

Ксенофонтова Ксения Витальевна

**КОНЬЮГАТЫ БОРФТОРИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ ДИПИРРОМЕТЕНА
С АМИНОКИСЛОТАМИ:
ПОЛУЧЕНИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА**

02.00.04 – Физическая химия

02.00.01 – Неорганическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени кандидата
химических наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ивановский государственный химико-технологический университет»

Научный руководитель: доктор химических наук, доцент
Румянцев Евгений Владимирович

Официальные оппоненты: **Мамардашвили Галина Михайловна**
доктор химических наук, старший научный сотрудник
ФГБУН Институт химии растворов им. Г.А. Крестова
Российской академии наук, лаборатория 2-2 «Новые материалы на основе макроциклических соединений»,
ведущий научный сотрудник

Пахомов Алексей Александрович
кандидат химических наук
ФГБУН Институт биоорганической химии им. академик
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, отдел иммунологии, лаборатория
молекулярной тераностики, старший научный сотрудник

Ведущая организация: ФГБУН Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук

Защита состоится **01 февраля 2021 года** в 10:00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.063.06 на базе ФГБОУ ВО «Ивановский государственный химико-технологический университет» по адресу:

153000, г. Иваново, пр. Шереметевский, 7, ауд. Г-205.

Тел.: (4932) 32-54-33, факс: (4932) 32-54-33, e-mail: dissovet@isuct.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Информационном центре Ивановского государственного химико-технологического университета по адресу:

153000, г. Иваново, пр. Шереметевский, 10

и на сайте <http://www.isuct.ru> по ссылке:

https://www.isuct.ru/sites/default/files/department/ighu/dissertacionnye-sovety/files/ksenofontova_kseniya_vitalevna-03112020/dissertaciya.pdf

Автореферат разослан « ___ » _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Егорова Елена Владимировна

Общая характеристика работы

Актуальность и степень разработанности темы исследования:

Область создания флуоресцентных маркеров для биообъектов находится на передовом крае современной химической науки и смежных областей знания. Такие соединения находят свое применение для целей визуализации отдельных биомолекул, органелл и целых клеток, а также процессов с их участием.

В этой связи неудивительно, что развитие химии борфторидных комплексов дипиррометена (BODIPY) вызывает особый интерес у сотен исследователей по всему миру. Данный класс соединений обладает рядом практически ценных свойств – высокой устойчивостью, большими молярными коэффициентами поглощения, высокими квантовыми выходами флуоресценции, относительно небольшими стоксовыми сдвигами, узкими пиками поглощения и испускания и, кроме того, легкостью модификации структуры, – выгодно выделяющих BODIPY-флуорофоры на фоне других органических люминофоров.

Интересным с фундаментальной и прикладной сторон является получение конъюгатов борфторидных комплексов дипиррометена с различными биомолекулами, в том числе аминокислотами. Аминокислоты, являясь активными фрагментами биоконъюгатов, с одной стороны, служат модельными аналогами таких более сложных биологических объектов, как пептиды и белки, а с другой стороны, наделяют целевые молекулы рядом уникальных фотофизических и биохимических свойств. Конъюгаты типа аминокислота – BODIPY могут быть использованы для визуализации различных биохимических процессов, включая взаимодействие белков с другими биомолекулами, для отслеживания локализации и динамики белков, для мониторинга активности ферментов и т.п.

Важно отметить, что на сегодняшний день в научной литературе существует крайне ограниченное число работ, посвященных получению и исследованию конъюгатов типа аминокислота – BODIPY. В настоящей работе предпринята попытка восполнить этот пробел в данной области химической науки.

Цели и задачи исследования:

Целью работы является установление зависимости между строением и спектральными свойствами новых конъюгатов борфторидных комплексов дипиррометена с аминокислотами, различающихся способом присоединения аминокислотного фрагмента к остову флуорофора.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- разработка оптимальной методики направленного синтеза конъюгатов борфторидных комплексов дипиррометена с аминокислотами, различающихся способом присоединения аминокислотного фрагмента к остову флуорофора;
- синтез конъюгатов борфторидных комплексов дипиррометена с аминокислотами, различающихся способом присоединения аминокислотного фрагмента к остову флуорофора;
- исследование спектральных свойств синтезированных конъюгатов посредством совокупности спектральных методов исследования: спектроскопии поглощения, двумерной (2D) и трехмерной (3D) спектроскопии флуоресценции;
- квантовохимическое моделирование структур и спектров поглощения рассматриваемых конъюгатов.

Научная новизна исследования:

Предложен простой и достаточно эффективный подход к синтезу конъюгатов борфторидных комплексов дипиррометена с аминокислотами, различающихся способом присоединения аминокислотного фрагмента к остову флуорофора. На основе разработанной методики успешно синтезированы 13 новых конъюгатов борфторидных комплексов дипиррометена с аминокислотами, которые можно разделить на три группы в зависимости от способа присоединения аминокислотного фрагмента к остову флуорофора. В первую группу входят конъюгаты Arg^N-BODIPY, Asp^N-BODIPY, Cys^N-BODIPY, Glu^N-BODIPY, His^N-BODIPY, Lys^N-BODIPY, Met^N-BODIPY, Trp^N-BODIPY и Tyr^N-BODIPY, в которых аминокислота присоединена к флуорофору через аминогруппу, во вторую – конъюгаты Cys^C-BODIPY и Glu^C-BODIPY, в которых аминокислота присоединена к флуорофору через карбоксильную группу, и в третью – конъюгаты Glu^R-BODIPY и Lys^R-BODIPY, в которых аминокислота присоединена к флуорофору через радикал.

Впервые исследованы спектральные свойства конъюгатов борфторидных комплексов дипиррометена с аминокислотами, различающихся способом присоединения аминокислотного фрагмента к остову флуорофора. Полученные спектры поглощения и 2D- и 3D-спектры флуоресценции, а также ряд важнейших фотофизических характеристик позволили установить закономерности изменения спектральных свойств конъюгатов от их строения.

Впервые определены структурные, энергетические и спектральные характеристики конъюгатов борфторидных комплексов дипиррометена с аминокислотами, различающихся способом присоединения аминокислотного фрагмента к остову флуорофора. Установлен механизм тушения флуоресценции в конъюгатах, обусловленный фотоиндуцированным переносом электрона.

