

На правах рукописи



Панфилов Михаил Андреевич

**Синтез флуоресцентных индикаторов и фотоактивируемых доноров
оксида азота (II)**

1.4.3 Органическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук

Новосибирск – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН).

Научный руководитель:	Воробьев Алексей Юрьевич кандидат химических наук заведующий лабораторией фотоактивируемых процессов, НИОХ СО РАН, г. Новосибирск
Официальные оппоненты:	Газизов Альмир Сабирович доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории элементоорганического синтеза им. А.Н. Пудовика, ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФГБУН ФИЦ «Казанский научный центр Российской академии наук», г. Казань Петунин Павел Васильевич кандидат химических наук, доцент Исследовательской школы химических и биомедицинских технологий Национального исследовательского Томского политехнического университета, г. Томск
Ведущая организация:	ФГБУН Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, г. Иркутск

Защита состоится «13» октября 2023г. в 09:30 на заседании диссертационного совета 24.1.192.01, созданного на базе НИОХ СО РАН по адресу: Российская Федерация, 630090, г. Новосибирск, проспект акад. Лаврентьева, д. 9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИОХ СО РАН и на сайте по адресу: <http://web.nioch.nsc.ru/>. Текст автореферата размещен на сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации по адресу: <https://vak.minobrnauki.gov.ru/main>.

Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах, заверенные печатью, просим отправлять по адресу: Российская Федерация, 630090, г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, д. 9, Новосибирский институт органической химии, ученому секретарю диссертационного совета 24.1.192.01; e-mail: dissovet@nioch.nsc.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
Доктор химических наук



Лузина Ольга
Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Оксид азота (II) играет важную роль в качестве сигнальной молекулы в различных системах живых организмов: иммунной, нервной и сосудистой. Исследования показали, что нарушение регуляции NO связано с различными заболеваниями, включая болезни сердца, гипертонию, инсульт и нейродегенерацию. Также известно, что неконтролируемая секреция NO вызывает выработку активных форм кислорода/азота, которые вызывают большое количество патологий, таких как развитие раковых опухолей, ишемия, септический шок, воспаление и нейродегенерация. Хотя NO является относительно стабильным свободным радикалом, он легко и быстро реагирует со радикальными интермедиатами, тиолами и металлсодержащими белками в биологических системах, оказывая физиологические или патофизиологические эффекты. Для более глубокого понимания биологической роли оксида азота необходимы инструменты, которые бы могли помочь отслеживать его секрецию в режиме реального времени *in situ* как *in vitro*, так и *in vivo*.

Флуоресцентная микроскопия с использованием NO-чувствительных флуоресцентных зондов является привлекательным методом анализа, поскольку отличается высокой чувствительностью, высокой скоростью ответа, а также хорошим пространственным разрешением. Для дизайна NO-чувствительных флуоресцентных зондов используются следующие подходы: использование *o*-диаминароматических фрагментов в аэробных условиях, превращение эфиров Ганча в соответствующие пиридины, реакция *N*-нитрозирования аминов с получение диазоциклических соединений, прямое *N*-нитрозирование и др. Самым популярным является подход с использованием остова *o*-фенилендиамина. Несмотря достигнутый прогресс в области флуоресцентных NO-чувствительных зондов, их ограничения по-прежнему зачастую является их подверженность окислению, возможное взаимодействие с различными соединениями, присутствующими в клетках (глутатион, аскорбиновая кислота), «утекание» из клеток, а также плохая растворимость, в связи с чем поиск новых зондов, основанных на различных красителях, по-прежнему является актуальной задачей.

Для исследования влияния NO удобно использовать вещества, которые могут высвободить его в контролируемых количествах. Для этой цели перспективным выглядит использование соединений, которые высвобождают оксид азота (II) под действием света, поскольку с их помощью появляется возможность создавать локальные концентрации NO с высоким пространственным разрешением. В настоящее время для синтеза фотоактивируемых доноров оксида азота (II) используются различные подходы, например, получение нитрозильных и нитрито-комплексов переходных металлов, *N*-нитрозо

соединений, «упакованных»-NONO-атов (“caged” NONOate) и соединений, содержащих в своем осто́ве стерически напряженную нитрогруппу. Стоит отметить, что получение доноров, работающих в области видимого света (450-700 нм), состоит из большого количества стадий, в связи с чем актуальной задачей является разработка упрощенных подходов к их получению.

Степень разработанности темы. В настоящее время представлен широкий ряд различных NO-чувствительных флуоресцентных зондов, работа которых основана на различных принципах (*o*-диаминоароматические соединения, превращение эфиров Ганча в соответствующие пиридины, реакции *N*-нитрозирования ароматических аминов с образованием диазо соединений и др.). В свою очередь, представлен лишь единичный пример зонда на основе акридина в сочетании с *o*-фенилендиаминовым фрагментом, на основе же 9-акридона такие примеры отсутствуют.

Ряд фотоактивируемых доноров NO так же представлен набором различных соединений на основе различных красителей. Однако, практически во всех случаях, синтез подобных соединений включает в себя большое количество стадий.

