

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

БУГЕРА ОЛЕКСАНДРА ІГОРІВНА

УДК547.97+547.8+547-32+543.48+
577.152.27+535.343+543.062

ДИСЕРТАЦІЯ

**СИНТЕЗ І ВЛАСТИВОСТІ МОНО- ТА ДИХРОМОФОРНИХ
ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ ЗОНДІВ ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ АТФ**

02.00.03 – органічна хімія

Подається на здобуття наукового ступеня
кандидата хімічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

(підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник:
ПІВОВАРЕНКО ВАСИЛЬ ГЕОРГІЙОВИЧ
доктор хімічних наук, професор

Київ – 2018

АНОТАЦІЯ

Бугера О.І. Синтез і властивості моно- та дихромофорних флуоресцентних зондів для детекції АТФ. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.03 «Органічна хімія». – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2018.

Аденозин 5'-трифосфат (АТФ) є критично важливою та багатофункціональною складовою усіх організмів. Це не тільки основна енергетична валюта у більшості клітинних процесів, він є також учасником сигнальних процесів, зокрема - фосфорилування білків та утворення циклічного аденозин монофосфату (цАМФ). Рівень концентрації внутрішньоклітинного АТФ зазвичай перебуває в діапазоні від 1 до 10 мМ (частіше 2-3 мМ), але він може помітно коливатись у різних типах клітин та субклітинних областей. Вивільнення внутрішньоклітинного АТФ може впливати на поглинання кальцію та сигналізацію, регулювати протеасомну функцію, модулювати канали іонів калію, знижувати рухливість лімфоцитів та опосередковувати швидку мікрогліальну реакцію. Беручи до уваги ключову роль АТФ у більшості клітинних процесів, необхідно мати можливість контролювати динаміку та просторовий розподіл АТФ *in vivo*, аби уможливити вивчення складних механізмів за участю АТФ.

Існує значне число методів для визначення усередненого рівня АТФ. Найпоширенішим є застосування АТФ - залежної люциферин - люциферазної реакції, високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), капілярного електрофорезу (КЕ) та спектроскопії ядерного магнітного резонансу (ЯМР). Останнім часом повідомлялося про різноманітні підходи для детекції АТФ,

такі як колориметричні зонди, електрохімічні та хемілюмінесцентні сенсори. Однак ці методи мають серйозні обмеження при вимірюванні концентрацій АТФ *in vitro*. Мало які з них можуть бути застосовані для візуалізації та моніторингу розподілу і динаміки АТФ у організмах через низьку чутливість, низьку роздільну здатність, цитотоксичність або погану сумісність з живими клітинами. На противагу цьому, молекулярні флуоресцентні зонди мають переваги при візуалізації динаміки АТФ завдяки швидкій відповіді, високій чутливості, стабільності сигналу, тривалому часу роботи і зручності маніпулювання.

У цьому аспекті 3-гідроксихромони, як нещодавно відкритий клас флуоресцентних зондів для детекції АТФ, мають значні переваги внаслідок простоти будови молекули, синтетичної доступності та можливості генерації ратіометричного флуоресцентного сигналу, який значно покращує кількісне визначення аналіту.

Наукова новизна одержаних результатів. Досліджено серію із тридцяти трьох синтезованих раніше флавонолів, біс-флавонолів, 3-гідроксихромонів та 3-гідроксихінолонів у аспекті можливості їх застосування як флуоресцентних зондів для визначення концентрації АТФ у водних розчинах. Встановлено, що 30 із досліджених барвників можуть служити зондами АТФ. Оскільки комплексоутворення відбувається при нейтральних значеннях рН у межах фізіологічних концентрацій АТФ та Mg^{2+} , більшість досліджених барвників можуть бути використані як флуоресцентні зонди для вимірювання концентрації АТФ у водних розчинах, у тому числі - в клітинному середовищі.

Вперше синтезовано ряд молекулярних флуоресцентних зондів для детекції АТФ, що містять один та два хромофори. Окремі монохромофорні сполуки мають аніонну, катіонну та цвіттеріонну природу, а також містять інші замісники, що змінюють орієнтацію та афінітет компонентів у комплексі, а також селективність до АТФ та інших нуклеотидів. Біхромофорні сполуки –

«молекулярні пінцети» для флуоресцентної детекції АТФ, містять довгі (активні та пасивні) і короткі лінкери.

Досліджено афінитет та селективність синтезованих флуоресцентних зондів до АТФ, ГТФ, АДФ та АМФ у водних розчинах. Виявлено сполуки, що демонструють селективність до АТФ та до ГТФ.

Показано, що синтезований молекулярний пінцет з довгим лінкером у водних розчинах існує у «закритій» конформації як наслідок стекінгу його планарних гідрофобних частин. У цій же «закритій» конформації він існує у комплексі з АТФ – як мінімум, у випадку 20% його популяції. Наявність окремої смуги збудження другого, віддаленого від АТФ хромофору створює зручні умови для ратіометричного визначення концентрації комплексу пінцет – АТФ. Указані можливості разом із більш широкими межами детекції АТФ є суттєвими перевагами молекулярного пінцету у порівнянні з простими монохромофорними конструкціями флуоресцентних зондів.

Встановлено, що корисний сигнал зв'язування зонду 4'-диметиламіно-флавонолу з АТФ – довгохвильова компонента спектру збудження, зберігається у широких інтервалах рН (від 5.7 до 9) концентрацій органічного буферу ТРИС (0-440 мМ), сахарози (0-250 мМ) і натрій хлориду (0-180 мМ). Такі дані свідчать про можливість флуориметричного визначення концентрації АТФ у широких межах рН, у присутності високих концентрацій органічних сполук у розчині та при високій іонній силі розчину. Фізіологічні концентрації катіонів Mg^{2+} (до 5 мМ) не заважають визначенню АТФ.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено, синтезовано та досліджено нові флуоресцентні зонди на основі 3-гідроксифлавонолу для селективної детекції АТФ у водних розчинах, в діапазоні його концентрацій 0,001-55 мМ.

Дисертаційна робота присвячена дизайну, синтезу флуоресцентних зондів для детекції АТФ на основі 3-гідроксифлавонолу та вивчення взаємозв'язку

структура – ефективність у визначенні АТФ методами флуоресцентної спектроскопії. Встановлення афінітету, селективності та меж детекції АТФ для синтезованих сполук. Серію із тридцяти трьох синтезованих раніше флавонолів, біс-флавонолів, 3-гідроксихромонів та 3-гідроксихінолонів досліджено у аспекті можливості їх застосування як флуоресцентних зондів для визначення концентрації АТФ у водних розчинах. Встановлено, що більшість із досліджених барвників можуть служити зондами АТФ. Серед усіх барвників вісім сполук демонструють найкращий діапазон детекції, який добре узгоджується з діапазоном концентрації АТФ у клітинах, і чутливість виявлення АТФ яка перевищує можливості відомого аналога. Лише 3 сполуки з 33-х виявилися непридатними до флуоресцентної детекції АТФ. Вся серія з тридцяти барвників являє собою набір для виявлення АТФ, що дозволяє вибирати зонд з відповідним спектром збудження та емісії, розміром, гідрофобністю або зарядом. Оскільки комплексоутворення відбувається при нейтральних значеннях рН у межах фізіологічних концентрацій АТФ та Mg^{2+} , більшість досліджених барвників можуть бути використані як флуоресцентні зонди для вимірювання концентрації АТФ у розчинах та живих клітинах.

Синтезовано ряд флуоресцентних зондів, що містять один та два хромофори. Окремі монохромофорні сполуки мають аніонну, катіонну та цвіттеріонну природу, а також містять інші замісники, що змінюють орієнтацію компонентів у комплексі, а також афінітет та селективність до АТФ. Біхромофорні сполуки – «молекулярні пінцети», містять довгі (активні та пасивні) і короткі лінкери, які теж змінюють як орієнтацію компонентів у комплексі, так і афінітет та селективність пінцету до АТФ.

Результати флуориметричних досліджень взаємодії флавонолів з нуклеотидфосфатами у водних розчинах за нейтральних значень рН свідчать, що комплексоутворення з нуклеотидами проявляється у наступних спектральних ефектах:

- Зменшення оптичної густини у спектрах поглинання за рахунок стекінгу флавонолу з нуклеїною основою
- Збільшення інтенсивності флуоресценції внаслідок зменшення концентрації молекул води в оточенні флавонолу та усунення гасіння флуоресценції водою. У випадках флавонолів з електроноакцепторними замісниками цей ефект часто маскується відомим ефектом гасіння флуоресценції нуклеїною основою за рахунок фотоперенесення електрону на флавонол. Проте при утворенні комплексу 1:2 таке гасіння блокується внаслідок компенсації електроноакцепторності флавонолу другою нуклеїною основою.
- Поява нової смуги у спектрах збудження флуоресценції внаслідок потужного електростатичного ефекту фосфатних груп нуклеотиду на хромофор флавонолу.