Теоретическая и практическая значимость работы:

Результаты расширяют имеющиеся представления о получении, свойствах и дальнейшем применении конъюгатов борфторидных комплексов дипиррометена с аминокислотами, различающихся способом присоединения аминокислотного фрагмента к остову флуорофора.

Предложенный подход к направленному синтезу конъюгатов борфторидных комплексов дипиррометена с аминокислотами, различающихся способом присоединения аминокислотного фрагмента к остову флуорофора, является простым (одностадийный процесс) и достаточно эффективным (выходы продуктов реакции достигают количественных значений) способом получения соединений такого типа. Разработанная нами методика может быть легко перенесена на более крупные биологические объекты – пептиды и белки.

Синтезированные конъюгаты, в силу присутствия им уникальных спектральных характеристик, а также свойств водорастворимости и биодоступности, могут быть использованы для визуализации различных биологических молекул, включая белки и ферменты, а также для отслеживания их метаболизма и взаимодействий с другими биомономерами, биоолигомерами и биополимерами *in vitro* и *in vivo*. К другим перспективным областям применения данного класса координационных соединений можно отнести доставку лекарственных средств и визуализацию процессов коагуляции крови.

Методология и методы исследования:

Для подтверждения структуры, чистоты и исследования свойств синтезированных соединений был задействован широкий спектр современных методов физико-химического анализа. Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) на ядрах ¹H и ¹¹B

были получены на ЯМР-спектрометре Bruker Avance III 500. Инфракрасные (ИК) спектры были получены на ИК-Фурье спектрометре Bruker VERTEX 80v. Масс-спектры были получены на времяпролетном масс-спектрометре с матричной лазерной десорбционной ионизацией (MALDI TOF) Shimadzu AXIMA Confidence. Спектры поглощения и двумерные спектры флуоресценции были получены на спектрофлуориметре «СОЛАР» SM2203. Трехмерные спектры флуоресценции были получены на флуоресцентном спектрофотометре Agilent Cary Eclipse. Квантовохимические расчеты были проведены в программном пакете PC GAMESS v. 12.

Положения, выносимые на защиту:

На защиту выносятся следующие основные положения и результаты:

- разработан оптимальный метод одностадийного направленного синтеза конъюгатов борфторидных комплексов дипиррометена с аминокислотами, различающихся способом присоединения аминокислотного фрагмента к остову флуорофора;
- синтезированы и идентифицированы 13 новых конъюгатов борфторидных комплексов дипиррометена с аминокислотами, различающихся способом присоединения аминокислотного фрагмента к остову флуорофора: Arg^N-BODIPY, Asp^N-BODIPY, Cys^N-BODIPY, Glu^N-BODIPY, His^N-BODIPY, Lys^N-BODIPY, Met^N-BODIPY, Trp^N-BODIPY, Tyr^N-BODIPY, Cys^C-BODIPY, Glu^C-BODIPY, Glu^R-BODIPY и Lys^R-BODIPY;
- всесторонне изучены спектральные свойства синтезированных конъюгатов с использованием комплекса современных физико-химических методов исследования, включающих как экспериментальные подходы, так и компьютерное моделирование.

Степень достоверности и апробация результатов работы:

Достоверность результатов работы подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных, полученных с использованием ряда современных физико-химических методов анализа, а также согласованностью выводов, сделанных на основе сравнительного анализа экспериментальных, расчетных и литературных данных.

Основные результаты работы были представлены на следующих научных конференциях: IX Региональной студенческой научной конференции «Фундаментальные науки – специалисту нового века» (г. Иваново, 2012 г.), Региональной студенческой научной конференции Дни науки-2015 «Фундаментальные науки – специалисту нового века» (г. Иваново, 2015 г.), VII Конференции молодых ученых по общей и неорганической химии (г. Москва, 2017 г.), VIII Всероссийской молодежной школе-конференции «Квантово-химические расчеты: структура и реакционная способность органических и неорганических молекул» (г. Иваново, 2017 г.), Всероссийской школе-конференции «Фундаментальные науки – специалисту нового века» (Студенческая научная конференция «Дни науки ИГХТУ») (г. Иваново, 2017 г.), Всероссийской научной конференции «Фундаментальные науки – специалисту нового века» (Студенческая научная школа-конференция «Дни науки в ИГХТУ») (г. Иваново, 2018 г.), Кластере конференций 2018 (г. Суздаль, 2018 г.), the Eighth international workshop «Organic electronics of highly-correlated molecular systems» (г. Суздаль, 2018 г.), the Fifth international scientific conference «Advances in synthesis and complexing» (г. Москва, 2019 г.), XII Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем» (Крестовские чтения – 2019) (г. Иваново, 2019 г.).

Публикации:

Основные результаты работы представлены в 5 статьях, опубликованных в журналах из Перечня рецензируемых научных изданий, и 11 тезисах докладов, опубликованных в сборниках трудов научных конференций различного уровня.

Личный вклад автора:

Заключается в изучении литературных источников по теме диссертационного исследования, планировании и проведении большинства экспериментальных и теоретических исследований, обработке, анализе и интерпретации всех полученных результатов. Постановка цели и задач работы, обсуждение результатов и формулировка выводов проводились совместно с научным руководителем.

Структура и объем диссертации:

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 191 цитируемую публикацию. Работа изложена на 134 страницах и содержит 48 рисунков и 10 таблиц.

Основное содержание работы**Введение:**

В данном разделе обоснована актуальность темы исследования, обозначены цели и задачи работы, отражены научная новизна, теоретическая и практическая значимость.

1. Литературный обзор:

В данном разделе приведены основные понятия и базовые принципы биоконъюгации, описаны ключевые области применения биоконъюгатов; рассмотрены особенности химии главных компонентов для построения целевых биоконъюгатов – аминокислот и реакционноспособных борфторидных комплексов дипиррометена (BODIPY); описаны существующие на настоящий момент биоконъюгаты типа аминокислота – BODIPY.

2. Экспериментальная часть:

В данном разделе приведена характеристика реактивов и оборудования, использовавшихся при проведении исследования; описаны методики синтеза и очистки BODIPY-прекурсоров и BODIPY-конъюгатов, представлены данные по их идентификации; описаны методологии проведения квантовохимических расчетов, расчетов диаграмм равновесий в водных растворах аминокислот и расчетов фотофизических характеристик флуорофоров.

