучении $\lambda_{\text{возб}} = 405$ нм могут быть использованы для ратиометрического флуоресцентного обнаружения Hg^{2+} в клетках с использованием соединения **1**. Например, сравнивая спектры флуоресценции красителя **1** внутри клеток в спектральных диапазонах 500–600 нм и 600–730 нм одновременно при $\lambda_{\text{возб}} = 405$ нм, можно увидеть, что относительные интенсивности флуоресценции на этих диапазонах заметно различаются в присутствии и в отсутствие ионов Hg^{2+} (Рисунок 10a,b).

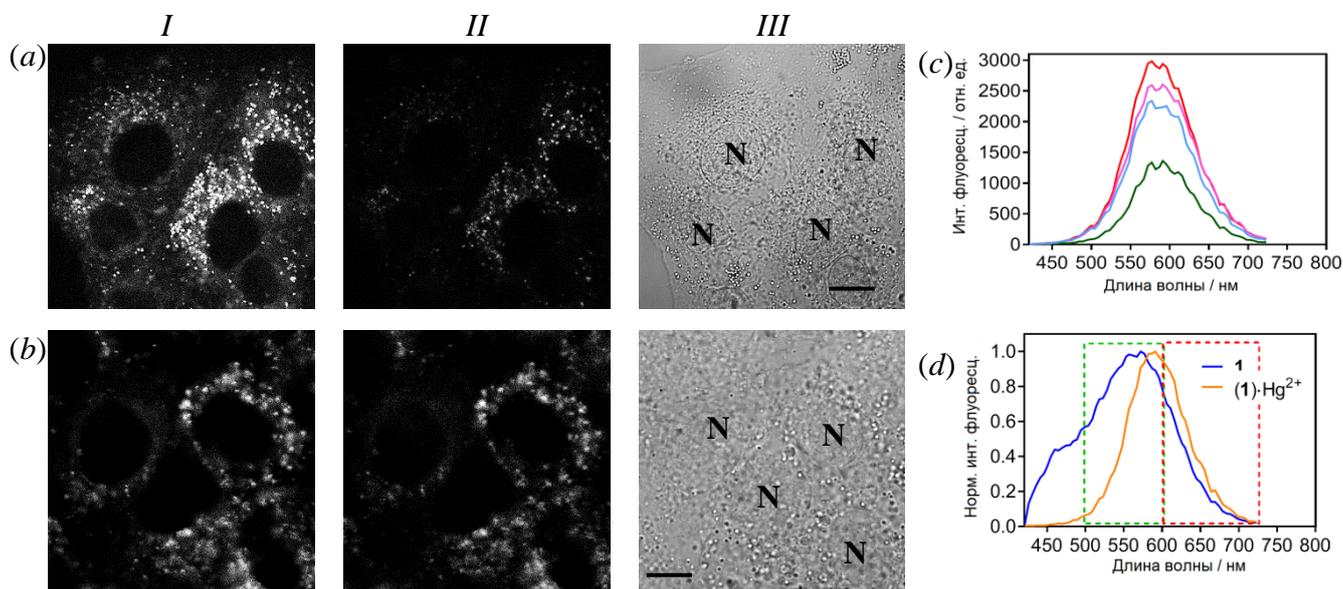


Рисунок 10. Изображения конфокальной флуоресцентной микроскопии (*a,b*) и спектры флуоресценции (*c,d*) лиганда **1** и комплекса (**1**)· Hg^{2+} в клетках A549. (строка *a*) Клетки инкубировали с **1** ($10 \mu\text{M}$) в течение 20 мин. (строка *b*) Клетки подвергались предварительной инкубации с $20 \mu\text{M}$ $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ в течение 20 мин, дважды промывали раствором Хэнкса и инкубировали с красителем **1** ($10 \mu\text{M}$) в течение 20 мин. Изображения внутриклеточной флуоресценции измеряли в спектральных диапазонах 500–600 нм (столбец I) и 600–730 нм (столбец II) при возбуждении $\lambda_{\text{возб}} = 405$ нм. В столбце III показаны изображения клеток в проходящем свете. Метка - $10 \mu\text{m}$. N - обозначает ядро. (с) Спектры флуоресценции **1** из разных областей клеток, предварительно инкубированных с $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$. (d) Нормализованные спектры внутриклеточной флуоресценции **1** и (**1**)· Hg^{2+} . Зеленые и красные прямоугольники показывают две области спектра (500–600 и 600–730 нм), выбранные для получения изображений, показанных в столбцах I и II.

Отношение R интенсивностей флуоресценции в данных двух диапазонах $I_{(500-600 \text{ нм})}/I_{(600-730 \text{ нм})}$, рассчитанное и усредненное по выборке клеток ($n = 20$), равно 4.4 ± 0.2 в отсутствие ионов Hg^{2+} и 1.43 ± 0.10 при связывании **1** с Hg^{2+} . Отношение R уменьшается в зависимости от концентрации $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$, добавленного к клеткам, что указывает на то, что R чувствителен к внутриклеточной концентрации Hg^{2+} .