На основі проведених титрувань флавонолів з ГТФ, АДФ та АМФ виявлено сполуки, що демонструють селективність до АТФ або до ГТФ. Отримані результати вказують, що комплексоутворенню сприяють не лише π - π стекінгові взаємодії між ароматичними кільцями флавонів і нуклеозадфосфатів та електростатичні взаємодії між позитивно зарядженою частиною диполу 3-гідроксифлавонолу та фосфат аніоном, а й додаткові гідроксильні групи у боковому ядрі 3-гідроксифлавонолу. Сполуки, які містять захищену 3-гідроксигрупу проявляють слабкіші ефекти у спектрах флуоресценції та мають нижчий афінитет до нуклеотидів. Отже, 3-ОН група приймає участь у комплексоутворенні та у формуванні спектральної відповіді на комплексоутворення.

Синтезований молекулярний пінцет 30 продемонстрував свою ефективність у детекції АТФ, а його флуоресцентні властивості дозволили розкрити будову комплексів з АТФ. Встановлено, що молекулярний пінцет у водних розчинах існує у «закритій» конформації як наслідок стекінгу його планарних гідрофобних частин. У цій же «закритій» конформації він існує у комплексі з

АТФ – як мінімум, у випадку 20% його популяції. Значний (100 нм) зсув смуги збудження комплексу пінцет – АТФ та її мала напівширина створюють покращені умови для селективного збудження флуоресценції цього комплексу з метою його детекції у розчинах. Наявність окремої смуги збудження другого, віддаленого від АТФ хромофору створює зручні умови для ратіометричного визначення концентрації комплексу пінцет – АТФ. Указані можливості разом із більш широкими межами детекції АТФ є суттєвими перевагами молекулярного пінцету у порівнянні з простими монохроматорними конструкціями флуоресцентних зондів.

Ключові слова: флавонол, молекулярний пінцет, флуоресцентний зонд, АТФ, АДФ, АМФ, ГТФ, спектрофотометрія, флуоресцентна спектроскопія

SUMMARY

Bugera O.I. Synthesis and properties of mono- and dichromophore fluorescence probes for ATP detection. – Qualification research paper published as the manuscript.

Thesis for a candidate degree in chemistry speciality 02.00.03 Organic Chemistry. Taras Shevchenko National University of Kyiv of MES of Ukraine, Taras Shevchenko National University of Kyiv of MES of Ukraine, Kyiv, 2018.

Adenosine 5'-triphosphate (ATP) is an important and multifunctional component of all organisms. It is not only the main energy currency in cellular processes, also it is a participant in signaling processes, particularly in the proteins phosphorylation and the formation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP). Usually, the level of intracellular ATP is kept in the range from 1 to 10 mM (more often 2-3 mM), but it significantly fluctuates in different types of cells and sub-cell regions. Releasing intracellular ATP can affect calcium absorption and signaling, regulate the proteasome function, modulate potassium ion channels, reduce lymphocyte mobility, and mediate a rapid microglial reaction. Considering the key role of ATP in most cellular processes, it is important to have the opportunity to control the dynamics and spatial distribution of ATP *in vivo* to enable the study of complex mechanisms involving ATP.

There are a significant number of methods for determining the average level of ATP. The most common use is the ATP-dependent luciferin-luciferase reaction, high-performance liquid chromatography (HPLC), capillary electrophoresis (CE), and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). Recently, various approaches have been reported for the detection of ATP, such as colorimetric probes, electrochemical and chemiluminescent sensors. However, these methods have serious limitations when measuring ATP concentrations *in vitro*. Few of them can be used to visualize and monitor the distribution and dynamics of ATP in organisms

due to low sensitivity, low resolution, cytotoxicity or poor compatibility with living cells. In contrast, molecular fluorescence probes have the advantage of visualizing the ATP dynamics due to fast response, high sensitivity, signal stability, long working time and ease of manipulation.

In this aspect, 3-hydroxychromones, as the recently discovered class of fluorescence probes for ATP detection, have significant advantages due to the simplicity of the molecule structure, synthetic availability and possibility of generating a ratiometric fluorescence signal, which greatly improves the quantitative determination of the analyte.

Scientific novelty of the obtained results. A series of thirty-three previously synthesized flavonols, bis-flavonols, 3-hydroxychromones and 3-hydroxyquinolones was investigated in the aspect of their application as fluorescence probes for determining the ATP concentration in aqueous solutions. It has been found that 30 of the investigated dyes can serve as ATP probes. Since complexation occurs at neutral pH values within the physiological concentrations of ATP and Mg^{2+} , most of the investigated dyes can be used as fluorescence probes for measuring the ATP concentration in aqueous solutions, including in cellular media.

The individual monochromophoric compounds have been synthesized having anionic, cationic, and zwitterionic nature. They also contain other substituents that change orientation and affinity of components in the complex, as well as selectivity to ATP and other nucleotides. The affinity and selectivity of synthesized fluorescent probes for ATP, GTP, ADP, and AMP in aqueous solutions have been studied. Have been identified the compounds exhibiting selectivity to ATP and to GTP.

For the first time, a series of molecular fluorescence probes for ATP detection containing one and two chromophores were synthesized. Bichromophoric compounds - "molecular tweezers" for fluorescence detection of ATP contain long (active and passive) and short linkers.

It is shown that synthesized molecular tweezers with a long linker in aqueous solutions exist in the "closed" conformation as a result of stacking of planar hydrophobic parts. In the same "closed" conformation, it exists in combination with ATP - at least in 20% of its population. The presence of a separate excitation band of the second chromophore, remote from the ATP creates convenient conditions for the ratiometric determination of the complex "tweezer - ATP". These features, together with the wider limits of ATP detection, are essential advantages of molecular tweezers compared to simple monochromophoric structures of fluorescence probes.

It is established that the useful signal of binding of the 4'-dimethylamino-flavonol probe to the ATP - long-wavelength component of the excitation spectrum is retained within wide pH intervals (from 5.7 to 9) of the organic buffer TRIS (0-440 mM), sucrose (0-250 mM), and sodium chloride (0-180 mM) concentrations. Such data indicate the possibility of fluorometric determination of the concentration of ATP in wide pH range, in the presence of high concentrations of organic compounds in the solution and at the high ionic strength of the solution. The physiological concentrations of Mg^{2+} cations (up to 5 mM) do not interfere with ATP determination.

Practical value of the results. New fluorescent probes based on 3-hydroxyflavone were developed, synthesized and investigated for selective detection of ATP in aqueous solutions, in the concentration range 0.001-55 mM.

The thesis dedicated to the design, synthesis of fluorescent probes based on 3-hydroxyflavone for the ATP detection and to study the structure - efficiency relationship in the determination of ATP by fluorescence spectroscopy; establishing affinity, selectivity and detection limits of ATP for synthesized compounds. A series of thirty-three previously synthesized flavonols, bis-flavonols, 3-hydroxychromones and 3-hydroxyquinolones have been investigated in the aspect of the possibility of their use as fluorescence probes to determine the concentration of ATP in aqueous solutions. It has been established that most of the investigated dyes can serve as

ATP probes. Among all dyes, eight compounds exhibit the best detection range, which is well consistent with the range of ATP concentrations in cells, and the sensitivity of ATP detection is greater than that of known analogs. Only 3 of the 33 compounds were not suitable for fluorescence detection of ATP. The whole series of thirty dyes is a set for ATP detection, which allows selecting a probe with an appropriate spectrum of excitation and emission, size, hydrophobicity or charge. Since complexation occurs at neutral pH values within of the physiological concentrations limits of ATP and Mg^{2+} , most of the investigated dyes can be used as fluorescence probes for measuring the concentration of ATP in solutions and living cells.

A series of fluorescent probes containing one and two chromophores was synthesized. The individual monochromophoric compounds have anionic, cationic, and zwitterionic nature, and also contain other substituents that change the orientation of the components in the complex, as well as affinity and ATP selectivity. The bichromophoric compounds are "molecular tweezers" that contain long (active and passive) and short linkers, which also change both the orientation of the components in the complex, and the affinity and selectivity of the tweezer to the ATP.

The results of fluorometric studies of the interaction of flavonols with nucleotide phosphates in aqueous solutions at neutral pH values indicate that complexation with nucleotides displays in the following spectral effects:

- Hypochromic effect in absorption spectra caused by stacking flavonol with a nucleic base.
- Increase in the fluorescence intensity due to the decrease in the concentration of water molecules in the environment of flavonol and elimination of fluorescence quenching by water. In cases of flavonols with electron-acceptor substituents, this effect is often masked by the known effect of fluorescence quenching on a nucleic base due to photoinduced electron transfer to flavonol. However, at the formation of

1:2 complex, such quenching is blocked due to the compensation of the electron-accepting properties of flavonol by the second nucleic base.

- The appearance of a new band in the excitation spectra of due to the powerful electrostatic effect of the nucleotide phosphate groups on flavonol chromophore.