3. Результаты и их обсуждение:

В данном разделе обсуждается:

3.1. Получение BODIPY-конъюгатов:

Решение задачи по разработке простого и эффективного подхода к синтезу конъюгатов борфторидных комплексов дипиррометена с аминокислотами осуществлялось в несколько этапов.

На первом этапе на основе результатов квантовохимического моделирования методом ω B97X-D/6-311G(d,p) была определена наиболее энергетически выгодная позиция присоединения функционального спейсера к дипиррометеновому остову – μ -положение.

На втором этапе на основе расчетов диаграмм равновесий в водных растворах аминокислот были определены оптимальные значения pH среды для осуществления направленного синтеза конъюгатов борфторидных комплексов дипиррометена с аминокислотами, различающихся способом присоединения аминокислотного фрагмента к

остову флуорофора. Для получения конъюгатов, в которых аминокислота присоединена к флуорофору через α -аминогруппу, следует использовать в качестве прекурсора NHS-BODIPY с реакционноспособной по отношению к аминам сукцинимидной группой и поддерживать pH реакционной среды не ниже 11,0; исключение составляет Lys, для получения конъюгатов с которым следует поддерживать pH порядка 10,0. Для получения конъюгатов, в которых аминокислота присоединена к флуорофору через α -карбоксылную группу, следует использовать в качестве прекурсора EDA-BODIPY с реакционноспособной по отношению к карбоновым кислотам этилендиаминовой группой и поддерживать pH реакционной среды не выше 2,0. Для получения конъюгатов, в которых аминокислота присоединена к флуорофору через радикал, в случае Glu следует использовать в качестве прекурсора EDA-BODIPY с реакционноспособной по отношению к карбоновым кислотам этилендиаминовой группой и поддерживать pH реакционной среды в интервале от 3,0 до 4,0; в случае Lys следует использовать в качестве прекурсора NHS-BODIPY с реакционноспособной по отношению к аминам сукцинимидной группой и поддерживать pH реакционной среды не ниже 11,0.

На основе этих данных был разработан метод одностадийного направленного синтеза (рисунок 1), позволивший получить ряд конъюгатов борфторидных комплексов дипиррометена с аминокислотами, различающихся способом присоединения аминокислотного фрагмента к остову флуорофора. В общем случае стратегия заключалась в проведении реакции конъюгации между реакционноспособным BODIPY-прекурсором (NHS-BODIPY и EDA-BODIPY синтезированы на основе методик, описанных в [1] и [2], соответственно), растворенным в диметилсульфоксиде (ДМСО), и аминокислотой, растворенной в буферном растворе (БР) с определенным значением pH. Синтез проводился на ледяной бане (2 °C) в течение 12 ч. Достаточно мягкие условия (низкая температура, неагрессивные растворители), которые были подобраны для конъюгации, способствовали исключению возможности протекания побочных реакций и предотвращению деструкции синтезируемых веществ, тем самым позволив достичь количественных (96 – 99 %) выходов.

В результате нами было получено 13 новых конъюгатов борфторидных комплексов дипиррометена с аминокислотами, которые можно разделить на три группы в зависимости от способа присоединения аминокислотного фрагмента к остову флуорофора. В первую группу входят конъюгаты Arg^N-BODIPY, Asp^N-BODIPY, Cys^N-BODIPY, Glu^N-BODIPY, His^N-BODIPY, Lys^N-BODIPY, Met^N-BODIPY, Trp^N-BODIPY и Tyr^N-BODIPY, в которых аминокислота присоединена к флуорофору через α -аминогруппу, во вторую – конъюгаты Cys^C-BODIPY и Glu^C-BODIPY, в которых аминокислота присоединена к флуорофору через α -карбоксылную группу, и в третью – конъюгаты Glu^R-BODIPY и Lys^R-BODIPY, в которых аминокислота присоединена к флуорофору через радикал.

Все синтезированные соединения были охарактеризованы посредством ¹H и ¹¹B ЯМР-спектроскопии, ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии. Результаты идентификации позволяют отнести полученные комплексы к аналитически чистым.

Таким образом, предложенный нами подход к синтезу конъюгатов борфторидных комплексов дипиррометена с аминокислотами, различающихся способом присоединения аминокислотного фрагмента к остову флуорофора, является простым и дос-

¹ Carboxyl BODIPY dyes from bicarboxylic anhydrides: One-pot preparation, spectral properties, photostability, and biolabeling / D. Wang [et al.] // The Journal of Organic Chemistry. – 2009. – Vol. 74, N 20. – P. 7675 – 7683.

² Evaluation of fluorophore-tethered platinum complexes to monitor the fate of cisplatin analogs / J. C. Jagodinsky [et al.] // JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry. – 2015. – Vol. 20, N 7. – P. 1081 – 1095.

таточно эффективным способом получения соединений такого типа. Кроме того, разработанная нами методика может быть легко перенесена на более крупные биологические объекты – пептиды и белки.