Полученная зависимость R от внутриклеточной концентрации Hg^{2+} в диапазоне 0–60 нМ продемонстрировала хорошую линейность с коэффициентом корреляции 0.99. По наклону этой линейной зависимости (r) и стандартному отклонению отношения R (s) предел обнаружения Hg^{2+} в клетках (C_{DL}) согласно уравнению (2) составил 37 нМ:

$$C_{DL} = \frac{3s}{r} \quad (2)$$

Таким образом, соединение **1** позволяет количественно определять ионы Hg^{2+} в клетках в диапазоне концентраций 37 нМ – 20 мМ. Представленные результаты позволяют сделать вывод, что соединение **1** может найти применение в исследованиях катиона ртути (II) в сложных биологических системах.

Комплексообразование красителей типа «голова к голове» **2**, **3**, **4** с ДНК тимуса теленка

Взаимодействие бисстириловых красителей **2**, **3**, **4** с дц-ДНК тимуса теленка изучалось с помощью спектрофотометрического и спектрофлуориметрического титрования в натрий-фосфатном буфере при pH 7. Фиксировали изменения в оптических спектрах при постепенном увеличении концентрации ДНК при постоянной концентрации каждого красителя. Для всех красителей были обнаружены два последовательных процесса. При первых добавках ДНК к раствору бисстириловых красителей наблюдалось уменьшение интенсивности максимума полосы поглощения (Рисунок 11). Дальнейшее увеличение концентрации ДНК приводило к увеличению интенсивности полосы поглощения и ее батохромному сдвигу до 15 нм для **2** и 24 нм для **3** (Таблица 6). Добавление ДНК к раствору несимметричного бисстирилового красителя **4** привело к малым изменениям положения максимумов и интенсивности полос поглощения. Батохромный сдвиг ДПП красителей при связывании с ДНК можно объяснить возникающими при этом изменениями локальной полярности вокруг красителя. В комплексе с ДНК энергетическая щель между ВЗМО и НСМО красителя уменьшается.

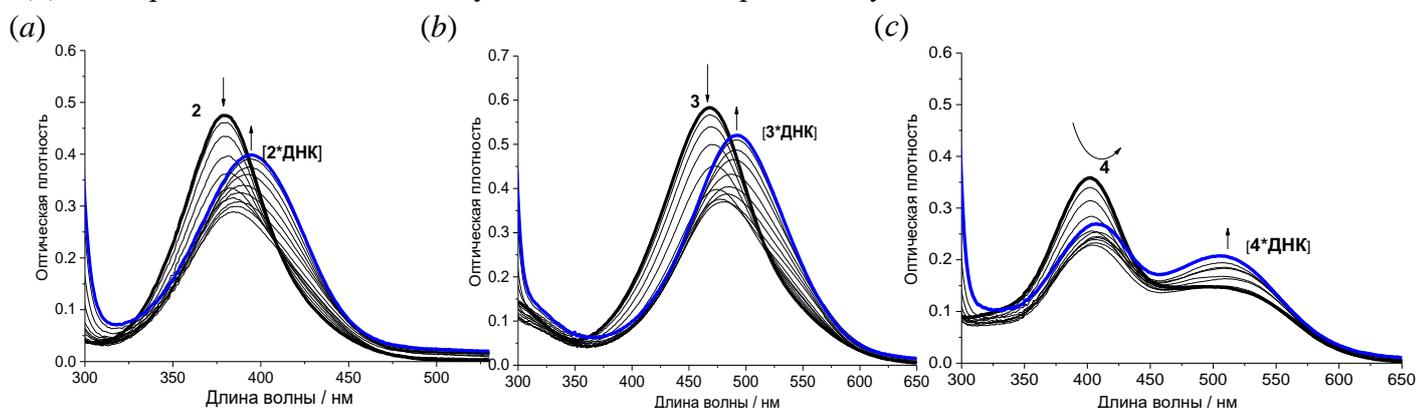


Рисунок 11. Спектрофотометрическое титрование дц-ДНК бисстириловых красителей **2**, $C_{ДНК}/C_2=0-49$ (a); **3**, $C_{ДНК}/C_3=0-44$ (b); **4**, $C_{ДНК}/C_4=0-42$ (c); $C_{лиг}=10\mu M$; в натрий-фосфатном буфере.

Таблица 6. Основные характеристики спектров поглощения и флуоресценции соединений **2**, **3**, **4** в комплексе с ДНК в натрий-фосфатном буфере.