Цель работы – синтез новых NO-чувствительных флуоресцентных зондов на основе 9-акридона, а также разработка новых соединений, являющихся фотоактивируемыми донорами оксида азота (II) на основе остовов BODIPY и aza-BODIPY и исследование их свойств.

В связи с поставленными целями данная работа сводилась к решению следующих **задач**:

1. Разработка подходов к синтезу производных 1,2-диамино-9(*H*)-акридона и исследование их способности улавливать NO.
2. Синтез соединений, содержащих остов BODIPY и стерически напряженный нитроароматический фрагмент в *мезо*-положении путем реакции конденсации ароматических альдегидов, содержащих стерически напряженные нитрогруппы, с пирролами, с дальнейшим превращением в целевые BODIPY-соединения;
3. Синтез соединений, содержащих остов BODIPY и *N*-нитрозо фрагмент, путем взаимодействия 10-(хлорметил)-5,5-дифтор-1,3,7,9-тетраметил-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,2]диазаборина с первичными аминами и дальнейшим нитрозированием;
4. Синтез соединений, содержащих остов aza-BODIPY и *N*-нитрозо фрагмент путем превращения халконов в aza-BODIPY производные и последующей реакцией нитрозирования;
5. Исследование фотофизических свойств и способности

полученных соединений выделять NO при фотоллизе.

Научная новизна. Были синтезированы и исследованы фотофизические свойства 1,2-диамино-10-(карбоксиметил)-9(10*H*)-акридона и 7,8-диамино-4-карбокси-10-метил-9(10*H*)акридона – производных 9-акридона, содержащие NO-чувствительные фрагменты. Было показано, что 7,8-диамино-4-карбокси-10-метил-9(10*H*)акридон способен успешно взаимодействовать с оксидом азота (II) с образованием флуоресцирующего продукта, а на клеточной культуре Jurkat продемонстрирована возможность визуализации накопления NO.

Были впервые получены производные BODIPY, в остовах которых напрямую через *мезо*-положение были введены арильные заместители, содержащие стерически напряженную нитрогруппу. Для полученных соединений BODIPY, был показан эффект агрегационно-индуцируемой эмиссии со сдвигом полосы испускания в красную область.

Были разработаны методы получения *N*-нитрозо соединений на основе остова BODIPY, позволяющие получать различные производные всего лишь в несколько стадий из общего стартового вещества. Наиболее эффективным фотоактивируемым донором NO оказался N-((5,5-дифтор-1,3,7,9-тетраметил-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,2]диазаборинин-10-ил)метил)-*N*-фениламид азота, для которого квантовый выход высвобождения составляет $\Phi_{\text{NO}} = 5.5 \times 10^{-4}$, что сопоставимо с Φ_{NO} для ранее описанных в литературе доноров. Было показано, что данное соединение способно эффективно ингибировать активацию тромбоцитов *in vitro* при облучении светом. Также было установлено, алкилирование по атому бора и введение атомов йода в ядро хромофора уменьшает эффективность выделения NO, но влияет на способность к генерации синглетного кислорода.

Был осуществлен ряд превращений, который позволил получить фотоактивируемый донор на основе aza-BODIPY, содержащий в своем остове два *N*-нитрозо фрагмента, способный выделять NO под воздействием ближнего инфракрасного света в зависимости от интенсивности используемого излучения. Также на основе полученного вещества была реализована система с обратной связью, позволяющая активно поддерживать заданную концентрацию оксида азота в образце, управляя интенсивностью лазерного излучения.

Теоретическая и практическая значимость. Разработанные подходы к модификациям остова 9-акридона позволили получить новый пример NO-чувствительного флуоресцентного зонда, работающего в диапазоне современных флуоресцентных микроскопов. Также полученные производные 9-акридона могут представлять интерес в качестве стартовых соединений для получения различных новых гетероциклов.

Установленные закономерности влияния заместителей в красителях BODIPY, содержащих *N*-нитрозо фрагменты, позволят более точно настраивать свойства желаемых фотоактивируемых доноров как с точки зрения эффективности выделения NO, так и с точки зрения комбинационного действия NO и синглетного кислорода.

Полученный фотоактивируемый донор на основе aza-BODIPY эффективно выделял NO при облучении ближним инфракрасным светом. Особенностью полученного донора является возможно обратного захвата оксида азота (II), что открывает возможности использования такого донора в качестве буферной системы при проведении биологических исследований. Также на основе полученного донора была разработана установка с системой обратной связи, позволяющая поддерживать постоянную заданную концентрацию NO в растворе *in vitro*.

Методология и методы исследования. В ходе выполнения работы использовались как классические, так и современные методы органического синтеза, основанные на реакциях конденсации, ароматического электрофильного замещения, аминирования и других классических реакциях органической химии. Выделение и очистка соединений осуществлялись методами экстракции, осаждения, хроматографии и кристаллизации. В работе использовались физико-химические методы установления структуры и чистоты химических соединений: ЯМР и масс-спектрометрия высокого разрешения.