Based on the titrations of flavonols with GTP, ADP, and AMP, it was detected compounds exhibiting selectivity to ATP and to GTP. The results indicate that promotes complex formation is not only π - π stacking interactions between aromatic rings of flavones and nucleoside phosphates, and electrostatic interactions between positively charged dipole part of 3-hydroxyflavones and phosphate anion but more hydroxyl groups in the side core 3-hydroxyflavones. Compounds containing a protected 3-hydroxy group exhibit lesser effects in fluorescence spectra and have a lower affinity for nucleotides. Consequently, the 3-OH group participates in complex formation and in the formation of the spectral response to complexation.

The synthesized molecular tweezer 30 demonstrated its effectiveness in detecting ATP. Its fluorescence properties allowed the disclosure the spatial features of the complex structure with ATP. It was established that molecular tweezers in aqueous solutions exist in the "closed" conformation as a result of stacking of planar hydrophobic parts. In the same "closed" conformation it exists in the complex with ATP - at least in the case of 20% of its population. Significant (100 nm) red shift of the excitation band of the "tweezers-ATP" complex and its small band half-width create better conditions for the selective excitation of its fluorescence in order to detect it in solutions. The presence of a separate excitation band of the second chromophore of remote from the ATP location creates convenient conditions for the ratiometric determination of the concentration of ATP. These features, together with the wider limits of ATP detection, are essential advantages of molecular tweezers compared to simple monochromophoric structures of fluorescence probes.

Keywords: flavonol, molecular tweezer, fluorescent probe, ATP, ADP, AMP, GTP, spectrophotometry, fluorescent spectroscopy

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Бугера О. І.**, Пивоваренко В. Г. Утворення агрегатів метоксифлавонолів з АТФ. *Укр. Хім. Журн.* **2017**, 83, № 2, 121-128. (*Особистий внесок здобувача: проведення систематизації даних літератури, аналіз дослідження, участь в обговоренні результатів та написанні статті*).
2. Пивоваренко В. Г., **Бугера О. І.** (2016). Патент України 113132 «Застосування 2-арил-3-гідроксихінолін-4-онів як флуоресцентних зондів для визначення аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах». Державне патентне відомство України. (*Особистий внесок здобувача: проведення систематизації даних літератури, аналіз дослідження, участь в обговоренні результатів, написання патенту*).
3. Пивоваренко В. Г., **Бугера О. І.** (2017). Патент України 113471 «Спосіб детекції аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах». Державне патентне відомство України. (*Особистий внесок здобувача: проведення систематизації даних літератури, аналіз дослідження, участь в обговоренні результатів, написання патенту*).
4. Pivovarenko V. G., **Bugera O.**, Humbert N., Klymchenko A. S., Mély Y.. A Toolbox of Chromones and Quinolones for Measuring a Wide Range of ATP Concentrations. *Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 11927. (*Особистий внесок здобувача: проведення систематизації даних літератури, аналіз дослідження, участь в обговоренні результатів та написанні статті*).
5. **Бугера О. І.**, Нетребчук А. П., Пивоваренко В. Г. Дизайн та синтез молекулярного пінцету для детекції АТФ на основі 3-гідроксифлавону. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Хімія.* **2017**, 2, №54, 67. (*Особистий внесок здобувача: проведення систематизації даних літератури, синтез молекулярного пінцету, участь в обговоренні результатів, написання статті*).

6. Бугера О. І., Ющенко Д. А., Пивоваренко В. Г. Флуориметрія агрегатів 4'-диметиламінофлавонолу з аденозин-5'-трифосфатом при зміні іонної сили, рН розчину та концентрації органічного буфера. *Укр. Хім. Журн.* **2018**, 84, № 4, 94. (*Особистий внесок здобувача: проведення систематизації даних літератури, аналіз дослідження, участь в обговоренні результатів та написанні статті*).
7. Бугера О. І., Линник Р. П., Запорожець О. А., Пивоваренко В. Г. Strong anti-Vavilov effect in the fluorescence excitation spectra of flavonol-adenosine 5'-triphosphate complexes. *Київська конференція з аналітичної хімії: Сучасні тенденції*. Київ, **2017**, 139.
8. Бугера О. І., Пивоваренко В. Г. Електрофлуорохромія катіонних та цвіттеріонних флавонолів при агрегації з аденозин-5'-трифосфатом у водному буфері. *Сучасні проблеми хімії: 18-та Міжнародна конференція студентів та аспірантів*. Київ, **2017**, 86.
9. Кримченко Р. Є., Бугера О. І., Линник Р. П., Запорожець О. А., Пивоваренко В. Г. Молекулярний пінцет для флуоресцентної детекції АТФ у розчинах на основі флавонолу. *Об'єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень: 4-та Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених*. Київ, **2017**, 121-123.
10. Нетребчук А.П., Бугера О. І., Пивоваренко В. Г. Молекулярні пінцети для детекції АТФ на основі 3-гідроксифлавонів. *Об'єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень: 4-та Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених*. Київ, **2017**, 133-136.
11. Кримченко Р. Є., Бугера О. І., Пивоваренко В. Г. Синтез молекулярного пінцету на основі 4'-[(гідроксикарбонілметил)метиламін]флавонолу для детекції аденозинтрифосфату. *Сучасні проблеми хімії: 18-та Міжнародна конференція студентів та аспірантів*. Київ, **2017**, 96.

12. Федик А. В., Бугера О. І., Рябухін С. В., Пивоваренко В. Г. Дизайн і синтез молекулярного пінцету на основі 4'- дигідроксиетиламінофлавонолу для детекції аденозинтрифосфату. *Сучасні проблеми хімії: 17-та Міжнародна конференція студентів та аспірантів*. Київ, **2016**, 62.
13. Бугера О. І., Пивоваренко В.Г. Модифіковані в позиції 4' амінофлавоноли – флуоресцентні сенсори АТФ. *Сучасні проблеми хімії: 17-та Міжнародна конференція студентів та аспірантів*. Київ, **2016**, 45.
14. Бугера О. І., Пивоваренко В.Г. Нові флуоресцентні сенсори АТФ на основі модифікованих за позицією 4' флавонолів. *24-та Українська конференція з органічної хімії*. Полтава, **2016**, 71.
15. Бугера О. І., Пивоваренко В.Г. Вплив структури хромонових та хінолонових похідних на їх параметри флуоресценції при зв'язуванні аденозинтрифосфату. *Сучасні проблеми хімії: 16-та Міжнародна конференція студентів та аспірантів*. Київ, **2015**, 35.
16. Pivovarenko V. G., Bugera O., Klymchenko A. S., Mély Y. Fluorescence Ratiometric response of Chromone and Quinolone Derivatives upon Binding with Adenosine-5'-Triphosphate. *The 14th Conference on Methods and Applications in Fluorescence*. Würzburg, Germany, **2015**, 113.
17. Bugera O., Pivovarenko V. G., Klymchenko A. S., Mély Y. Structure-fluorescence relationship in a series of chromone and quinolone derivatives upon their binding with adenosine-5'-trophosphate. *8th International Chem. Conf. Toulouse-Kiev*. Toulouse, France, **2015**, 119.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ, ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І ТЕРМІНІВ	19
ВСТУП	21
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	32
1.1. Хемосенсиори з четвeртинними імідазолієвими або амонійними групами як центри зв'язування	34
1.2. Хемосенсиори на основі взаємодії водневих зв'язків: азокраун, амідні та похідні сечовини	41
1.3. Хемосенсиори на основі комплексів цинку як центрів зв'язування	45
1.4. Люмінесцентні хемосенсиори на основі лантаноїдів і використання інших металічних комплексів у рецепторі АТФ	52
1.5. Хемосенсиори на основі зшитих з полімерів або мезопористих матеріалів	55
1.6. Хемосенсиори на основі олігонуклеотидів	62
1.7. Флуоресцентні наноматеріали	63
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ДО РОЗДІЛУ 1	66
РОЗДІЛ 2. СКРИНІНГ ХРОМОНІВ ТА ХІНОЛОНІВ ДЛЯ ВИМІРЮВАННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТУ	76
2.1. Спектри поглинання	77
2.2. Спектри збудження та флуоресценції сполук	80
2.3. Робочі діапазони концентрації АТФ зондів	85
2.4. Чутливість барвників до АТФ за амплітудою відповіді	88
2.5. Зв'язок структура-відповідь	90
2.6. Висновки	93
2.7. Експериментальна частина	94
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ДО РОЗДІЛУ 2	97
РОЗДІЛ 3. ДИЗАЙН ТА СИНТЕЗ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ ЗОНДІВ НА ОСНОВІ 3-ГИДРОКСИФЛАВОНУ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АДЕНОЗИН-5'-ТРИФОСФАТУ	101
3.1. Синтез катіонних та цвіттер-іонних флуоресцентних сенсорів для	102