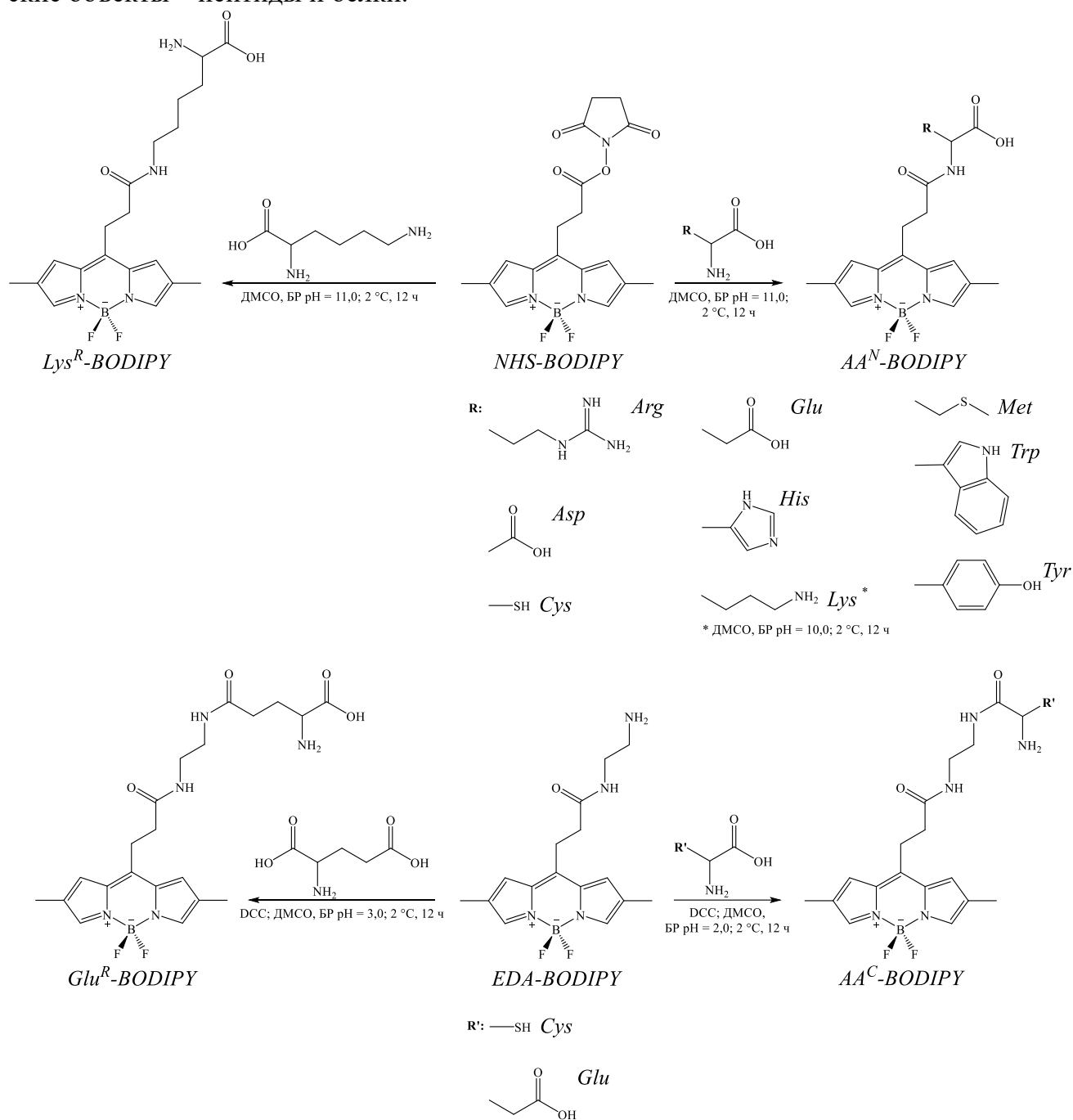


Рисунок 1 – Суммарная схема синтеза конъюгатов борфторидных комплексов дипиррометена с аминокислотами, различающихся способом присоединения аминокислотного фрагмента к остову флуорофора

3.2. Спектральные свойства BODIPY-конъюгатов:

На первом этапе для всего ряда синтезированных флуорофоров были получены спектры поглощения и спектры испускания в смеси ДМСО / соответствующий БР (1:1) (типичный вид спектров поглощения и спектров испускания исследуемых веществ приведен на рисунке 2), а также рассчитаны важнейшие фотофизические характеристики: относительный квантовый выход флуоресценции, молярный коэффициент поглощения, относительное время жизни возбужденного состояния, константы скорости излучательной и безызлучательной дезактивации.

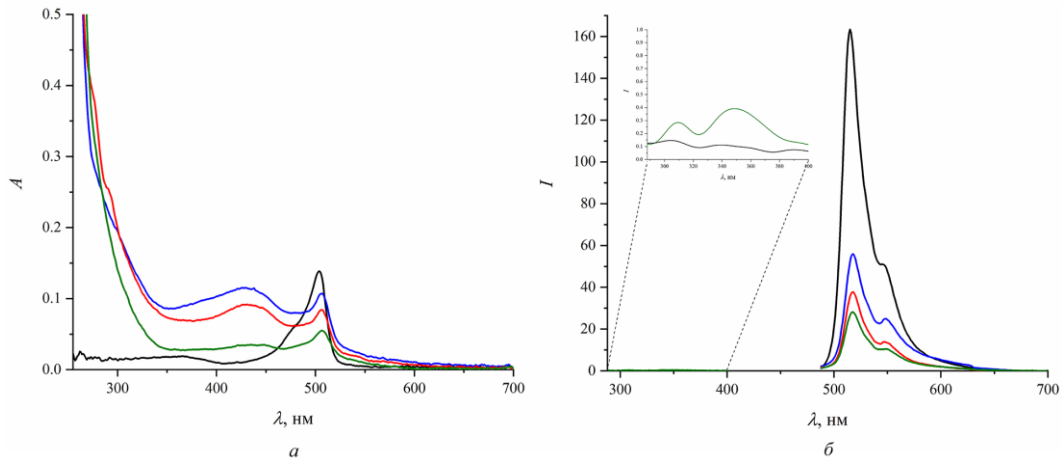


Рисунок 2 – Спектры поглощения (а) и спектры испускания (б) BODIPY-прекурсора NHS-BODIPY (**черный**) и BODIPY-конъюгатов Met^N-BODIPY (**красный**), Trp^N-BODIPY (**зеленый**) и Lys^R-BODIPY (**синий**) в смеси ДМСО/БП (1:1)

Спектры поглощения и спектры испускания BODIPY-прекурсоров являются типичными для данного класса соединений, в то время как спектры поглощения и спектры испускания BODIPY-конъюгатов имеют свои характерные особенности. Так, в спектрах поглощения конъюгатов присутствует три полосы: интенсивная полоса в области 505 – 508 нм, обусловленная переходом S₀–S₁, низкоинтенсивная полоса в области 409 – 450 нм, обусловленная переходом S₀–S₂, и высокоинтенсивная полоса в области 278 – 298 нм, обусловленная переходом S₀–S₃. В спектрах испускания конъюгатов присутствует одна высокоинтенсивная полоса в области 517 – 521 нм. Исключение составляют BODIPY-конъюгаты Trp^N-BODIPY и Tyr^N-BODIPY, в структуре которых присутствуют флуоресцентные аминокислоты Trp и Tyr: в их спектрах испускания имеется еще одна полоса низкой интенсивности с максимумом в области 349 и 306 нм, соответственно, обусловленная флуоресценцией аминокислотного фрагмента.