Положения, выносимые на защиту:

1. Синтез 1,2-диамино-10-(карбоксиметил)-9(10*H*)-акридона и 7,8-диамино-4-карбокситетрагидро-10-метил-9(10*H*)-акридона;
2. Оценка способности полученных акридонов взаимодействовать с NO с образованием флуоресцирующих продуктов;
3. Синтез новых производных BODIPY путем конденсации 3,5-диметил-4-нитробензальдегида и 4-нитро-3-(трифторметил)бензальдегида с пирролом и 2,4-диметилпирролом;
4. Исследование фотохимических свойств полученных BODIPY, содержащих стерически напряженную нитро-группу;
5. Синтез *N*-нитрозо производных BODIPY путем нитрозирования вторичных аминов, получаемых аминированием тетраметил-мезо-CH₂Cl-BODIPY;
6. Исследование способности полученных *N*-нитрозо BODIPY выделять NO и генерировать синглетный кислород при фотолизе;
7. Синтез 5,5-дифтор-3,7-бис(4-(метил(нитрозо)амино)фенил)-1,9-дифенил-5*H*-дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,5,2]триазаборинин-4-ил-5-уида;

8. Исследование фотовысвобождения NO из полученного N-нитрозо aza-BODIPY.

Степень достоверности обеспечена тщательностью проведения эксперимента и применением современных физико-химических методов исследования структур. Строение всех впервые полученных веществ доказано методами ^1H , ^{13}C , ^{19}F ЯМР, и масс-спектрометрии высокого разрешения. Достоверность результатов подтверждается независимой экспертизой опубликованных материалов в рецензируемых научных изданиях и апробацией на российских и международных конференциях.

Апробация работы. Работа выполнялась в рамках выполнения госзадания № 1021052605821-9-1.4.1 «Фотокатализируемые и фотоактивируемые превращения органических веществ (новая лаборатория)», а также в рамках выполнения гранта РНФ № 18-15-00049 «Динамическое исследование активации тромбоцитов и лейкоцитов человека с целью выявления клеточных механизмов патогенеза микрососудистых осложнений сахарного диабета и создания новых неинвазивных методов их терапии».

По теме диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, и 2 сообщения в виде тезисов докладов.

Личный вклад соискателя состоит в поиске, анализе и обобщении научной литературы по теме диссертации. Автор принимал непосредственное участие в планировании и проведении всех химических экспериментов, обработке экспериментальных данных, анализе и интерпретации полученных результатов, подготовке научных статей и тезисов к публикации.

Структура диссертации. Работа изложена на 164 страницах машинописного текста, содержит 83 схемы, 38 рисунков и 5 таблиц. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы (192 литературных источника) и 10 приложений (стр. 155-164).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во «**Введении**» обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, сформулированы положения, выносимые на защиту. Глава 1 «**Литературный обзор**» состоит из двух основных частей и включает рассмотрение классических и современных подходов в дизайне фотоактивируемых доноров оксида азота (II), а также в дизайне NO-чувствительных флуоресцентных зондов. Обсуждение результатов разделено на две главы. Глава 2 «**Получение производных 9-акридона, содержащих о-**

диаминовый фрагмент, в качестве потенциальных NO-чувствительных флуоресцентных зондов» содержит результаты работы, посвященные получению производных 9-акридона, содержащих в своем остове *о*-диамино ароматический фрагмент, а также изучению фотофизических свойств полученных соединений и их способности визуализировать оксид азота (II) в клеточных условиях. Глава 3 «Получение производных BODIPY и aza-BODIPY, содержащих стерически напряженный нитро-ароматический фрагмент и N-нитрозо фрагмент в качестве потенциальных фотоактивируемых доноров оксида азота» посвящена синтезу производных соединений BODIPY, содержащих стерически напряженный нитро-ароматический фрагмент в *мезо*-положении, и изучению их фотофизических свойств. Также в главе описывается получение новых соединений BODIPY и aza-BODIPY, содержащих N-нитрозо фрагмент, исследование фотофизических свойств и способности полученных соединений выделять NO при облучении. В главе 4 «Экспериментальная часть» представлены методики синтеза и физико-химические характеристики новых соединений.

1. Получение 7,8-диамино-4-карбоксит-10-метил-9(10*H*)акридона

1,2-диаминоантрахинон (DAQ) является коммерчески доступным и дешевым NO-чувствительным зондом, интенсивность флуоресценции которого значительно увеличивается при реакции с NO. Однако низкая растворимость этого зонда и его триазольной формы в воде и большинстве органических растворителей, наряду со сложностью модификации и низкой фотостабильностью являются недостатками данного зонда. Мы предположили, что использование остова 9-акридона, структурно похожего на антрахинон, поможет обойти недостатки зонда DAQ.

В качестве исходного соединения был получен 4-карбоксит-9(10*H*)-акридон (**4**) с помощью реакции Ульмана с дальнейшей циклизацией в серной кислоте согласно схеме 1.

*Схема 1. Синтез 4-карбоксит-9(10*H*)-акридона*

Затем был получен эфир **5**, путем двойного метилирования **4** йодистым метилом в присутствии гидроксида натрия в ДМСО с целью увеличения растворимости (*Схема 2*).