визначення АТФ	
3.2. Модифіковані в положенні 4' амінофлавоноли	105
3.3. Дизайн та синтез молекулярних пінцетів	110
3.3.1. Синтез молекулярних пінцетів з довгим лінкером	110
3.3.2. Синтез молекулярних пінцетів з коротким лінкером	120
3.4. Експериментальна частина	124
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ДО РОЗДІЛУ 3	141
РОЗДІЛ 4. ЕЛЕКТРОФЛУОРОХРОМНИЙ ВПЛИВ АНІОНА АТФ НА ФЛУОРЕСЦЕНЦІЮ КАТІОННИХ ТА ЦВІТТЕР-ІОННИХ ФЛАВОНОЛІЕ	144
4.1. Спектри поглинання	145
4.2. Спектри флуоресценції	146
4.3. Висновки	152
4.4. Експериментальна частина	153
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ДО РОЗДІЛУ 4	156
РОЗДІЛ 5. ПІДВИЩЕННЯ АФІНІТЕТУ ТА ЗМІНА СЕЛЕКТИВНОСТІ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ СЕНСОРІВ АТФ ШЛЯХОМ ХІМІЧНОЇ МОДИФІКАЦІЇ ЇХ БУДОВИ	157
5.1. Дослідження агрегації сполук у водних розчинах	158
5.2. Вивчення взаємодії флавонолів 13-16, 20, 21 з АТФ	160
5.2.1. Спектри поглинання	160
5.2.2. Спектри флуоресценції	163
5.2.3. Спектри збудження флуоресценції	166
5.2.4. Порівняння спектрів збудження флуоресценції зі спектрами поглинання	170
5.2.5. Розрахунок ефективних констант дисоціації	172
5.3. Дослідження взаємодії похідних 3-гідроксифлавонолу з ГТФ, АДФ і АМФ	174
5.3.1. Дослідження взаємодії з ГТФ	174
5.3.2. Дослідження взаємодії синтезованих сполук з АДФ	179
5.3.3. Дослідження взаємодії з АМФ	185
5.4. Вимірювання анізотропії флуоресценції комплексу сполук з АТФ	188
5.5. Селективність взаємодії досліджуваних сполук з АТФ, АДФ, АМФ та ГТФ	190
5.6. Висновки	191

5.7. Експериментальна частина	193
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ДО РОЗДІЛУ 5	195
РОЗДІЛ 6. МОЛЕКУЛЯРНИЙ ПІНЦЕТ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ АТФ У РОЗЧИНАХ НА ОСНОВІ ФЛАВОНОЛУ	196
6.1. Спектри поглинання	198
6.2. Спектри флуоресценції	199
6.3. Висновки	203
6.4. Експериментальна частина	203
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ДО РОЗДІЛУ 6	205
РОЗДІЛ 7. ФЛУОРИМЕТРІЯ КОМПЛЕКСІВ ФЛАВОНОЛІВ З АДЕНОЗИН-5'-ТРИФОСФАТОМ ПРИ ЗМІНІ ІОННОЇ СИЛИ, рН РОЗЧИНУ ТА КОНЦЕНТРАЦІЇ ОРГАНІЧНОГО БУФЕРА	206
7.1. Флуориметрія комплексів 4'-диметиламінофлавонолу з аденозин-5'- трифосфатом	206
7.2. Утворення комплексів метоксифлавонолів з АТФ	211
7.3. Висновки	219
7.4. Експериментальна частина	220
7.4.1. Дослідження впливу концентрації буфера ТРИС на флуоресценцію флавонолу 1 та його комплексів з АТФ	220
7.4.2. Дослідження впливу концентрації NaCl на флуоресценцію флавонол 1 та його комплексів з АТФ	221
7.4.3. Дослідження впливу рівня рН розчину на флуоресценцію флавонолу 1 та його комплексів з АТФ	221
7.4.4. Взаємодія сполук 1 – 5 з АТФ	221
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ДО РОЗДІЛУ 7	222
ВИСНОВКИ	224
ДОДАТОК	226

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ, ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І ТЕРМІНІВ

АДФ – аденозин-5' -дифосфат

АМФ – аденозин-5' -монофосфат

АТФ – аденозин-5' -трифосфат

ВЕРХ – вискоєфективна рідинна хроматографія

ГТФ – гуанозин-5' -трифосфат

ДМФА – диметилформаїд

ДПА – дипіколілаїн

ІЧ – інфрачервона спектроскопія

ЛДА – лінійний дискримінантний аналіз

МБ – молекулярний бакен

НТФ – нуклеозид трифосфат

НФ – нуклеозид фосфат

ТШХ – тонкошарова хроматографія

ХІ – хімічна іонізація

ЯМР – ядерний магнітний резонанс

АСQ – гасіння викликане агрегацією

СDІ – карбонілдіїмідазол

DMAA – диметилацетамід

FRET – резонансне перенесення енергії збудження (Förster Resonance Energy Transfer)

HOBT – гідроксибензотриазол

HBTU – O-(1H-бензотриазол-1-іл)-1,1,3,3-тетраетилуроній гексафторофосфат

in vitro – «у склі» — це техніка виконання експерименту чи інших маніпуляцій у пробірці

in vivo – у живому (чи на живому)

Mr – молекулярна маса

TMS – тетраметилсилан

ВСТУП

Актуальність теми. Аденозин 5'-трифосфат (АТФ) є критично важливою та багатофункціональною складовою усіх організмів. У клітині він продукується кількома шляхами, головним з яких є окисне фосфорилування в мітохондріях еукаріот. Це не тільки основна енергетична валюта у більшості клітинних процесів, наприклад, у діленні клітин, скороченні м'язів, мембранному транспорті та біосинтетичних реакціях [1, 2]. Він є також учасником сигнальних процесів, зокрема - фосфорилування білків [3] та утворення циклічного аденозин монофосфату (цАМФ) [4]. З іншого боку, зменшення концентрації АТФ викликає аномальні реакції [5] та має відношення до патогенезу у багатьох захворюваннях, таких як гіпоглікемія, ішемія та хвороба Паркінсона [6]. Рівень концентрації внутрішньоклітинного АТФ зазвичай перебуває в діапазоні від 1 до 10 мМ (частіше 2-3 мМ), але він може помітно коливатись у різних типах клітин та субклітинних областей [7]. Зміна концентрації АТФ грає вирішальну роль у багатьох фізіологічних процесах [8]. Наприклад, вивільнення внутрішньоклітинного АТФ може впливати на поглинання кальцію [9] та сигналізацію [10, 11], регулювати протеасомну функцію [12], модулювати канали іонів калію [13], знижувати рухливість лімфоцитів [14] та опосередковувати швидку мікрогліальну реакцію [15]. Крім того, співвідношення АТФ:АДФ вказує на життєздатність клітин, апоптоз та некроз [16], тоді як співвідношення АТФ:АМФ регулює активність ферментів у гомеостазі АТФ [17]. Беручи до уваги ключову роль АТФ у більшості клітинних процесів, необхідно мати можливість контролювати динаміку та просторовий розподіл АТФ *in vivo*, аби уможливити вивчення складних механізмів за участю АТФ.

Значне число методів було розроблено для визначення усередненого рівня АТФ клітинних лізатів. Найпоширеніший метод аналізу базується на АТФ - залежній люциферин - люциферазній реакції [18], у якому концентрація АТФ

визначається за інтенсивністю жовто-зеленої люмінесценції, що генерується при окисному декарбоксілюванні люциферину. Інші класичні автономні методи аналізу АТФ включають високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) [19], капілярний електрофорез (КЕ) [20] та спектроскопію ядерного магнітного резонансу (ЯМР) [21]. Останнім часом повідомлялося про різноманітні підходи для детекції АТФ, такі як колориметричні зонди [22-24], електрохімічні [25-27] та хемілюмінесцентні сенсори [28-30]. Однак ці методи мають серйозні обмеження при вимірюванні концентрацій АТФ *in vitro*. Мало які з них можуть бути застосовані для візуалізації та моніторингу розподілу і динаміки АТФ у організмах через низьку чутливість, цитотоксичність або погану сумісність з живими клітинами. Не зважаючи на те, що люцифераза може бути експресована в клітинах [31] або кон'югована до домену трансдукції білка для клітинного захвату [32], біолюмінесцентний аналіз страждає від недоліків, таких як мала інтенсивність та тривалість люмінесценції, недостатня просторово-часова роздільна здатність та необхідність використання високочутливої охолоджуваної апаратури для підрахунку фотонів. На противагу цьому, молекулярні флуоресцентні зонди мають переваги при візуалізації динаміки АТФ *in vivo* завдяки швидкій відповіді, високій чутливості, стабільності сигналу, тривалому часу роботи і зручності маніпулювання, хоча аутофлуоресценція живих організмів - це питання, яке тут необхідно вирішувати, щоб уникнути можливих перешкод при отриманні корисного флуоресцентного сигналу у видимому спектральному діапазоні.