При переходе от BODIPY-прекурсоров к BODIPY-конъюгатам происходит значительное (в 3 – 6 раз) уменьшение квантовых выходов флуоресценции. Это явление может быть объяснено как повышением вероятности безызлучательных переходов, обусловленном увеличением размера молекулы флуорофора за счет аминокислотного фрагмента, так и возможностью реализации в системах аминокислота – BODIPY механизма фотоиндуцированного переноса электрона (PeT). Кроме того, при переходе от BODIPY-прекурсоров к BODIPY-конъюгатам происходит значительное (в 7 – 22 раза) уменьшение молярных коэффициентов поглощения. Это явление может быть объяснено влиянием аминокислотных фрагментов, проявляющих отрицательный индуктивный эффект, на дипиррометеновый остов, что приводит к деполяризации хромофорной системы лиганда.

Таким образом, синтезированные конъюгаты борфторидных комплексов дипиррометена с аминокислотами обладают хорошими фотофизическими свойствами. С учетом того, что рассматриваемые конъюгаты растворимы в воде, и в их составе присутствует биологически активный аминокислотный фрагмент, все это делает данные соединения более перспективными в плане биодоступности и средства к пептидам и белкам по сравнению с некоторыми другими существующими борфторидными комплексами дипиррометена. Синтезированные конъюгаты могут быть использованы для визуализации различных биологических молекул, включая белки и ферменты, а также для отслеживания их метаболизма и взаимодействий с другими биомономерами, биоолигомерами и биополимерами *in vitro* и *in vivo*. К другим перспективным областям

применения данного класса координационных соединений можно отнести доставку лекарственных средств и визуализацию процессов коагуляции крови.

На втором этапе было проведено спектральное исследование систем NHS-BODIPY – аминокислота в смеси ДМСО / соответствующий БР методом изомолярных серий (типичный вид диаграммы «состав – свойство» исследуемых систем приведен на рисунке 3(а)).

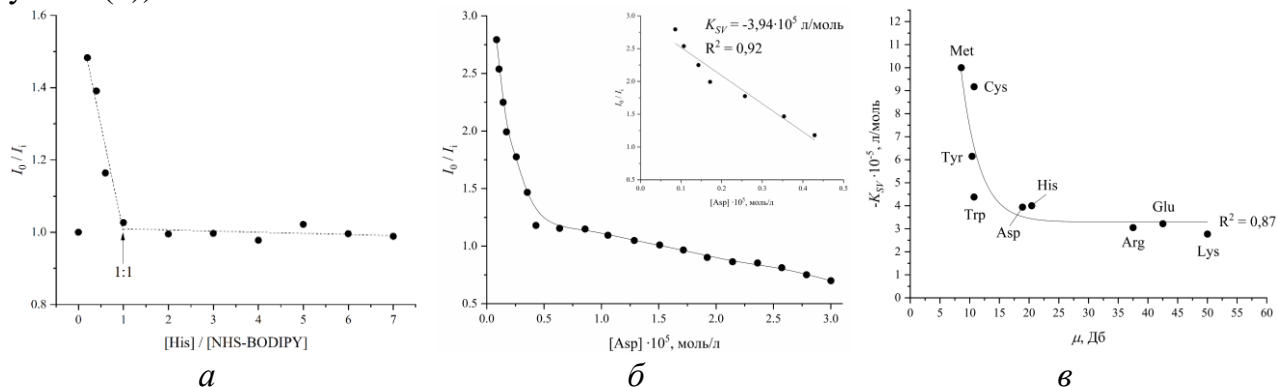


Рисунок 3 – Зависимость отношения интенсивности флуоресценции NHS-BODIPY на длине волны, соответствующей максимуму испускания, без (I_0) и с (I_i) добавлением His от молярного соотношения компонентов ($[His] / [NHS-BODIPY]$) (а); кривая Штерна – Фольмера для процесса разгорания флуоресценции NHS-BODIPY при увеличении концентрации Asp (б); зависимость констант разгорания флуоресценции систем флуорофор – аминокислота от дипольных моментов аминокислот (в)

В общем случае, с ростом концентрации аминокислоты наблюдается небольшой (1 – 4 нм) bathochromic сдвиг максимумов полос поглощения и испускания. Начальная добавка аминокислоты вызывает сильное тушение флуоресценции, которое можно объяснить ориентационным взаимодействием между BODIPY и аминокислотой, после чего происходит ее постепенное разгорание. При равной концентрации компонентов на диаграмме «состав – свойство» появляется точка экстремума (см. рисунок 3(а)), которая указывает на образование флуоресцирующего конъюгата стехиометрического состава.

Таким образом, результаты спектрального исследования рассматриваемых систем методом изомолярных серий являются дополнительным подтверждением образования конъюгатов борфторидных комплексов дипиррометена с аминокислотами требуемого состава.

Объяснение причин разгорания флуоресценции BODIPY-прекурсора при увеличении концентрации аминокислоты в смеси ДМСО/БР было дано на основе результатов анализа зависимости Штерна – Фольмера (типичный вид кривой Штерна – Фольмера для исследуемых систем приведен на рисунке 3(б)): вид и нелинейный характер кривой Штерна – Фольмера свидетельствует о протекании процесса разгорания флуоресценции смешанной природы, который обусловлен как случайными столкновениями молекул флуорофора и аминокислоты (динамический механизм), так и образованием флуоресцирующего комплекса типа флуорофор – аминокислота (статический механизм).

Анализ полученных в ходе обработки кривой Штерна – Фольмера значений констант разгорания флуоресценции и бимолекулярных констант скорости разгорания флуоресценции показал, что для BODIPY-прекурсора NHS-BODIPY величины обеих констант экспоненциально возрастают с увеличением дипольного момента, то есть полярности, аминокислот (см. рисунок 3(в)). Наблюдаемый эффект может быть объяснен

большим сродством молекул неполярных аминокислот к молекулам неполярного флуорофора.

На третьем этапе для всего ряда синтезированных BODIPY-флуорофоров были получены 3D-спектры флуоресценции в смеси ДМСО / соответствующий БР (1:1) (типичный вид 3D-спектров флуоресценции исследуемых веществ приведен на рисунке 4).