Схема 2. Синтез метил 10-метил-9-оксо-9,10-дигидроакридин-4-карбоксилата (5)

На следующем этапе эфир **5** нитровали концентрированной азотной кислотой в ледяной уксусной кислоте при нагревании. В результате реакции получали основной 7-нитро изомер (**6**), в смеси с 2-нитро изомером и следовыми количествами 5-нитро изомера. Полученную смесь нитропроизводных восстанавливали с помощью гидразин гидрата в этаноле в присутствии палладия на угле. После обработки реакционной смеси удалось выделить 7-амино производное **7**, содержащее незначительное количество примесей (Схема 3).

Схема 3. Синтез метил 7-амино-10-метил-9-оксо-9,10-дигидроакридин-4-карбоксилата (7)

Далее аминогруппу соединения **7** защищали с помощью уксусного ангидрида в уксусной кислоте, с последующим *one pot* нитрованием, путем добавления концентрированной азотной кислоты к реакционной смеси. Выход продуктов за две стадии составил 75%, в составе которых основным продуктом являлось соединение **8** с небольшим количеством примесей. Получение продукта нитрования в 8 положение было подтверждено спектром ^1H ЯМР (Схема 4).

Схема 4. Синтез метил 7-ацетамидо-10-метил-8-нитро-9-оксо-9,10-дигидроакридин-4-карбоксилата (8)

Полученное соединение **8** подвергали гидролизу при кипячении в воде в присутствии 4N NaOH. На этом этапе при осаждении кислоты путем подкисления реакционной смеси удалось выделить чистый продукт **9**, который затем восстанавливали ранее использованной системой $N_2H_4 \cdot H_2O$ в присутствии Pd/C и получали целевой диамин **10** (Схема 5).

Схема 5. Синтез 7,8-диамино-10-метил-9-оксо-9,10-дигидроакридин-4-карбоновой кислоты (**10**)

2. Получение 1,2-диамино-10-(карбоксиметил)-9(10H)-акридона

Из незамещённого 9-акридона (**12**), был получен 1,2-диамино-10-(карбоксиметил)-9(10H)-акридон (**18**) по схеме, аналогичной получению акридона **10** (Схема 6). Для реакции алкилирования был использован этиловый эфир бромуксусной кислоты, а нитро-соединения восстанавливали с помощью муравьиной кислоты в присутствии триэтиламина и Pd/C в этаноле. При использовании гидразин гидрата в качестве восстановителя в результате реакции в качестве основных продуктов получали гидразиды – продукт замещения по карбоксильной группе.

Схема 6. Синтез 1,2-диамино-10-(карбоксиметил)-9(10H)-акридона (**18**)

3. Изучение спектральных характеристик и определение NO

При взаимодействии соединения **18** как с коммерческим донором NO (диэтиламино NONOат), так и в условиях реакции диазотирования ($HCl/NaNO_2$)

были получены сложные смеси веществ, а спектрах поглощения и флуоресценции не было отмечено значительных изменений. Для соединения **10** в аналогичных условиях был выделен и охарактеризован продукт взаимодействия с NO – триазол **10a** (Схема 7), наблюдалось значительное изменение спектра поглощения, а интенсивность флуоресценции увеличилась примерно в 5 раз (*Рисунок 1*). Квантовый выход флуоресценции триазола **10a** составил 0,0145.

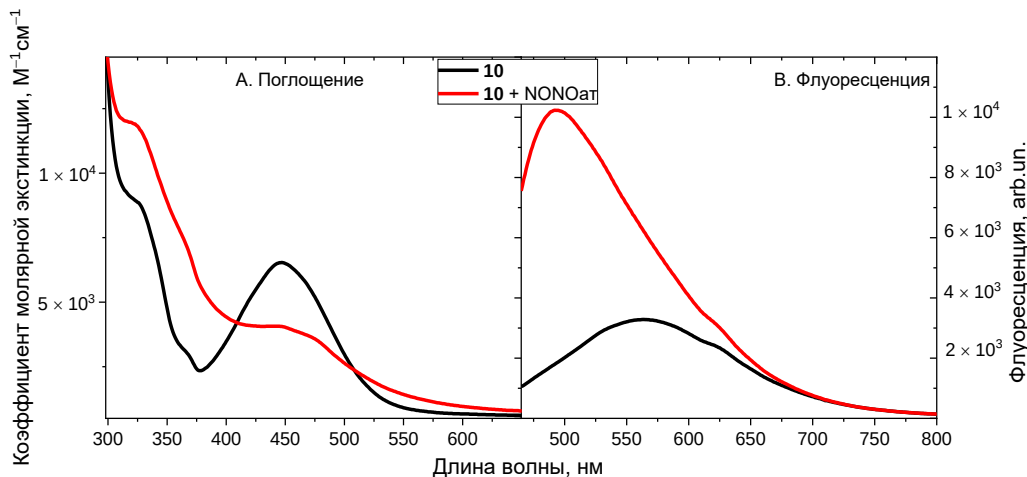


Рисунок 1. Спектры поглощения (А) и флуоресценции (В) соединения **10** до и после реакции с избытком NONOate. Растворитель: вода + 1% ДМСО. Длина волны возбуждения 450 нм

Схема 7. Реакция диазотирования **10**

Для зонда **10** была показана возможность визуализации экзогенного NO в клеточной культуре Jurkat (*Рисунок 2*). Для этого клетки Jurkat инкубировались раствором **10** (вода + 1% ДМСО). На рисунке 2А показано изображение клеток Jurkat с яркой флуоресценцией, что свидетельствует о том, что **10** проникает внутрь клеток. После добавления 6 мМ NONOата, наблюдалось усиление флуоресценции; на рисунке 2С показана та же клетка спустя 3 минуты. Это подтверждает, что зонд **10** взаимодействует с NO также и внутри клеток.