У цьому аспекті 3-гідроксихромони, як нещодавно відкритий клас флуоресцентних зондів для детекції АТФ, мають значні переваги внаслідок простоти будови молекули, синтетичної доступності та можливості генерації ратіометричного флуоресцентного сигналу, який значно покращує кількісне визначення аналіту.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась на кафедрі органічної хімії хімічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка згідно з держбюджетними темами №11БФ037-02 «Нові гетероциклічні сполуки – ефективні джерела біологічно-активних речовин, флуоресцентних зондів, модифікаторів супрамолекулярних об'єктів» (2011 – 2015 рр.) № держреєстрації 0111U006259, №16БФ037-02 «Дизайн, синтез та дослідження нових гетероциклічних сполук для створення перспективних лікарських засобів з широким спектром дії» (2016 – 2018 рр.) № держреєстрації 0116U002559.

Мета і задачі дослідження. Метою даної роботи є дизайн, синтез моно- та дихромофорних флуоресцентних зондів для детекції АТФ на основі 3-гідроксифлавонів та вивчення взаємозв'язку структура – ефективність у визначенні АТФ методами флуоресцентної спектроскопії. Встановлення афінитету, селективності та меж детекції АТФ для синтезованих сполук.

Завдання дослідження:

1. Встановити взаємозв'язок структура – ефективність у визначенні АТФ для серії синтезованих раніше флуоресцентних барвників класів 3-гідроксифлавонів, бісфлавонолів та 3-гідроксихінолонів. Синтезувати катіонні та цвіттер-іонні похідні 3-гідроксифлавонолу з метою збільшення афінитету зондів до АТФ. Дослідити їх флуоресцентні властивості при зв'язуванні з АТФ.
2. Синтезувати похідні 4'-амінофлавонолу зі збільшеною кількістю груп-донорів водневого зв'язку, а також збільшеним розміром планарної частини з метою варіації афінитету та селективності до АТФ. Дослідити їх флуоресцентні властивості при зв'язуванні з АТФ та іншими нуклеозидфосфатами.
3. Синтезувати флуоресцентні молекулярні пінцети та дослідити їх афінитет і селективність у відношенні до АТФ, а також межі детекції АТФ.

4. Вивчити вплив рН, іонної сили розчину та концентрації буферу на флуоресценцію комплексів флавонол – АТФ.

Об'єкт дослідження: заміщені 3-гідроксихромони, бісфлавоноли, 5,6-бензофлавоноли, 3-гідроксихінолони, молекулярні пінцети на основі флавонолів та аденозин-5'-трифосфат, аденозин-5'-дифосфат, аденозин-5'-монофосфат, гуанозин-5'-трифосфат.

Предмет дослідження: синтез та будова нових похідних 3-гідроксифлавонів, їх флуоресцентні властивості у водних розчинах, у тому числі при утворенні комплексів з нуклеозидфосфатами. Стехіометрія та константи стійкості цих комплексів, межі детекції аденозин-5'-трифосфату синтезованими зондами.

Методи дослідження: органічний синтез, тонкошарова хроматографія, високоефективна рідинна хроматографія, спектроскопія ЯМР ^1H та ^{13}C , хроматомас спектрометрія, флуоресцентна спектроскопія та спектрофотометрія ІЧ та УФ діапазонів.

Наукова новизна одержаних результатів. Досліджено серію із тридцяти трьох синтезованих раніше флавонолів, біс-флавонолів, 3-гідроксихромонів та 3-гідроксихінолонів у аспекті можливості їх застосування як флуоресцентних зондів для визначення концентрації АТФ у водних розчинах. Встановлено, що 30 із досліджених барвників можуть служити зондами АТФ. Оскільки комплексоутворення відбувається при нейтральних значеннях рН у межах фізіологічних концентрацій АТФ та Mg^{2+} , більшість досліджених барвників можуть бути використані як флуоресцентні зонди для вимірювання концентрації АТФ у водних розчинах, у тому числі - в клітинному середовищі. Вперше синтезовано ряд молекулярних флуоресцентних зондів для детекції АТФ, що містять один та два хромофори. Окремі монохромофорні сполуки мають аніонну, катіонну та цвіттеріонну природу, а також містять інші замісники, що змінюють орієнтацію та афінітет компонентів у комплексі, а також селективність до АТФ та інших нуклеотидів. Біхромофорні сполуки –

«молекулярні пінцети» для флуоресцентної детекції АТФ, містять довгі (активні та пасивні) і короткі лінкери.

Досліджено афінитет та селективність синтезованих флуоресцентних зондів до АТФ, ГТФ, АДФ та АМФ у водних розчинах. Виявлено сполуки, що демонструють селективність до АТФ та до ГТФ.

Показано, що синтезований молекулярний пінцет з довгим лінкером у водних розчинах існує у «закритій» конформації як наслідок стекінгу його планарних гідрофобних частин. У цій же «закритій» конформації він існує у комплексі з АТФ – як мінімум, у випадку 20% його популяції. Наявність окремої смуги збудження другого, віддаленого від АТФ хромофору створює зручні умови для ратіометричного визначення концентрації комплексу пінцет – АТФ. Указані можливості разом із більш широкими межами детекції АТФ є суттєвими перевагами молекулярного пінцету у порівнянні з простими монохромофорними конструкціями флуоресцентних зондів.

Встановлено, що корисний сигнал зв'язування зонду 4'-диметиламіно-флавонолу з АТФ – довгохвильова компонента спектру збудження, зберігається у широких інтервалах рН (від 5.7 до 9) концентрацій органічного буферу ТРИС (0-440 мМ), сахарози (0-250 мМ) і натрій хлориду (0-180 мМ). Такі дані свідчать про можливість флуориметричного визначення концентрації АТФ у широких межах рН, у присутності високих концентрацій органічних сполук у розчині та при високій іонній силі розчину. Фізіологічні концентрації катіонів Mg^{2+} (до 5 мМ) не заважають визначенню АТФ.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено, синтезовано та досліджено нові флуоресцентні зонди на основі 3-гідроксифлавонолу для селективної детекції АТФ у водних розчинах, в діапазоні його концентрацій 0,001-55 мМ.

Особистий внесок здобувача. Вивчення та систематизація літературних даних, основна частина експериментальної роботи, обробка і аналіз одержаних

результатів, формулювання висновків дисертації зроблені особисто здобувачем. Презентації результатів роботи на наукових конференціях різних рівнів здійснювалися здобувачем особисто. Постановка завдання і обговорення результатів дослідження здійснено спільно з науковим керівником, проф. В. Г. Пивоваренком. Синтез N-[2-(диметиламіно)етил]-2-[4-(3-гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-іл)фенокси]ацетаміду, (2-{2-[4-(3-гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-іл)-фенокси]-ацетиламіно}-етил)-триметиламоній йодиду, (2-{2-[4-(3-гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-іл)-фенокси]-ацетиламіно}-етил)-диметил-(3-сульфо-пропіл)-амонію проведено студентом Б. Л. Андреюком, синтез 2-{[4-(3-гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-іл)феніл](метил)аміно}-N-{2-[4-(3-гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-іл)феніл]-4-оксо-8,11-діокса-2,5-дiazатридекан-13-іл}ацетаміду виконано разом зі студентом Р. Е. Кримченком, синтез 1,4-біс[2-(4-(3-гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-іл))фенокси-ацетиламідо]бутану, 1,4-біс-[2-(4-(диметиламіно)феніл)-3-гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-6-ілокси]ацетиламідо]бутану, 6,6'-метиленбіс(2-(4-(диметиламіно)феніл)-3-гідрокси-4Н-хромен-4-ону) та 6,6'-метиленбіс(2-(4-(біс(2-гідроксиетил)аміно)феніл)-3-гідрокси-4Н-хромен-4-ону) виконано разом з студенткою А. П. Нетребчук. Флуоресцентні дослідження синтезованих сполук проведено у співробітництві з проф. Івом Мелі та хаб. др. А. С. Климченком (Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR 7213, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, CNRS), проф. д.х.н. О. А. Запорожець та к.х.н. Р. П. Лінником.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертаційної роботи були представлені на міжнародній конференції студентів та аспірантів «Сучасні проблеми хімії» (Київ, у 2015, 2016 та 2017 роках), Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Об'єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень» (Київ, у 2016 та 2017 роках), XXIV Українській конференції з органічної хімії (Полтава, 2016), Київській конференції з аналітичної хімії «Сучасні тенденції» (Київ, 2017), The 14th Conference on Methods and Applications in Fluorescence (Würzburg, Germany, 2015), 8th International Chem. Conf. Toulouse-Kiev (Toulouse, 2015).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 4 статті, 2 патенти і тези 11 доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Робота складається із переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, оригінального матеріалу, поданого в сімох розділах, та висновків. Роботу викладено на 198 сторінках друкованого тексту, який містить 109 рисунків, 6 таблиць та бібліографію зі 181 джерел.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ДО ВСТУПУ