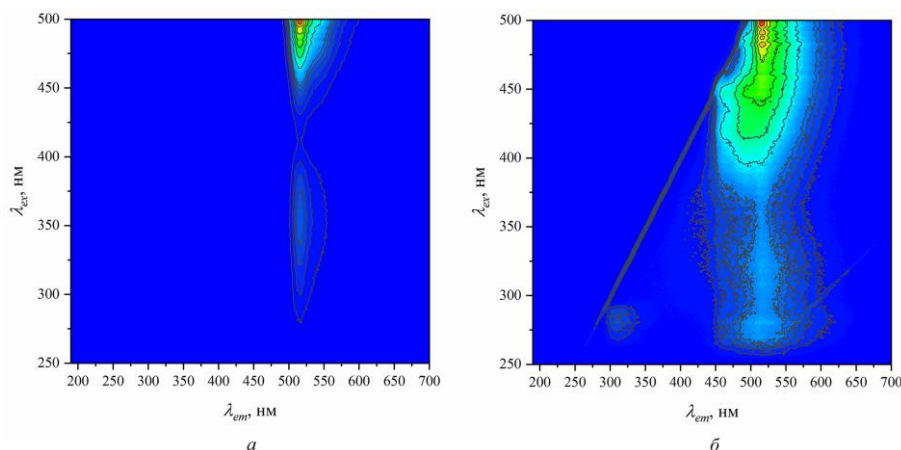


Рисунок 4 – 3D-Спектры флуоресценции BODIPY-прекурсора NHS-BODIPY (а) и BODIPY-конъюгата Tyr^N-BODIPY (б) в смеси ДМСО/БР (1:1)

В 3D-спектрах флуоресценции BODIPY-прекурсоров (см. рисунок 4(а)) присутствуют две характеристичные области с отношениями длин волн возбуждения к длинам волн, соответствующих максимуму испускания, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$, равными $(350 - 360) / (515 - 519)$ и $(500 - 505) / (515 - 519)$ (нм). Описанные пики обусловлены переходами S_0-S_2 и S_0-S_1 , соответственно. В 3D-спектрах флуоресценции всех BODIPY-конъюгатов, за исключением Trp^N-BODIPY и Tyr^N-BODIPY, присутствуют две характеристичные области с $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = (270 - 300) / (500 - 521)$ и $(488 - 504) / (500 - 521)$ (нм). Описанные пики обусловлены переходами S_0-S_2 и S_0-S_1 , соответственно. В 3D-спектрах флуоресценции Trp^N-BODIPY и Tyr^N-BODIPY присутствуют три характеристичные области: две типичных с $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = (275 - 280) / (517 - 519)$ и $(500 - 502) / (517 - 519)$ (нм) и одна новая с $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = (275 - 280) / (306 - 349)$ (нм). Первые два пика так же, как и в случае остальных конъюгатов, обусловлены переходами S_0-S_2 и S_0-S_1 , соответственно, в то время как третий пик обусловлен переходом S_0-S_3 и, несомненно, связан с флуоресценцией аминокислотного фрагмента в конъюгате.

Таким образом, результаты трехмерной флуоресцентной спектроскопии находятся в хорошем согласии с результатами спектроскопии поглощения и двумерной флуоресцентной спектроскопии, так же как и с результатами квантовохимических моделирования.

3.3. Квантовохимическое исследование BODIPY-конъюгатов:

На первом этапе была проведена геометрическая оптимизация молекул исследуемых BODIPY-флуорофоров в основном состоянии методом B3LYP-D3/def2-TZVP.

Анализ структурных параметров BODIPY-конъюгатов позволил установить, что для них характерно наличие внутримолекулярных взаимодействий аминокислотного фрагмента с остовом BODIPY с межатомными расстояниями 1,942 – 2,794 Å. Основными центрами взаимодействия в аминокислотах являются карбонильный кислород, метильный и амидный водород, имидазольный азот, а в BODIPY – водород в β -положении одного из пиррольных колец, водород одной из метильных групп и один из атомов фтора. Важно отметить, что имеющие протяженный спейсер BODIPY-конъюгаты Arg^N-BODIPY, Cys^C-BODIPY и Glu^R-BODIPY склонны к образованию внутримолеку-

лярных водородных связей ($N \cdots H-O$, $F \cdots H-N$).

На следующем этапе был проведен TDDFT анализ исследуемых BODIPY-флуорофоров в основном состоянии методом CAM-B3LYP(DMCO)/def2-SVP.

В отличие от BODIPY-прекурсоров NHS-BODIPY и EDA-BODIPY, в спектрах поглощения которых присутствует две полосы (366, 504 и 365, 507 нм, соответственно), вызванные переходом $\pi-\pi^*$ -типа, для всех исследованных BODIPY-конъюгатов характерно наличие трех разных по интенсивности полос, обусловленных S_0-S_n электронными переходами. Наиболее интенсивная полоса S_0-S_1 имеет максимум в диапазоне 411 – 439 нм, полоса S_0-S_2 лежит в области 307 – 321 нм, в то время как полоса S_0-S_3 – в области 234 – 279 нм. Основной вклад в спектральные свойства исследуемых BODIPY-конъюгатов вносит электронный переход с высшей занятой (ВЗМО) на низшую свободную (НСМО) молекулярную орбиталь. Исключение составляет конъюгат Trp^N -BODIPY, для которого наиболее вероятным электронным переходом является переход ВЗМО-1 – НСМО. Оба электронных перехода S_0-S_1 и S_0-S_2 обусловлены внутримолекулярным $\pi-\pi^*$ переносом энергии в остове BODIPY. Электронный переход S_0-S_3 , обусловленный переходом электрона с более глубоких подуровней (ВЗМО-4 – НСМО, ВЗМО-6 – НСМО, ВЗМО-8 – НСМО, ВЗМО-9 – НСМО), приводит к внутримолекулярному переносу энергии с аминокислотного фрагмента в дипиррометиновое ядро.

Анализ электронного строения показал, что для всех исследованных BODIPY-конъюгатов энергия ВЗМО аминокислотного фрагмента (донор электрона) выше, чем энергия ВЗМО дипиррометинового остова (акцептор электрона) (рисунок 5). Вследствие этого при фотовозбуждении конъюгата энергетически выгодным становится перенос электрона с аминокислотного остатка к дипиррометиновому домену. Таким образом, тушение флуоресценции BODIPY-конъюгатов с высокой вероятностью осуществляется посредством реализации PeT-механизма.