Соединение в комплексе с ДНК	$\lambda_{\text{погл макс}}^{\text{догл}}$, нм	$\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}}$, нм	Стоксов сдвиг, см^{-1}	$I_{L\text{DNA}}/I_L$ ($\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}} L \cdot \text{DNA}$)	$\phi^{\text{фл}}$, %
2	395	505	5520	3.2	1.47
3	492	615	4070	60	2.82
4	408, 507	495, 615	4310, 3460	3.2, 23	0.6

Флуоресценция свободных красителей **2**, **3**, **4** в водном растворе довольно слабая. При увеличении концентрации ДНК в растворе красителя наблюдалось увеличение интенсивности флуоресценции красителя, но относительно небольшое (Рисунок 12, Таблица 6), что может быть объяснено агрегацией красителей. Для красителя **2** при связывании с биомолекулой наблюдался рост интенсивности флуоресценции при 500 нм, что соответствует флуоресценции красителя в линейной форме (Рисунок 12а, Таблица 6). Также стоит отметить, что при добавлении ДНК к раствору красителя **4** наблюдалось увеличение флуоресцентного отклика при 620 нм (Рисунок 12с, Таблица 6). Такие изменения подтверждают наличие переноса энергии в молекуле, поэтому связывание красителя **4** с ДНК привело к увеличению интенсивности флуоресценции N-хромофора при 620 нм.

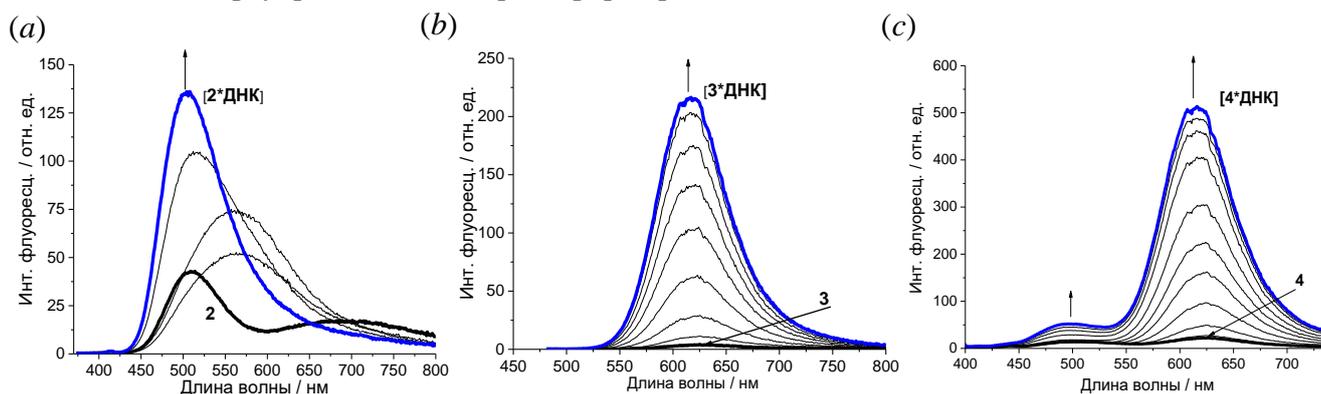


Рисунок 12. Спектрофлуориметрическое титрование дц-ДНК бисстириловых красителей **2**, $C_{\text{ДНК}}/C_2=0-49$ (a); **3**, $C_{\text{ДНК}}/C_3=0-44$ (b); **4**, $C_{\text{ДНК}}/C_4=0-42$ (c); $C_{\text{лиг}}=10\mu\text{M}$; в натрий-фосфатном буфере при возбуждении $\lambda_{\text{возб}}^2=362\text{nm}$, $\lambda_{\text{возб}}^3=470\text{nm}$, $\lambda_{\text{возб}}^4=382\text{nm}$.

Для лучшего понимания структуры комплексов краситель-дц-ДНК мы использовали КД-спектроскопию как высокочувствительный метод обнаружения конформационных изменений во вторичной структуре ДНК. Спектр раствора ДНК имеет форму бисигнала с минимумом при 245 нм и максимумом при 275 нм. Молекулы красителей **2**, **3** и **4** являются ахиральными и не дают сигналов в спектрах КД. Небольшие ахиральные молекулы могут демонстрировать индуцированный сигнал КД (ИКД) при связывании с нуклеиновой кислотой (обычно в диапазоне > 300 нм), такие сигналы могут оказаться весьма информативными для определения способа связывания (интеркаляция, ассоциация, связывание в бороздках и т. д.).

На рисунке 13 изображены спектры КД комплексов красителей **2**, **3** и **4** с ДНК при различных соотношениях краситель:ДНК. На спектрах КД комплексов красителей **2**, **3** с ДНК мы наблюдали появление интенсивных бисигнальных полос. В случае красителя **2** форма совпадала с сигналом ДНК, у красителя **3** форма была зеркальной сигналу ДНК, что говорит об образовании агрегатов различной хиральности. В случае соединения **4** степень агрегации не очень высока из-за относительно низкой интенсивности экситонных полос КД. Такие изменения в спектрах КД могут указывать на то, что молекулы бисстирилового красителя взаимодействуют с ДНК, залегая в бороздку биомолекулы.