1. Knowles J. R. Enzyme-Catalyzed Phosphoryl Transfer Reactions. *Ann. Rev. Biochemistry*. **1980**, 49, 877–919.
2. Higgins C. F., Hiles I. D., Salmond G. P. C., Gill D. R., Downie J. A., Evans I. J., Holland I. B., Gray L., Buckel S. D., Bell A. W., Hermodson M. A. A Family of Related ATP-Binding Subunits Coupled to Many Distinct Biological Processes in Bacteria. *Nature*. **1986**, 323, 448–450.
3. Liu X., Li Y., Xu X., Li P., Nie Z., Huang Y., Yao S. Nanomaterial-Based Tools for Protein Kinase Bioanalysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. **2014**, 58, 40–53.
4. Kamenetsky M., Middelhaufe S., Bank E. M., Levin L. R., Buck J., Steegborn C. Molecular Details of cAMP Generation in Mammalian Cells: A Tale of Two Systems. *Journal of Molecular Biology*. **2006**, 362, 4, 623–639.
5. Wang Y. M., Pu P., Le W. D. ATP Depletion Is the Major Cause of MPP⁺ induced Dopamine Neuronal Death and Worm Lethality in α -Synuclein Transgenic C. Elegans. *Neuroscience Bulletin*. **2007**, 23, 6, 329–335.
6. Bush K. T., Keller S. H., Nigam S. K. Genesis and Reversal of the Ischemic Phenotype in Epithelial Cells. *Journal of Clinical Investigation*. **2000**, 106, 5, 621–626.
7. Traut T. W. Physiological Concentrations of Purines and Pyrimidines. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **1994**, 140, 1, 1–22.
8. Ghosh A., Ronner P., Cheong E., Khalid P., Matschinsky F. M. The Role of ATP and Free ADP in Metabolic Coupling during Fuel-Stimulated Insulin Release from Islet β -Cells in the Isolated Perfused Rat Pancreas. *Journal of Biological Chemistry*. **1991**, 266, 34, 22887–92.
9. Nicotera P., McConkey D. J., Jones D. P., Orrenius S. ATP Stimulates Ca²⁺ Uptake and Increases the Free Ca²⁺ Concentration in Isolated Rat Liver Nuclei. *Biochemistry*. **1989**, 86, 453–57.

10. Cotrina M. L., Lin J. H.-C., Alves-Rodrigues A., Liu S., Li J., Azmi-Ghadimi H., Kang J., Naus C. C. G., Nedergaard M. Connexins Regulate Calcium Signaling by Controlling ATP Release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1998**, 95, 26, 15735–40.
11. Elfervig M. K., Graff R. D., Lee G. M., Kelley S. S., Sood A., Banes A. J. ATP Induces Ca²⁺ signaling in Human Chondrons Cultured in Three-Dimensional Agarose Films. *Osteoarthritis and Cartilage*. **2001**, 9, 6, 518–26.
12. Huang H., Zhang X., Li S., Liu N., Lian W., McDowell E., Zhou P., Zhao C., Guo H., Zhang C., Yang C., Wen G., Dong X., Lu L., Ma N., Dong W., Dou Q. P., Wang X., Liu J. Physiological Levels of ATP Negatively Regulate Proteasome Function. *Cell Research*. **2010**, 20, 1372–1385.
13. Cook D. L., Hales C. N. Intracellular ATP Directly Blocks K⁺ Channels in Pancreatic B-Cells. *Nature*. **1984**, 311, 5983, 271–73.
14. Wang C. M., Ploia C., Anselmi F., Sarukhan A., Viola A., Adenosine Triphosphate Acts as a Paracrine Signaling Molecule to Reduce the Motility of T Cells. *The EMBO Journal*. **2014**, 33, 12, 1354–64.
15. Davalos D., Grutzendler J., Yang G., Kim J. V., Zuo Y., Jung S., Littman D. R., Dustin M. L., Gan W.-B. ATP Mediates Rapid Microglial Response to Local Brain Injury in Vivo. *Nature Neuroscience*. **2005**, 8, 6, 752–758.
16. Bradbury D. A., Simmons T. D., Slater K. J., Crouch S.P.M. Measurement of the ADP:ATP Ratio in Human Leukaemic Cell Lines Can Be Used as an Indicator of Cell Viability, Necrosis and Apoptosis. *Journal of Immunological Methods*. **2000**, 240, 1–2, 79–92.
17. Liemburg-Apers D. C., Imamura H., Forkink M., Nooteboom M., Swarts H. G., Brock R., Smeitink J. A. M., Willems P. H. G. M., Koopman W. J. H. Quantitative Glucose and ATP Sensing in Mammalian Cells. *Pharmaceutical Research*. **2011**, 28, 11, 2745–57.
18. Wood K. V., Lam Y. A., . McElroy W. D. Introduction to Beetle Luciferases and Their Applications. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*. **1989**, 4, 1, 289–301.

19. Fu C., Song L., Fang Y. Determination of Adenosine Phosphate by Co-Electroosmotic Capillary Electrophoresis with Amperometric Detection. *Analytica Chimica Acta*. **1999**, 399, 3, 259–263.
20. Özogul F., Taylor K. D. A., Quantick P. C., Özogul Y. A Rapid HPLC-Determination of ATP-Related Compounds and Its Application to Herring Stored under Modified Atmosphere. *International Journal of Food Science & Technology*. **2000**, 35, 6, 549–554.
21. Middleton D. A., Hughes E., Esmann M. The Conformation of ATP within the Na,K-ATPase Nucleotide Site: A Statistically Constrained Analysis of REDOR Solid-State NMR Data. *Angewandte Chemie - International Edition*. **2011**, 50, 31, 7041–44.
22. Sancenón F., Descalzo A. B., Martínez-Máñez R., Miranda M. A., Soto J. A Colorimetric ATP Sensor Based on 1,3,5-Triarylpen-2-En-1,5-Diones. *Angewandte Chemie - International Edition*. **2001**, 40, 14, 2640–43.
23. Li C., Numata M., Takeuchi M., Shinkai S. A Sensitive Colorimetric and Fluorescent Probe Based on a Polythiophene Derivative for the Detection of ATP. *Angewandte Chemie - International Edition*. **2005**, 44, 39, 6371–74.
24. Cheng D., Li Y., Wang J., Sun Y., Jin L., Li C., Lu Y. Sensitive Fluorescent and Colorimetric Detection of ATP Based on a Strategy of Self-Promoting Aggregation of a Water-Soluble Polythiophene Derivative. *Chemical Communications*. **2015**, 51, 8544–46.
25. Zuo X., Song S., Zhang J., Pan D., Wang L., Fan C. A Target-Responsive Electrochemical Aptamer Switch (TREAS) for Reagentless Detection of Nanomolar ATP. *Journal of the American Chemical Society*. **2007**, 129, 5, 1042–43.
26. Guo Y., Sun X., Yang G., Liu J. Ultrasensitive Detection of ATP Based on ATP Regeneration Amplification and Its Application in Cell Homogenate and Human Serum. *Chemical Communications*. **2014**, 50, 57, 7659–62.
27. Lu L., Si J. C., Gao Z. F., Zhang Y., Lei J. L., Luo H. Q., Li N. B. Highly Selective and Sensitive Electrochemical Biosensor for ATP Based on the Dual

Strategy Integrating the Cofactor-Dependent Enzymatic Ligation Reaction with Self-Cleaving DNAzyme-Amplified Electrochemical Detection. *Biosensors and Bioelectronics*. **2015**, 63, 14–20.

28. Freeman R., Liu X., Willner I. Chemiluminescent and Chemiluminescence Resonance Energy Transfer (CRET) Detection of DNA, Metal Ions, and Aptamer-Substrate Complexes Using hemin/G-Quadruplexes and CdSe/ZnS Quantum Dots. *Journal of the American Chemical Society*. **2011**, 133, 30, 11597–604.
29. Song Y., Yang X., Li Z., Zhao Y., Fan A. Label-Free Chemiluminescent ATP Aptasensor Based on Graphene Oxide and an Instantaneous Derivatization of Guanine Bases. *Biosensors and Bioelectronics*. **2014**, 51, 232–37.
30. Jin S.-Q., Guo S.-M., Zuo P., Ye B.-C. A Cost-Effective Z-Folding Controlled Liquid Handling Microfluidic Paper Analysis Device for Pathogen Detection via ATP Quantification. *Biosensors and Bioelectronics*. **2015**, 63, 379–83.
31. Lasko D. R., Wang D. I. C. On-Line Monitoring of Intracellular ATP Concentration in Escherichia Coli Fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*. **1996**, 52, 3, 364–372.
32. Lee M.-S., Park W.-S., Kim Y. H., Ahn W. G., Kwon S.-H., Her S. Intracellular ATP Assay of Live Cells Using PTD-Conjugated Luciferase. *Sensors*. **2012**, 12, 11, 15628–37.

РОЗДІЛ 1
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ
КОЛОРИМЕТРИЧНІ ТА ФЛЮОРЕСЦЕНТНІ МЕТОДИ ДЕТЕКЦІЇ
АТФ

У даному огляді зосереджено увагу на флуоресцентних зондах для детекції АТФ, які були розроблені після 2000-го року, коли кількість публікацій у даному напрямку значно зросла.