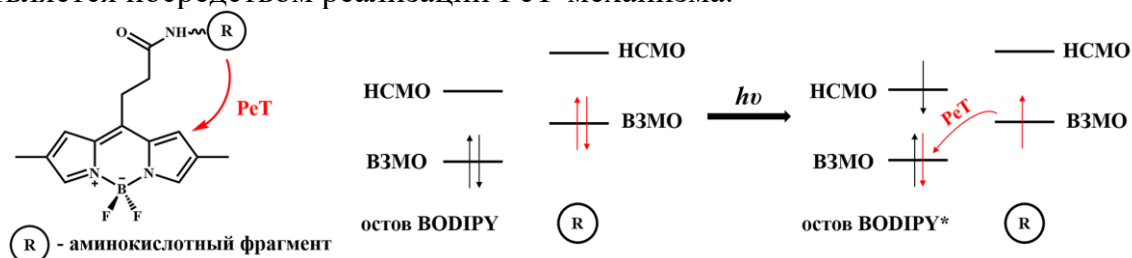


Рисунок 5 – Схема реализации PeT-механизма между аминокислотным фрагментом и остовом BODIPY в BODIPY-конъюгатах (B3LYP-D3/def2-TZVP)

Таким образом, проведенное квантовохимическое исследование позволило объяснить природу изменения спектральных свойств конъюгатов борфторидных комплексов дипиррометена с аминокислотами, различающихся способом присоединения аминокислотного фрагмента к остову флуорофора.

Заключение

Итоги выполненного исследования:

1. Квантовохимические расчеты позволили установить, что наиболее энергетически выгодной позицией присоединения аминокислоты к ядру борфторидного комплекса дипиррометена (BODIPY) является μ -положение остова флуорофора.

2. Расчеты диаграмм равновесий в водных растворах аминокислот позволили определить оптимальные значения pH реакционных смесей для эффективной конъюгации борфторидных комплексов дипиррометена и аминокислот:

- для получения конъюгатов, в которых аминокислота присоединена к флуорофору через α -аминогруппу, следует использовать в качестве прекурсора NHS-BODIPY с сукцинимидной группой в μ -положении и поддерживать pH реакционной среды не ниже 11,0; исключение составляет Lys, для получения конъюгатов с которым следует поддерживать pH порядка 10,0;
- для получения конъюгатов, в которых аминокислота присоединена к флуорофору через α -карбоксылную группу, следует использовать в качестве прекурсора EDA-BODIPY с этилендиаминовой группой в μ -положении и поддерживать pH реакционной среды не выше 2,0;
- для получения конъюгатов, в которых аминокислота присоединена к флуорофору через радикал, в случае Glu следует использовать в качестве прекурсора EDA-BODIPY с этилендиаминовой группой в μ -положении и поддерживать pH реакционной среды в интервале от 3,0 до 4,0; в случае Lys следует использовать в качестве прекурсора NHS-BODIPY с сукцинимидной группой в μ -положении и поддерживать pH реакционной среды не ниже 11,0.

3. Разработан оптимальный метод направленного синтеза конъюгатов борфторидных комплексов дипиррометена с аминокислотами, различающихся способом присоединения аминокислотного фрагмента к остову флуорофора. Синтезировано 13 новых соединений, охарактеризованных методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса, инфракрасной спектроскопии и масс-спектрометрии:

- конъюгаты Arg^N-BODIPY, Asp^N-BODIPY, Cys^N-BODIPY, Glu^N-BODIPY, His^N-BODIPY, Lys^N-BODIPY, Met^N-BODIPY, Trp^N-BODIPY и Tyr^N-BODIPY путем присоединения аминокислоты к флуорофору через α -аминогруппу;
- конъюгаты Cys^C-BODIPY и Glu^C-BODIPY путем присоединения аминокислоты к флуорофору через α -карбоксылную группу;
- конъюгаты Glu^R-BODIPY и Lys^R-BODIPY путем присоединения аминокислоты к флуорофору через радикал.

4. Получены спектры поглощения и спектры флуоресценции, а также рассчитаны фотофизические характеристики для всего ряда флуорофоров. Установлено, что у BODIPY-конъюгатов, в отличие от BODIPY-прекурсоров, значительно (в 3 – 6 раз) снижаются квантовые выходы флуоресценции как за счет повышения вероятности безызлучательных переходов, так и за счет реализации механизма фотоиндуцированного переноса электрона (PeT).

5. Определены константы разгорания флуоресценции и бимолекулярные константы скорости разгорания флуоресценции, а также установлены закономерности изменения эффективности процесса разгорания флуоресценции в системах BODIPY – аминокислота: с увеличением полярности аминокислоты эффективность процесса разгорания флуоресценции флуорофора уменьшается, что обусловлено большим сродством молекул неполярных аминокислот к молекулам неполярного флуорофора.

6. Показано, что квантовохимическое моделирование методами теории функционала плотности (DFT) позволяет в достаточной степени достоверно предсказывать особенности структуры и описывать тенденции изменения спектральных свойств конъюгатов борфторидных комплексов дипиррометена с аминокислотами.

7. Квантовохимическое моделирование позволило обосновать реализацию PeT-механизма тушения флуоресценции конъюгатов борфторидных комплексов дипирроме-

тена с аминокислотами, обусловленного фотоиндуцированным переносом электрона с высшей занятой молекулярной орбитали донора электрона – аминокислотного фрагмента – на высшую занятую орбиталь акцептора электрона – дипиррометенового остова.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы:

Результаты настоящей работы создают научную базу для разработки, изучения и применения новых конъюгатов борфторидных комплексов дипиррометена с природными и синтетическими аминокислотами, а также пептидами и белками.

Перспективным направлением развития настоящей работы является применение исследуемых флуорофоров для целей детектирования, визуализации и мониторинга активности различных биологических молекул белковой природы в клетках, тканях и организмах *in vitro* и *in vivo*.