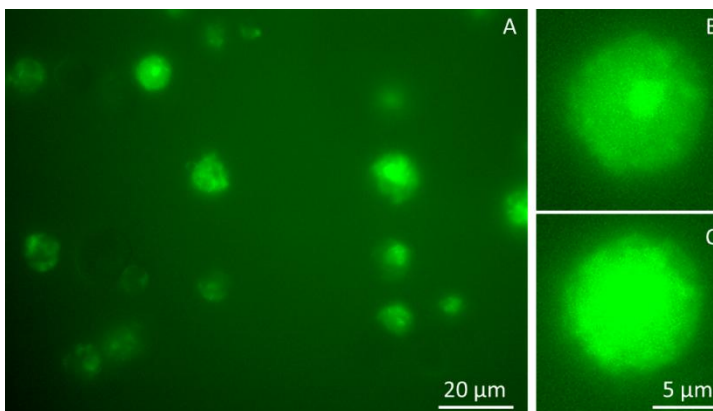


Рисунок 2. (А) Флуоресценция клеток *Jurkat*, инкубированных с **10** в течение 15 минут. (В) Неоднородное распределение флуоресценции. (С) Усиление флуоресценции через 3 минуты после добавления *NONOat*.

4. Получение *мезо*-замещенных производных BODIPY, содержащих стерически напряженную нитрогруппу

В настоящее время в литературе представлен ряд фотоактивируемых доноров NO, основанных на сочетании остова красителя (родамина, флуоресцеина, BODIPY) и стерически напряженного нитро-ароматического фрагмента. Однако синтез таких соединений состоит из большого количества стадий. Мы предположили, что, используя ароматические альдегиды с напряженными нитрогруппами, можно получить различные BODIPY в одну стадию, в которых NO-высвобождающий фрагмент будет напрямую введен в ядро хромофора.

Одним из основных способов получения *мезо*-замещенных BODIPY является реакция конденсации альдегидов или хлорангидридов с пирролами, с дальнейшим окислением и взаимодействием с эфиром трехфтористого бора в присутствии органического основания (Схема 8).

Схема 8. Общая схема синтеза BODIPY

Были получены соединения **19** и **20** путем конденсации соответствующих альдегидов с 2,4-диметил пирролом в присутствии каталитического количества трифторуксусной кислоты, окисления промежуточных продуктов с помощью DDQ

и реакции с эфиром трехфтористого бора в присутствии триэтиламина (Схема 9).

Схема 9. Синтез BODIPY 19 и 20

Также были получены аналоги соединений **19** и **20**, не содержащие метильные группы в ядре хромофора, что могло обеспечить более эффективное сопряжение нитроарильного фрагмента с ядром хромофора. Для этого соответствующий альдегид смешивали с избытком свежеперегнанного пиррола и добавляли трифторуксусную кислоту в качестве катализатора. Получаемый продукт конденсации промежуточно выделяли и растворяли в хлористом метиле. Окисление с помощью DDQ и реакция с $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ в присутствии триэтиламина приводило к получению соответствующих BODIPY **21** и **22** (Схема 10).

Схема 10. Синтез BODIPY 21 и 22

Для изучения влияния триплетного состояния на эффективность фотоактивируемой нитро-нитритной перегруппировки был получен дийод BODIPY **23** путем взаимодействия **19** с N-йодсукцинимидом в хлористом метиле (Схема 11).

Схема 11. Схема синтеза соединения 140

Для полученных соединений были записаны спектры поглощения и флуоресценции. В качестве примера на рисунке 3 показаны нормализованные спектры поглощения и флуоресценции в этаноле соединения **19**. Для соединений **19-22** основная полоса поглощения находится около 500 нм, незначительно сдвинутая в красную область для соединений с CF₃-группой. Вторая полоса при ~350 нм более выражена для соединений **21** и **22** и практически отсутствует для соединений **19** и **20**, что вероятно связано с наличием боковых метильных групп. Полосы поглощения для соединения **23**, содержащего два атома йода, сдвинуты примерно на 30 нм в красную область (Таблица 1).

Таблица 1. Длины волн максимумов поглощения и коэффициенты экстинкции для соединений **19-23**

		19	20	21	22	23
Этанол	λ_{max} , нм	502	505	502	507	535
	$\varepsilon(\lambda_{\text{max}})$, М ⁻¹ см ⁻¹	47040	80250	47520	33330	81700
Н ₂ O + 1% ДМСО	λ_{max}	508	508	502	506	516/541
	$\varepsilon(\lambda_{\text{max}})$, М ⁻¹ см ⁻¹	23200	24610	18580	24670	33180/34060