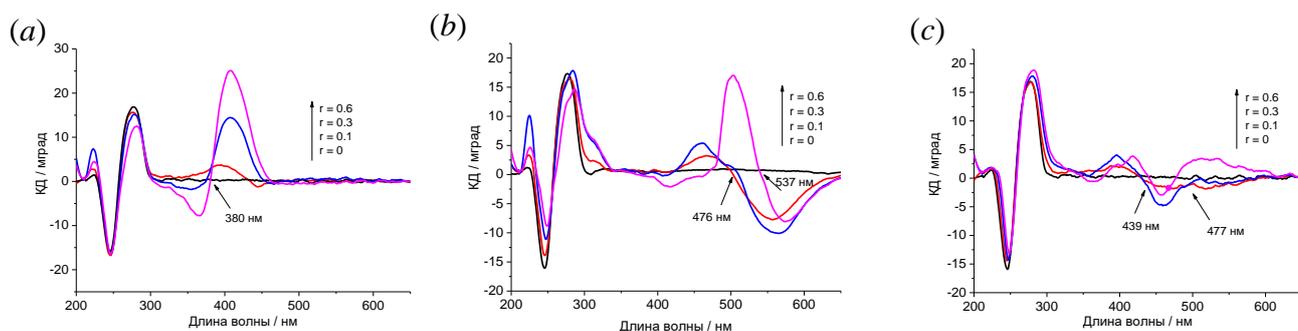


Рисунок 13. Спектры кругового дихроизма тт-ДНК (тт-ДНК = 0.1 мМ п.о.) в отсутствии и в присутствии бисстирилового красителя **2** (а), **3** (b), **4** (с) при разных соотношениях (лиганд – нуклеиновая кислота): 0; 0.1; 0.3; 0.6 в натрий-фосфатном буфере. Стрелками показано изменение полос с увеличением концентрации красителя.

Для определения механизма связывания бисстириловых красителей **2**, **3** и **4** с ДНК были дополнительно проведены эксперименты по конкурентному титрованию с красителями-стандартами, механизм взаимодействия с ДНК которых точно установлен. Мы провели конкурентное титрование бисстириловых красителей **2**, **3** и **4** с использованием метиленового зеленого (MeGr), стандартного лиганда для большой бороздки ДНК, и красителя хекст (Hoechst 33258), который связывается с ДНК в малой бороздке. Добавление бисстириловых красителей **2**, **3** и **4** не повлияло на спектр флуоресценции комплекса (MeGr)-дц-ДНК, что указывает на то, что соединения **2**, **3** и **4** не взаимодействуют с ДНК путем залегания в большую бороздку (Рисунок 14а). Как показано на рисунке 14b, постепенное добавление красителя **2** к комплексу (хекст)-ДНК, также как и добавление красителей **3**, **4**, приводило к последовательному снижению интенсивности флуоресценции комплекса ДНК со стандартом, что указывает на связывание бисстириловых красителей в малой бороздке ДНК.

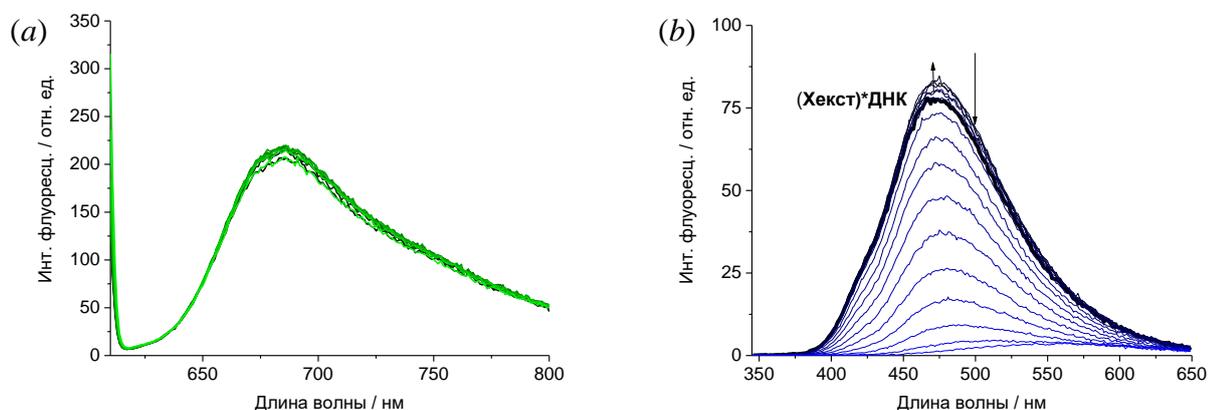


Рисунок 14. Спектофлуориметрическое титрование комплекса (MeGr)-ДНК (а) и (Хекст)-ДНК (b) бисстириловым красителем **2**, $C_2/C_{\text{Хекст}}=0-12$, $C_{\text{Хекст}}=5\mu\text{M}$, $C_{\text{ДНК}}=0.15\text{mM}$ (а); $C_2/C_{\text{MeGr}}=0-8$, $C_{\text{MeGr}}=5\mu\text{M}$; $C_{\text{ДНК}}=0.3\text{mM}$ (b); в натрий-фосфатном буфере.