Вступ

АТФ є не тільки універсальним джерелом енергії у біосистемах, але й внутрішньоклітинним сигнальним медіатором численних біологічних процесів [33] та солубілізатором білкових молекул [34]. АТФ є найбільш розповсюдженим нуклеозидтрифосфатом (НТФ) у живих клітинах, де його середня концентрація становить 3.15 мМ [7], що на порядок вище, ніж інших НТФ, а максимальна досягає рівня 15 мМ. Тому зміни флуоресценції багатьох сучасних зондів, для яких не характерна висока селективність, в основному залежать від АТФ, що дозволяє контролювати динаміку зміни концентрації АТФ. Враховуючи середній рівень концентрації у клітинах аналогів АТФ, таких як аденозин 5'-дифосфат (АДФ) (~ 0,849 мМ), аденозин 5'-монофосфат (АМФ) (~ 0,209 мМ), гуанозин 5'-трифосфат (ГТФ) (~ 0,468 мМ), уридин 5'-трифосфат (УТФ) (~ 0,567 мМ) та цитидин 5'-трифосфат (ЦТФ) (~ 0,278 мМ) [7], за низьких локальних концентрацій АТФ вони також будуть генерувати флуоресцентну відповідь. У зв'язку з цим постає проблема селективності зонда для визначення абсолютної концентрації АТФ, зокрема у присутності АДФ. Інші аспекти, які слід враховувати, включають високу гідрофільність молекули, біосумісність (низька цитотоксичність), хемо- та біостабільність, високу яскравість (квантовий вихід флуоресценції та молярний коефіцієнт екстинкції), високу

просторово-часову роздільну здатність, широкий динамічний діапазон флуоресцентної відповіді та широкі межі детекції концентрацій АТФ. Крім того, слід зазначити, що хемосенсиори повинні мати гарну проникність через клітинну мембрану. Більше того, оскільки рівень АТФ в субклітинних ділянках також грає важливу роль у регулюванні обміну речовин, розробка флуоресцентних сенсорів, які можуть вибірково локалізуватися в певних субклітинних ділянках або органелах, також необхідна для цілеспрямованого моніторингу біологічних подій та глибокого розуміння складних функцій АТФ.

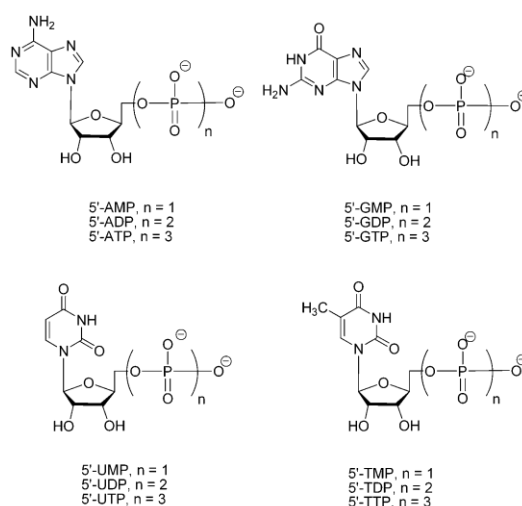


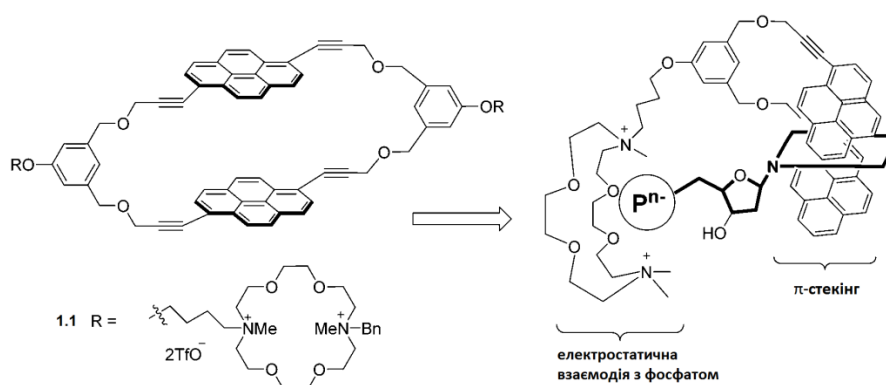
Рис. 1.1. Структури найбільш поширених нуклеотидів.

Розвитку систем молекулярного розпізнавання та визначенню біологічно важливих аніонів останнім часом приділяється значна увага [35-42]. Флуоресцентне розпізнавання та визначення нуклеотидів є особливо важливою областю досліджень завдяки їх біологічній значущості. Серед усіх нуклеотидів детекція АТФ та ГТФ є найважливішою, оскільки вивченню функцій саме цих близьких за будовою чотиризарядних аніонів приділяється багато уваги. Відомі флуоресцентні зонди для визначення нуклеозидтрифосфатів мають складну будову. Цікаво, що серед усіх їх різновидів молекулярні зонди є найпростішими. Проте й вони містять явно виражені складні функціональні частини: рецептор аналіту та репортер

(генератор флуоресцентного сигналу). Враховуючи те, що нуклеотиди мають аніонну природу і здатні до стекінгу та водневого зв'язування, рецепторна частина зонду як правило фігурує у вигляді багатозарядного катіону з вираженою плоскою ароматичною частиною та групами-донорами водневого зв'язку [43].

1.1. Хемосенсори з четвертинними імідазолісвими або амонійними групами як центри зв'язування

Іноуе та його колеги повідомили про піренофанову систему, що має великі нейтральні порожнини та демонструє емісію піренового ексимеру внаслідок зближення його фрагментів (Рис. 1.2) [44]. Зонд **1.1** переважно формує комплекси з нуклеозидтрифосфатами, особливо з ГТФ та АТФ, а не з ди- або монофосфатами. Коли **1.1** титрують з АТФ у воді, в УФ спектрах з'являється гіпсохромно зміщена смуга флуоресценції пірену, а емісія ексимерів гаситься (Рис. 1.2). Такий ефект свідчить про π -стекінг - координацію нуклеотидів між ядрами пірену у піренофані. Константа зв'язування складає $1,0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$.



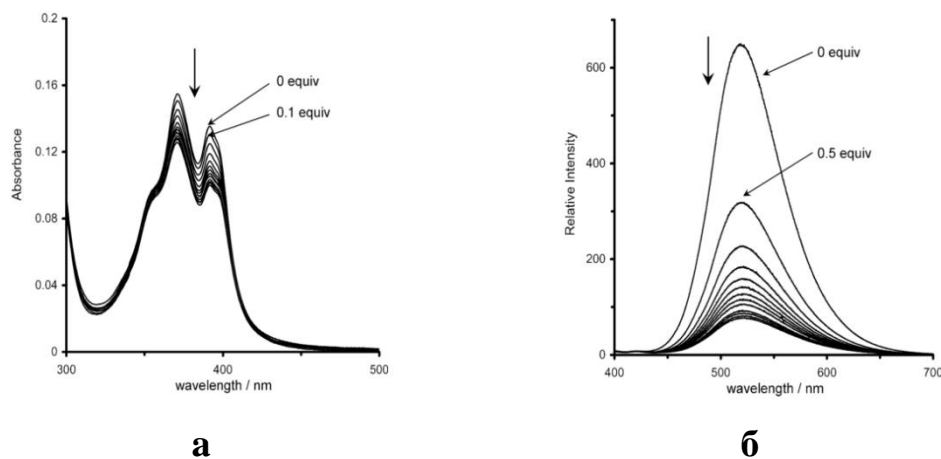


Рис. 1.2. Запропонований механізм багато точкового розпізнавання **1.1** для нуклеотиду. (а) УФ титрування **1.1** (1.0×10^{-5} М) з АТФ (0-1.4 екв.) у воді. (б) Фотометричне титрування **1.1** (1×10^{-5} М) з АТФ (0-6.0 екв.) у воді. Довжина хвилі збудження становила 370 нм.

Вибіркове зв'язування нуклеозидтрифосфатів було пояснено на основі точної відповідності їх молекул розмірам порожнини піренофану, що сприяло утворенню комплексів.

З іншого боку, Юн та ін. [45] синтезували сенсор складної будови у вигляді пінцету **1.2** з фенільним лінкером та рецепторно-сигнальною системою ексимерного типу, що складається з двох ядер пірену. Наявні в молекулі чотири імідазолієві залишки виконували функцію рецепторів аніонної частини аналіту, додатково збільшуючи афінітет до АТФ (Рис. 1.3). При рН 7.4 дослідники спостерігали перемикання флуоресценції ексимеру на флуоресценцію мономеру пірену в присутності АТФ через характерний π - π стекінг сендвічу пірен-аденін-пірен. Цікаво, що ГТФ, ЦТФ, УТФ та ТТФ теж проявили взаємодію зі сполукою **1.2**, проте лише із зовнішньою стороною складеного димеру пірен-пірен з **1.2**. При цьому флуоресценція ексимеру зберігалася. Висока селективність була досягнута через більше співвідношення інтенсивності флуоресценції мономер-ексимеру для **1.2** після зв'язування з АТФ (I_{375}/I_{487}), а константа асоціації з АТФ була розрахована як $1,03 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$.