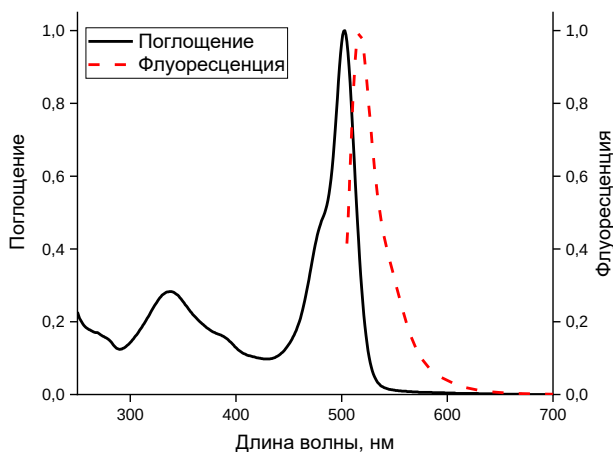


Рисунок 3. Нормализованные спектры поглощения и флуоресценции соединения **19**

Среди продуктов с одинаковыми *мезо*-заместителями, наибольшая интенсивность флуоресценции характерна соединениям с четырьмя метильными группами в ядре хромофора (**19** и **20**). Так как безызлучательные процессы связаны с вращением фенильной группы вокруг С-С связи, метильные группы в положениях 1 и 7 препятствуют этому вращению, в результате чего возрастает доля излучательного перехода. В свою очередь интенсивность флуоресценции выше для соединений с диметил-нитробензольный заместителем **19** и **21**, по сравнению с соединениями с трифторметил-нитробензольным заместителем **20** и **22**. Это может быть связано с облегченным фотоиндуцированным переносом заряда к трифторметил-нитрофенильной группе благодаря ее акцепторной природе.

Таблица 2. Квантовый выход флуоресценции для соединений **19-23**

		136	137	138	139	140
	$\lambda_{\text{фл}}$	512	513	523	542	553
$\Phi_{\text{фл}}$	$\Phi(\lambda_{\text{max}})$	0.116	0.005	0.016	0.003	0.019
	$\Phi(375 \text{ нм})$	0.045	0.003	0.004	0.002	0.011

Была исследована способность полученных соединений к генерации синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$) путем измерения люминесценции синглетного кислорода в насыщенном кислородом растворе CCl_4 . Полученные относительные квантовые выходы синглетного кислорода перечислены в таблице 3.

Таблица 3. Квантовые выходы синглетного кислорода для соединений **19-23**

	19	20	21	22	23
$\Phi_{\Delta}(\text{отн})$	0.3	0.1	—/—	—/—	1

Для полученных соединений была показана возможность реализации агрегационно-индуцируемой эмиссии со сдвигом полосы флуоресценции в красную область. Образование агрегатов отчетливо видно в спектрах излучения (*Рисунок 4*), где с увеличением концентрации красителя появляется дополнительная полоса с максимумом при 650 нм, отмеченная красным прямоугольником. Эта полоса отсутствует в органических растворителях, где присутствует только основная полоса при ~500 нм (отмечена зеленым прямоугольником на рисунке 5В). Такая ситуация характерна для всех соединений **19-23**.

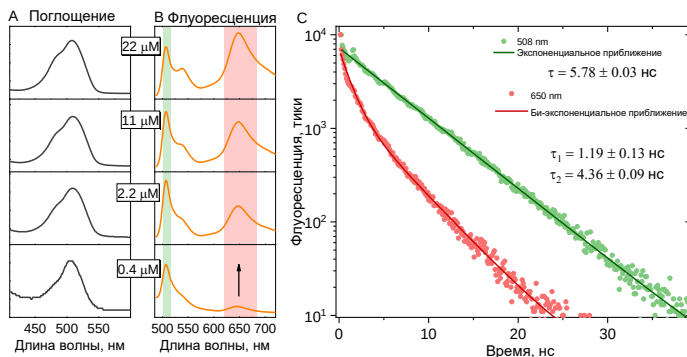


Рисунок 4. Спектры поглощения (А) и флуоресценции (В) для различных концентраций **19** в воде (+1% ДМСО). Дополнительные полосы испускания (предположительно относящиеся к агрегатам) отмечены красным прямоугольником; зеленым прямоугольником отмечены полосы излучения в органических растворителях; (С) измерение временно-разрешенного гашения флуоресценции для двух длин волн излучения

Полученные соединения **19-22** хоть и являются фотохимически активными, они не выделяют NO при облучении видимым светом, по крайней мере в детектируемых количествах, что было установлено с помощью NO-чувствительной ловушки DAR-2 и метода ВЭЖХ.

5. Получение соединений BODIPY с N-нитрозо фрагментом и исследование их фотохимических свойств

Эффективность выделения NO зависит от расстояния между фрагментом, несущим N-NO группу, и остовом хромофора. В частности, на эффективность влияет возможность реализации π - π стэкинга между остовом хромофора и ароматическим фрагментом, содержащим N-нитрозо фрагмент, что может приводить к более эффективному фотоиндуцируемому переносу электрона. Известно, что *мезо*-CH₂-Cl BODIPY (**24**) вступает в реакции замещения с различными аминами. Было предположено, что использование такой реакции позволит нам получить соединения BODIPY, в которых, благодаря малому расстоянию между N-NO группой и возможности вращения C-N связи, сможет реализовываться вышеописанный принцип. Более того, использование одного общего исходного соединения позволит получить серию целевых доноров с различными заместителями и сравнить их эффективность.