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации

1. **Ksenofontova, K. V.** Synthesis and study of spectral properties of amino acids – BODIPY conjugates / **K. V. Ksenofontova**, A. A. Ksenofontov, I. A. Khodov, E. V. Rummyantsev // *Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii. Seriya Khimiya i Khimicheskaya Tekhnologiya* (Russian Journal of Chemistry and Chemical Technology). – 2020. – Vol. 63, N 5. – P. 4 – 11.
2. **Ksenofontova, K. V.** Novel BODIPY-conjugated amino acids: Synthesis and spectral properties / **K. V. Ksenofontova**, A. A. Ksenofontov, I. A. Khodov, E. V. Rummyantsev // *Journal of Molecular Liquids*. – 2019. – Vol. 283. – P. 695 – 703.
3. Лыткин, А. И. Термодинамика растворения кристаллического L-метионина в воде / А. И. Лыткин, В. В. Черников, О. Н. Крутова, **К. В. Дамрина (Ксенофонтова)**, И. А. Скворцов // *Журнал физической химии*. – 2016. – Т. 90, № 5. – С. 717 – 720; Lytkin, A. I. Thermodynamics of the dissolution of crystalline L-methionine in water / A. I. Lytkin, V. V. Chernikov, O. N. Krutova, **K. V. Damrina (Ksenofontova)**, I. A. Skvortsov // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. – 2016. – Vol. 90, N 5. – P. 969 – 972.
4. Кочергина, Л. А. Стандартные энтальпии образования L-тирозина, D,L-норлейцина, D,L-триптофана и D,L- α -аланил-D,L-норлейцина и продуктов их диссоциации в водном растворе / Л. А. Кочергина, О. Н. Крутова, **К. В. Дамрина (Ксенофонтова)** // *Журнал физической химии*. – 2015. – Т. 89, № 5. – С. 760 – 763; Kochergina, L. A. Standard enthalpies of formation for L-tyrosine, DL-norleucine, DL-tryptophan, DL- α -alanyl-DL-norleucine, and products of their dissociation in an aqueous solution / L. A. Kochergina, O. N. Krutova, **K. V. Damrina (Ksenofontova)** // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. – 2015. – Vol. 89, N 5. – P. 755 – 758.
5. Кочергина, Л. А. Стандартные энтальпии образования L-цистеина в водном растворе / Л. А. Кочергина, А. И. Лыткин, О. Н. Крутова, **К. В. Дамрина (Ксенофонтова)** // *Известия высших учебных заведений. Серия: «Химия и химическая технология»*. – 2013. – Т. 56, № 9. – С. 38 – 41.
6. **Ксенофонтова, К. В.** Конъюгаты BODIPY с глутаминовой кислотой: синтез и исследование спектральных свойств / **К. В. Ксенофонтова**, Е. В. Румянцев // XII Всероссийская школа-конференция молодых ученых «Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем» (Крестовские чтения). – 2019. – С. 92.
7. **Ksenofontova, K. V.** Cysteine-BODIPY conjugates: Synthesis and spectral properties

- study / **K. V. Ksenofontova**, E. V. Rumyantsev // Book of abstracts of the Fifth international scientific conference «Advances in synthesis and complexing». – 2019. – Vol. 1. – P. 291.
8. **Ksenofontova, K. V.** Synthesis and spectral properties study of lysine-BODIPY conjugates / **K. V. Ksenofontova**, E. V. Rumyantsev // Book of abstracts of the Eighth international workshop «Organic electronics of highly-correlated molecular systems». – 2018. – P. 46.
9. **Ксенофонтова, К. В.** Получение и исследование спектральных свойств конъюгатов BODIPY с рядом аминокислот / **К. В. Ксенофонтова**, Е. В. Румянцев // Кластер конференций 2018. – 2018. – С. 440 – 441.
10. **Ксенофонтова, К. В.** Получение и исследование спектральных свойств конъюгатов BODIPY с лизином / **К. В. Ксенофонтова**, Е. Е. Молчанов, Е. В. Румянцев // Сборник тезисов докладов Всероссийской научной конференции «Фундаментальные науки – специалисту нового века» (Студенческая научная школа-конференция «Дни науки в ИГХТУ»). – 2018. – С. 518.
11. **Ксенофонтова, К. В.** Квантовохимическое исследование конъюгатов BODIPY с рядом аминокислот / **К. В. Ксенофонтова**, А. А. Ксенофонтов, Е. В. Румянцев // Сборник тезисов докладов Всероссийской школы-конференции «Фундаментальные науки – специалисту нового века» (Студенческая научная конференция «Дни науки ИГХТУ»). – 2017. – С. 28.
12. Дамрина, Е. В. Синтез и физико-химическое исследование конъюгата BODIPY с лизином / Е. В. Дамрина, **К. В. Ксенофонтова**, Е. В. Румянцев // Сборник тезисов докладов Всероссийской школы-конференции «Фундаментальные науки – специалисту нового века» (Студенческая научная конференция «Дни науки ИГХТУ»). – 2017. – С. 19.
13. **Ксенофонтова, К. В.** Структурные и энергетические параметры конъюгатов BODIPY с аминокислотами по данным квантовохимических расчетов / **К. В. Ксенофонтова**, А. А. Ксенофонтов, Е. В. Румянцев // Сборник статей VIII Всероссийской молодежной школы-конференции «Квантово-химические расчеты: структура и реакционная способность органических и неорганических молекул». – 2017. – С. 147 – 151.
14. **Ксенофонтова, К. В.** Квантовохимическое исследование структурных и энергетических параметров конъюгатов BODIPY с аминокислотами / **К. В. Ксенофонтова**, А. А. Ксенофонтов, Е. В. Румянцев // Тезисы докладов VII Конференции молодых ученых по общей и неорганической химии. – 2017. – С. 118 – 119.
15. Черников, В. В. Стандартные энтальпии образования ряда аминокислот и дипептидов / В. В. Черников, О. Н. Крутова, **К. В. Дамрина (Ксенофонтова)** // Материалы Региональной студенческой научной конференции Дни науки-2015 «Фундаментальные науки – специалисту нового века». – 2015. – Т. 1. – С. 171.
16. Кочергина, Л. А. Стандартные энтальпии образования L-гистидина и продуктов его диссоциации в водных растворах / Л. А. Кочергина, О. Н. Крутова, **К. В. Дамрина (Ксенофонтова)** // Материалы IX Региональной студенческой научной конференции «Фундаментальные науки – специалисту нового века». – 2012. – Т. 1. – С. 20.