Для подтверждения механизма агрегации красителей **2**, **3** при взаимодействии с ДНК проводилось молекулярное моделирование комплексообразования красителей с биомолекулой. Моделирование комплексов соединений **2**, **3** с ДНК проводилось в два этапа. Сначала с целью установления вероятной геометрии красителя на поверхности ДНК была проведена процедура докинга. При взаимодействии с ДНК все соединения располагаются в малой бороздке; наиболее вероятной была конформация, в которой стириловые фрагменты находятся в линейной форме.

Поскольку процедура докинга неявно оценивает влияние растворителя на механизм взаимодействия с ДНК, на втором этапе расчетов для уточнения результатов проводилось моделирование с использованием молекулярной динамики (МД), где в расчет были добавлены взаимодействия с молекулами растворителя. Согласно проведенным расчетам, исходные красители в водном растворе могут существовать в линейной и внутримолекулярной сэндвич-формах, а взаимодействие с ДНК может происходить как с одной, так и с другой формой красителей (Рисунок 15, Рисунок 16).

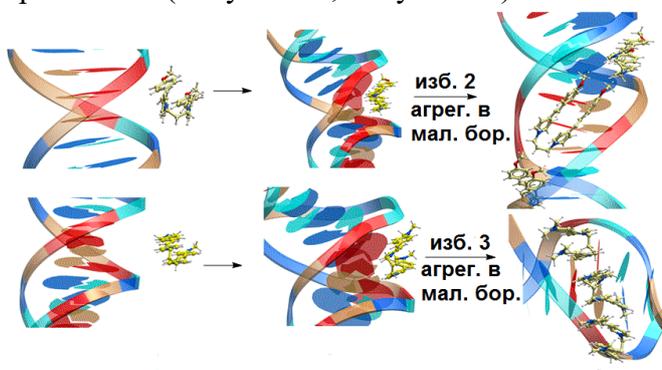


Рисунок 15. Исходные и полученные на последнем этапе расчеты (МД) конформации комплексов ДНК с **2, 3** (исходные красители в сэндвич-форме).

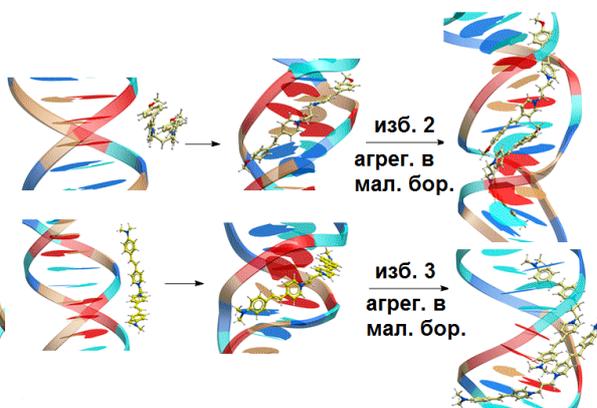


Рисунок 16. Исходные и полученные на последнем этапе расчеты (МД) конформации комплексов ДНК с **2, 3** (исходный краситель **2** в виде Н-димера, краситель **3** в линейной форме).

Комплексообразование красителей типа «голова к хвосту» **5, 6** с ДНК тимуса теленка и РНК печени теленка

Как и при исследовании красителей **2-4** для установления факта взаимодействия бисстириловых красителей типа «голова к хвосту» с биомолекулами ДНК и РНК на первом этапе проводили спектрофотометрическое титрование. Для красителей **5, 6** при добавках ДНК наблюдалось изменение интенсивности и bathochromное смещение полос поглощения красителей (Таблица 7). При титровании красителей раствором РНК наблюдались аналогичные изменения (Таблица 7). Такие спектральные изменения подтверждают факт взаимодействия красителей с биомолекулами. Анализ данных спектрофотометрического титрования красителей **5** и **6** с тт-ДНК и с пт-РНК с использованием программы SpecFit-32 показал образование двух типов комплексов краситель-НК состава 1 : 1 и 1 : 2 (Таблица 7).

В свободном виде красители **5, 6** демонстрируют низкие квантовые выходы флуоресценции, а при взаимодействии с ДНК или РНК эффективность флуоресценции возрастает. Такие изменения в спектре можно объяснить ограниченной подвижностью молекулы в комплексе с ДНК/РНК, что предотвращает фотоизомеризацию или образование ТИСТ-состояния и приводит к усилению флуоресценции. Стоит отметить, что при взаимодействии с ДНК наблюдается большее усиление флуоресценции (в 151 раз для **5** и 118 раз для **6**), чем при связывании с РНК (в 23 раза для **5** и 36 раз для **6**) (Рисунок 17, Таблица 7).

Результаты конкурентного титрования красителей **5, 6** комплексов ДНК с метиленовым зеленым и хекстом показали, что каждый из красителей взаимодействует с ДНК путем залегания в малую бороздку.