Полученный по модифицированной литературной методике *мезо*-CH₂-Cl BODIPY (**24**) путем конденсации хлорацетил хлорида с 2,4-диметилпирролом,

окислением DDQ и реакцией с эфиром трехфтористого бора в присутствии триэтиламина, нагревали с йодидом калия, а затем вводили в реакцию с изопропиламином и анилином в ацетонитриле в присутствии поташа в качестве основания. Дальнейшее нитрозирование полученных вторичных аминов **25** и **26** привело к получению *N*-нитрозо соединений **27** и **28** (Схема 12).

Схема 12. Получение *N*-нитрозо BODIPY 27 и 28

Стоит отметить, что при попытке проведения реакции между анилином и соединения **24** в присутствии гидрида натрия мы получили продукт замещения по боковой метильной группе **25a**, а не по *мезо*-положению, как предполагалось (Схема 13).

Схема 13. Получение BODIPY 25a

Чтобы изучить влияние эффекта тяжелого атома на фотовыделение NO было получено соединение **31** по следующей схеме:

Схема 14. Синтез BODIPY 31

Ранее было показано, что замена атомов фтора в BF_2 -фрагменте на CH_3 -группы в фотоудаляемой группе *мезо*- CH_2 -BODIPY приводит к увеличению эффективности фотоллиза. Были получены соединения **33** и **35** по следующей схеме для исследования влияния замены F на CH_3 на эффективность выделения NO:

Схема 15. Получение BODIPY 33 и 35

Среди полученных соединений самым эффективным донором оказался BODIPY **27**, для которого выход NO составил приблизительно 20% за 2 минуты облучения ($\Phi_{\text{NO}} (\text{EtOH}) = 5,5 \times 10^{-4}$), в то время как замена F на CH_3 значительно снизила эффективность фотовыделения NO для соединения **33** (примерно 4% за 2 минуты, $\Phi_{\text{NO}} (\text{EtOH}) = 4,08 \times 10^{-4}$). Для соединения **31** наблюдалось одновременное выделение NO (примерно 0,33 % за 4 минуты, $\Phi_{\text{NO}} (\text{EtOH}) = 0,47 \times 10^{-4}$) и генерация синглетного кислорода ($\phi_{\Delta} = 0,91$). Его аналог, соединение **35** было способно только к генерации синглетного кислорода ($\phi_{\Delta} = 0,04$). С помощью соединения **27** была продемонстрирована возможность фотодезактивации тромбоцитов.

Таблица 4. Фотофизические свойства N-нитрозо BODIPY в различных растворителях

		27	28	31	33	35
λ_{max} , нм		517	515	546	511	528
$\varepsilon(\lambda_{\text{max}})$, М ⁻¹ см ⁻¹		$7,2 \times 10^4$	$7,75 \times 10^4$	$7,8 \times 10^4$	$8,2 \times 10^4$	$6,2 \times 10^4$
$\lambda_{\text{фл}}$, нм		526	530	546	524	
$\Phi_{\text{фл}}$	ДМСО	0,18	0,44	~0	0,04	~0
Φ_{Δ}	EtOH	0,02	—/—	0,91	0,04	0,04
	CCl ₄	0,005	—/—	0,9		0,014
Φ_{NO}	EtOH	$5,5 \times 10^{-4}$		$0,47 \times 10^{-4}$	$4,08 \times 10^{-4}$	

6. Синтез производных aza-BODIPY, содержащих N-нитрозо фрагмент

Использование красного и ближнего инфракрасного света представляет особую ценность для биологических исследований, поскольку такой свет способен проникать в ткани организма на глубину 4-5 мм, при этом минимизируя возникновение вызывающих побочных процессов. Производные aza-BODIPY имеют высокий коэффициент молярной экстинкции, а спектр их поглощения начинается от 600 нм, благодаря чему они хорошо себя зарекомендовали в различных исследованиях, таких как флуоресцентная биовизуализация и детектирование, фотоакустическая визуализация и детектирование, а также применение в качестве фотосенсибилизаторов в фотодинамической терапии [16].

Из полученного по литературной методике соединения **37** был получен aza-BODIPY **39** в две стадии, согласно схеме 16.

Схема 16. Синтез aza-BODIPY 39

Полоса поглощения полученного донора **39** находится на длине волны 672 нм. При облучении красным светом 660 нм наблюдалось выделение NO, что

сопровождалось изменением спектра поглощения и появлением полосы поглощения на 736 нм, что соответствовало соединению **38**. Интересной особенностью является то, что изменения спектра поглощения происходят намного быстрее в присутствии ловушки DAR-2 или реагента Грисса, что происходит в следствие необратимого удаления NO из системы. Было установлено, что фотолиз **39** является обратимым процессом и происходит согласно схеме 17. Это является интересной особенностью, которая позволяет использовать это соединение не только в качестве источника NO, но и в качестве буферной системы, способной улавливать NO в темноте для дальнейшего фотовысвобождения при облучении.

Схема 17. Схема фотоиндуцированных реакций 39

Нашими коллегами из лаборатории оптики и динамики биологических систем НГУ была разработана установка с системой обратной связи с использованием донора **39**, позволяющая поддерживать постоянную заданную концентрацию NO в растворе *in vitro*.

Нам было также интересно получить водорастворимые соединения-доноры на основе aza-BODIPY, представляющие собой четвертичные аммонийные соли, поскольку в литературе к настоящему моменту нет примеров таких соединений на основе этого хромофора.

Были подобраны условия проведения реакции конденсации ацетофенона **36** и альдегида **40** для получения соответствующего халкона **41**. По реакции Михаэля полученного халкона **41** с нитрометаном было получено соединение **42** (

Схема 18).

Схема 18.

В дальнейшем, полученный нитробутанон **42** вводили в серию превращений, представленной на схеме 19. Полученный аза-дипиррометен **43** вводили в реакцию с эфиром трехфтористого бора в присутствии DIPEA. аза-BODIPY **44** затем вводили в реакцию нитрозирования с помощью нитрита натрия в системе $\text{AsOH}/\text{TGF}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$. Однако в результате реакции была получена сложная смесь, из которой не удалось выделить целевой продукт *N*-нитрозирования. По-видимому, реакция нитрозирования также пошла по ароматическим фрагментам, которые содержат сильные донорные заместители.

Схема 19.

Заключение и выводы

1) Предложены подходы к синтезу 1,2-диамино-10-(карбоксиметил)-9(10H)-акридона и 7,8-диамино-4-карбокси-10-метил-9(10H)акридона. Было показано, что 7,8-диамино-4-карбокси-10-метил-9(10H)акридон способен успешно взаимодействовать с оксидом азота (II) с образованием флуоресцирующего продукта и визуализировать NO *in vitro* в клеточной культуре Jurkat;

2) Получен ряд производных BODIPY, содержащих в мезо-положении арильный заместитель со стерически напряженной нитрогруппой и исследовано влияние заместителей на фотофизические и фотохимические свойства. Показано, что изменения заместителей могут приводить к изменению интенсивности флуоресценции вплоть до двух порядков, а йодированное производное характеризуется высокой эффективностью генерации синглетного кислорода. Также показано, что для полученных соединений характерна агрегационно-индуцируемая эмиссия с появлением дополнительной полосы флуоресценции в красной области;

3) Исходя из легкодоступного *мезо*-хлорметил-1,3,5,7-тетраметил-BODIPY были получены производные BODIPY, содержащие $\text{CH}_2\text{N}(\text{NO})\text{R}$ -группу ($\text{R} = \text{Ph}$, $i\text{-Pr}$) в *мезо*-положении. Показано, что наибольшую эффективность фотовысвобождения NO проявляют соединения с $\text{R} = \text{Ph}$ и группой BF_2 в осто́ве BODIPY. Замена BF_2 на BMe_2 приводит к снижению эффективности генерации NO, а введение атомов йода в остов BODIPY приводит к дополнительной генерации синглетного кислорода. С помощью донора *N*-((5,5-дифтор-1,3,7,9-тетраметил-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,2]диазаборинин-10-ил)метил)-*N*-фенилнитрозамида была продемонстрирована возможность фотодеактивации тромбоцитов *in vitro*;

4) *N,N'*-((5,5-дифтор-1,9-дифенил-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-дипирроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,5,2]триазаборинин-3,7-диил)бис(4,1-фенилен))бис(*N*-метилнитрозоамид), сочетающий остов *aza*-BODIPY и два фрагмента *N*-NO. Показано, что данное вещество обратимо выделяет NO при облучении светом с длиной волны 660 нм. На основе полученного NO-донора было разработано устройство с системой обратной связи, позволяющее поддерживать заданную концентрацию оксида азота (II) в растворе.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Design and Synthesis of New Acridone-Based Nitric Oxide Fluorescent Probe / **М. А. Панфилов**, D. Chernova, I. Khalfina [et al.] // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – № 14. – P. 4340.
2. Photophysical properties of BODIPYs with sterically-hindered nitrophenyls in *meso*-position / **М. А. Панфилов**, Т. Ю. Karogodina, Y. Songyin [et al.] // *Journal of Luminescence*. – 2022. – Vol. 246. – P. 118837.
3. Photocontrolled release of nitric oxide for precise management of NO concentration in a solution / E. O. Zhernolenko, Т. Ю. Karogodina, А. Ю. Vorobev [et al.] // *Materials Today Chemistry*. – 2023. – Vol. 29. – P. 101445.
4. **М.А. Панфилов**, А.Ю. Воробьев. Дизайн и синтез новых NO чувствительных флуоресцентных зондов на основе 9-акридона. Сборник тезисов Всероссийского конгресса по химии гетероциклических соединений, «КОСТ-2021», С. 253. Сочи, Россия, 2021. (стендовый доклад)
5. **М.А. Панфилов**, Т.Ю. Карогодина, И.С. Третьякова, А.Ю. Воробьев, А.Е. Москаленский. *N*-Nitroso-BODIPY derivatives as effective light activated NO donors. Сборник тезисов международной мультikonференции «Биоинформатика Геномной Регуляции и Структурной/Системной Биологии» – «BGRS/SB-2022», С. 793. Новосибирск, Россия, 2022 г. (стендовый доклад)