Исследования методом спектроскопии кругового дихроизма продемонстрировали, что при добавлении красителей **5, 6** к раствору ДНК сигнал от дц-ДНК изменялся слабо, но наблюдался постепенный рост двух полос с максимумами при 407 и 507 нм (Рисунок 18а).

Такие изменения в спектре могут указывать на расположение лиганда в малой бороздке ДНК. Спектр КД свободной РНК содержит интенсивный положительный сигнал на 265-275 нм и отрицательный пик около 240 нм (Рисунок 18b). При добавлении красителей **5**, **6** к раствору РНК наблюдалось одновременное уменьшение интенсивности и смещение положительного пика РНК в сторону более длинных волн, что соответствует интеркаляции соединений **5**, **6** между парами оснований РНК.

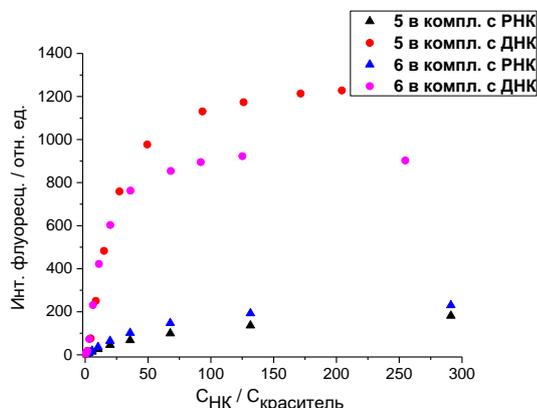


Рисунок 17. Сравнительный график изменения интенсивности флуоресценции в максимуме для красителей **5** и **6** при увеличении концентрации ДНК и РНК в натрий-фосфатном буфере.

Таблица 7. Основные характеристики спектров поглощения и флуоресценции соединений **5**, **6** в комплексе с ДНК и РНК в натрий-фосфатном буфере.

Соединен. в компл. с биомол.	$\lambda_{\text{погл макс}}$, nm		$\lambda_{\text{фл макс}}$, nm		$\lg K_{11}/\lg K_{21}$ (ДНК)	$\lg K_{11}/\lg K_{21}$ (РНК)	$\varphi^{\text{своб.}}/\varphi^{\text{лиг+ДНК}}$ (кратность разгорания флуор.), %	$\varphi^{\text{своб.}}/\varphi^{\text{лиг+РНК}}$ (кратность разгорания флуор.), %
	Компл. с ДНК (2:1)	Компл. с РНК (2:1)	Компл. с ДНК (2:1)	Компл. с РНК (2:1)				
5	393, 485	396, 494	598	612	5.26 / 9.04	4.68 / 8.03	0.12/18.2 (151)	0.12/2.8 (23)
6	392, 501	394, 508	615	620	5.35 / 9.48	4.96 / 8.16	0.08/9.5 (118)	0.08/2.9 (36)

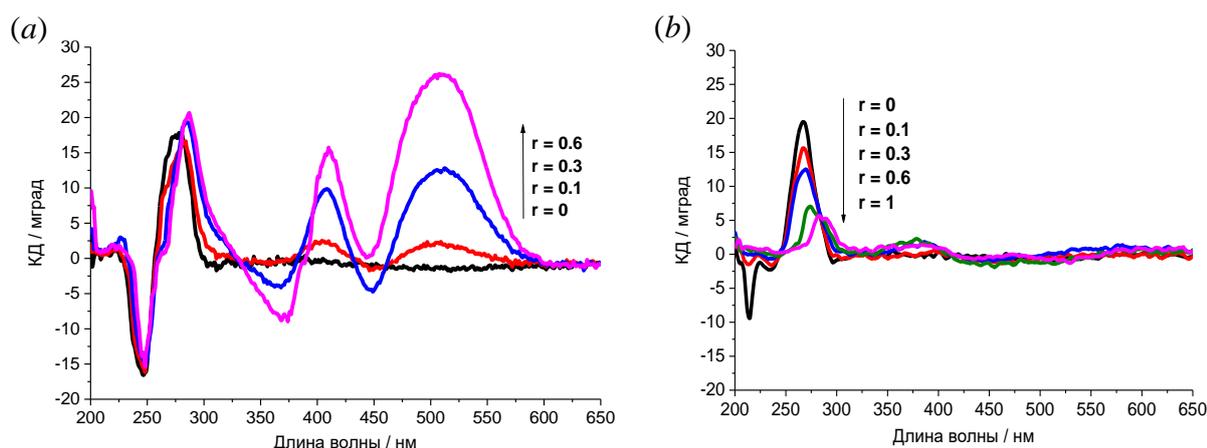


Рисунок 18. Спектры кругового дихроизма тт-ДНК (тт-ДНК = 0.1 мМ п.о.) (а) и тт-РНК (тт-РНК = 0.1 мМ п.о.) (б) в отсутствие и в присутствии бисстирилового красителя **5** при разных соотношениях (лиганд – нуклеиновая кислота): 0; 0.1; 0.3; 0.6 в натрий-фосфатном буфере. Стрелками показано изменение полос с увеличением концентрации красителя.

На рисунке 19 показаны изображения конфокальной флуоресцентной микроскопии фиксированных клеток А549, обработанных 5 μM растворами красителей **5** (а), **6** (б). В случае

бисстирилового красителя **5** наблюдается сильный и яркий флуоресцентный сигнал в определенных областях ядра, но также и в цитоплазме клетки. Накопление красителя **6** в ядре при той же концентрации намного меньше, при этом наблюдается большее распределение в цитоплазме клетки (Рисунок 19b).



Рисунок 19. Изображения конфокальной флуоресцентной микроскопии фиксированных клеток A549 после инкубации с красителями **5** (a) и **6** (b), $\lambda_{\text{возб}} = 405$ нм. Метка - 10 μm . Клетки инкубировали с красителями **5** и **6** (5 mM) в течение 15 мин.

Для подтверждения специфичности связывания красителей **5** и **6** с РНК или ДНК в клетках были проведены эксперименты на расщепление дезоксирибонуклеазой (ДНКазой) и рибонуклеазой (РНКазой). Полученные результаты указывают на то, что краситель **5** проявляет большую селективность связывания с ДНК. Для красителя **6** оказалось, что связывание с ДНК/РНК слабо влияет на флуоресцентные свойства красителя.

ВЫВОДЫ

1. Синтезированы и охарактеризованы гомо- и гетеро-димерные бисстирилпиридиниевые красители типа «голова к голове» **1**, **2**, **3**, **4**, типа «голова к хвосту» **5**, **6** и типа «хвост к хвосту» **7**, **8**, содержащие в фенильном ядре алкокси- и диалкиламино-группы.

2. Показано, что с помощью бисстирилового красителя **1** возможно распознавание различных катионов металлов. Также бисстириловый краситель **1** может использоваться для ратиометрического детектирования катионов Hg^{2+} в живых клетках A549.

3. Показано, что бисстириловые красители типа «голова к голове» **2**, **3**, **4** демонстрируют способность к связыванию с ДНК. В случае симметричных бисстириловых красителей при больших избытках красителя процесс координации в малой бороздке ДНК сопровождается образованием агрегатов различного типа.

4. Показано, что бисстириловые красители типа «голова к хвосту» **5**, **6** демонстрируют способность к связыванию с нуклеиновыми кислотами. Данные красители при взаимодействии с ДНК/РНК не агрегируют, проявляют интенсивное разгорание флуоресценции и демонстрируют большую селективность к ДНК.

5. Установлено, что при фотовозбуждении несимметричного бисстирилового красителя можно использовать коротковолновое облучение с получением флуоресцентного сигнала благодаря переносу энергии между хромофорными фрагментами красителя в комплексе с катионами металлов, в связанной с биомолекулой форме, а также во внутриклеточной среде.

Перспективы дальнейшей разработки темы диссертации заключаются в дальнейшем исследовании и применении бисхромофорных систем для биовизуализации. Поскольку структура краун-содержащего бисстирилового красителя с реализацией переноса энергии показала свою применимость для детекции катионов металлов, замена краун-эфира на другой рецепторный фрагмент позволила бы получить сенсор селективный на другие катионы металлов. Для

флуоресцентного окрашивания биомолекул наиболее перспективными структурами оказались бисстириловые красители типа «голова к хвосту», поэтому дальнейший подбор хромофорных фрагментов в системе такого строения позволил бы получить красители с более высокими коэффициентами экстинкции и кратностью разгорания флуоресценции.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

Статьи:

1. Ustimova M.A., Lebedeva A.Yu., Fedorov Yu.V., Berdnikova D.V., Fedorova O.A. FRET-based metal ion sensing by a crown-containing bisstyryl dye // *New J. Chem.* – 2018. – Vol. 42. – № 10. – P. 7908–7913.
2. Ruleva A.Y., Fedorov Yu.V., Aliev T.M., Novikov V.V., Shepel N.E., Ustimova M.A., Fedorova O.A. Multi-component interaction between bisstyryl dyes and cucurbit[7]uril // *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* – 2020. – Vol. 98. – № 3–4. – P. 249–259.
3. Ustimova M.A., Chernikova P.A., Shepel N.E., Fedorov Yu.V., Fedorova O.A. Effect of N-substituent in 4-styrylpyridinium dyes on their binding to DNA // *Mendeleev Commun.* – 2020. – Vol. 30. – № 2. – P. 217–219.
4. Ustimova M.A., Fedorov Yu.V., Tsvetkov V.I.B., Tokarev S.D., Shepel N.A., Fedorova O.A. Helical aggregates of bis(styryl) dyes formed by DNA templating // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* – 2021. – Vol. 418. – P. 113378.
5. Panchenko P.A., Efremenko A.V., Feofanov A.V., Ustimova M.A., Fedorov Yu.V., Fedorova O.A. Ratiometric Detection of Mercury (II) Ions in Living Cells Using Fluorescent Probe Based on Bis(styryl) Dye and Azadithia-15-Crown-5 Ether Receptor // *Sensors.* – 2021. – Vol. 21. – P. 470.
6. Ustimova M.A., Fedorov Yu.V., Chmelyuk N.S., Abakumov M.A., Fedorova O.A. Fluorescence turn-on probes for intracellular DNA/RNA distribution based on asymmetric bis(styryl) dyes // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2022. – Vol. 279. – P. 121446.
7. Устимова М.А., Федорова О.А. Синтез новых моностириловых красителей для получения пленок Ленгмюра-Блоджетт // *Успехи в химии и химической технологии.* – 2019. – Т. 33. – С. 27-29.
8. Грачев А.И., Устимова М.А., Черникова Е.Ю., Федоров Ю.В. Синтез N-замещенных стириловых красителей, содержащих фрагмент азадитиакраун-эфира // *Успехи в химии и химической технологии.* – 2018. – Т. 32. – С. 70-72.
9. Устимова М.А., Лебедева А.Ю., Федорова О.А. Синтез новых бисстириловых красителей // *Успехи в химии и химической технологии.* – 2017. – Т. 31. – С. 72-74.

Тезисы конференций:

1. Ustimova M.A., Fedorov Yu.V., Chmelyuk N.S., Abakumov M.A., Fedorova O.A. Noncovalent DNA/RNA labeling with asymmetric bis(styryl) dyes // 2nd International Symposium "Noncovalent Interactions in Synthesis, Catalysis, and Crystal Engineering". – Москва, Россия. – 2022. – P. 81.
2. Устимова М.А., Федоров Ю.В., Цветков В.Б., Федорова О.А. ДНК-индуцированная агрегация бисстириловых красителей // "Самоорганизация в «мягких» средах: достижения и современное состояние". – Москва, Россия. – 2022. – С. 44.
3. Устимова М.А., Ефимова А.С. Флуоресцентные зонды на основе моностириловых красителей для нековалентного мечения ДНК // XXIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2022». – Москва, Россия. – 2022. – С. 617.

4. Устимова М.А., Федоров Ю.В., Федорова О.А. Изучение взаимодействия несимметричных бисстириловых красителей с биомолекулами // VII Международная конференция «Супрамолекулярные системы на поверхности раздела». – Туапсе, Россия. – 2021. – С. 44.
5. Ustimova M.A., Fedorov Yu.V., Tsvetkov V.I.B., Fedorova O.A. Helical aggregates of bis(styryl) dyes formed by DNA templating // The XII International Conference on Chemistry for Young Scientists «MENDELEEV 2021». – Санкт-Петербург, Россия. – 2021. – С. 675.
6. Ustimova M.A., Fedorova O.A., Fedorov Yu.V. Synthesis and study of crown-containing bisstyryl dye complexes with various metal cations by using FRET-process // International Conference "Chemistry of Organoelement Compounds and Polymers 2019". – Москва, Россия. – 2019. – P. 256.
7. Ustimova M.A., Fedorova O.A., Fedorov Yu.V. FRET-based metal ion sensing by crown-containing bisstyryl dye // XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. – Санкт-Петербург, Россия. – 2019. – С. 319.
8. Ustimova M.A., Fedorova O.A., Fedorov Yu.V. Synthesis and study of crown-containing bisstyryl dye complexes with various metal cations by using FRET process // 1st International Conferences on Noncovalent Interactions (ICNI-2019) – Лиссабон, Португалия. – 2019. – P. P48.
9. Устимова М.А., Федорова О. А., Федоров Ю. В. Синтез и изучение процесса переноса энергии в бисстириловом красителе, содержащем различные краун-эфирные фрагменты // VIII Молодежная конференция ИОХ РАН. – Москва, Россия. – 2019. – С. 40.
10. Устимова М.А., Федорова О.А., Федоров Ю.В., Лебедева А.Ю. Изучение влияния комплексообразования краунсодержащего бисстирилового красителя с различными катионами металлов на фотоиндуцированный перенос энергии // Кластер конференций 2018 "Solvation, Crystallization, Smart materials". – Суздаль, Россия. – 2018. – С. 461.
11. Устимова М.А., Лебедева А.Ю. Синтез и изучение фотоиндуцированного переноса энергии в комплексах краунсодержащего бисстирилового красителя с различными катионами металлов // IX международная конференция "Инновации в химии: достижения и перспективы" форума студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов - 2018". – Москва, Россия. – 2018. – С. 702.
12. Ustimova M.A., Oschepkov M.S., Berdnikova D.V. Synthesis and complexation bisstyryl dye containing two different crown-ethers // 16th International seminar on inclusion compounds (ISIC 16) and 3rd Youth school on supramolecular and coordination chemistry. – Казань, Россия. – 2017.