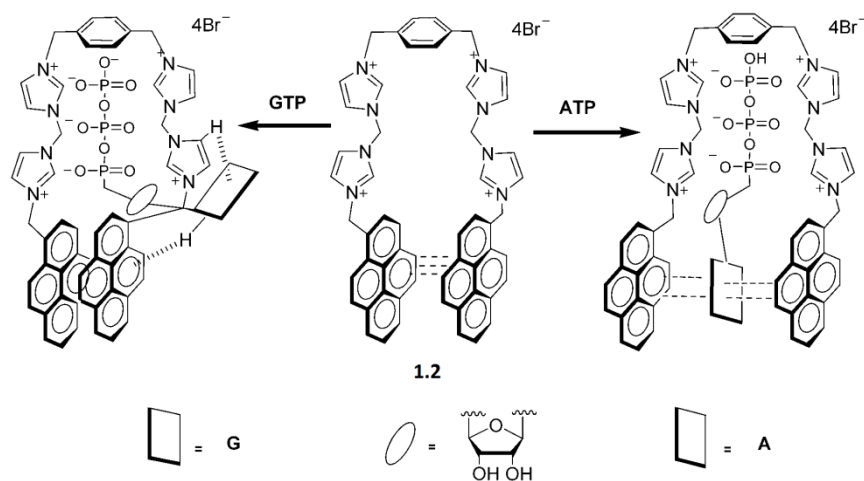


Рис. 1.3. Запропонований спосіб зв'язування **1.2** з АТФ і ГТФ.

Подальші дослідження стосувалися біологічного застосування **1.2** в клітинах (на культурі HeLa), а саме в аналізі АТФ-залежної активності ферменту.

Отже, імідазолієвий елемент у рецепторі нуклеотидів показав свою ефективність. Група Дуана повідомила про аміно-нафталімідімідазолієві поданди з 1,3,5-трис(бромометил)-2,4-диметилбензолом як шість донорів водневого зв'язку, що функціонували як хемосенсиори для селективного визначення нуклеозидполіфосфатів способом «перемикання» флуоресценції [46] (Рис. 1.4). Сполука **1.3** демонструє селективне зростання флуоресценції для АДФ в порівнянні з іншими рибонуклеозидполіфосфатами. Сенсор **1.4** демонструє аналогічні флуоресцентні властивості для АТФ, ГТФ и УТФ (Рис. 1.4). Профіль ділянки Хілла кривої титрування відповідає стехіометрії 1:2 комплексу типу хазяїн – гість з константою асоціації $\log K_a=8,75$. Спостерігалось посилення флуоресценції **1.4** при фарбуванні клітин HeLa при додатковому інкубуванні з АТФ (0,4 мМ).

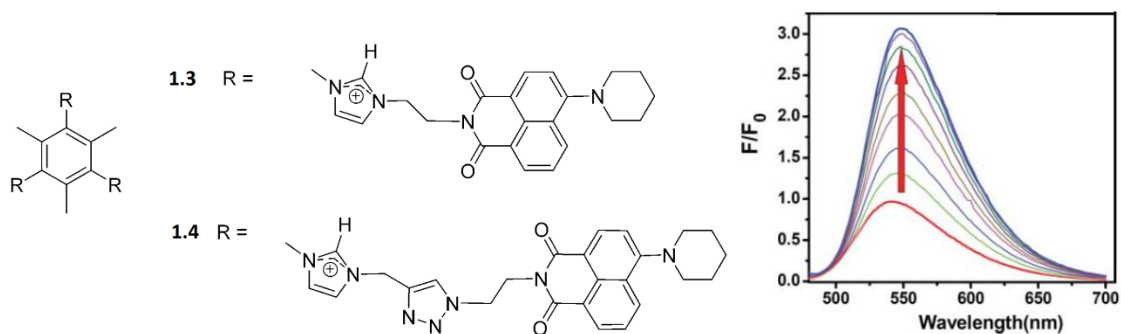


Рис. 1.4. Структури хемосенсорів **1.3** та **1.4**. Флуоресцентна відповідь **1.4** (20 мМ) у розчині ацетонітрилу після додавання АДФ (від 0 до 0,4 мМ).

Турецькі науковці Атілган та Аккая доповіли про калікспіридиній-піраніновий комплекс – іонну полізарядну пару, як селективний аніон-чутливий ансамбль що працює за стратегією заміщення індикатора [47] (Рис. 1.5). Сильна зв'язуюча взаємодія між позитивно зарядженим рецептором (калікспіридиній тетракатіон, **1.5**) і флуоресцентним рН індикатором (піранін, **1.6**) потребує аніонного гостя з високим негативним зарядом для ефективного заміщення рН-індикатора. Таким чином, у водних розчинах досягалася селективна та чутлива детекція АТФ. Досліди були проведені в буфері MOPS (0,1 М, рН 7.5). Додавання АТФ у концентрації до 1.0 мМ приводить до значного заміщення барвника зі збільшенням інтенсивності випромінювання при 520 нм. Вільна енергія дисоціації для АТФ-**1.5** комплексу була розрахована як 6.1 ккал моль⁻¹.

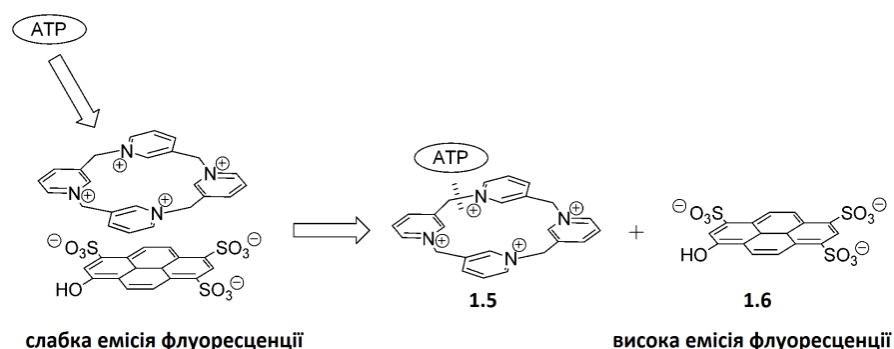


Рис. 1.5. Структури зондів **1.5**, **1.6** і запропонований механізм роботи.

Група Рамайях розробила піридино-антраценову циклофанову систему, яка може виділяти АТФ з поміж інших нуклеозидів, нуклеотидів і

фосфат-аніонів в фізіологічних умовах [48] (Рис. 1.6). Як і розглянутий вище зонд **1.2**, даний циклофан створює комплекс з АТФ через синергічні ефекти електростатичних і π - π стекингових взаємодій у порожнині. Зі збільшенням концентрації АТФ, **1.7** демонстрував зменшення молярного коефіцієнту поглинання антраценової частини внаслідок стекингу. Аналіз зміни поглинання за Бенеші – Гільдебрандом показав стехіометрію 1:1 для комплексу, утвореного між **1.7** і АТФ, з константою зв'язування $4040 \pm 140 \text{ M}^{-1}$ в буферному розчині.

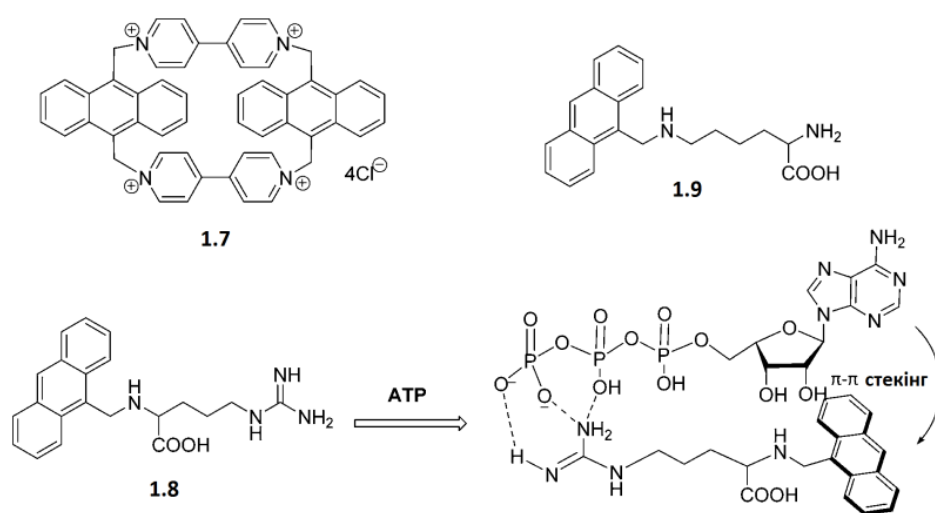


Рис. 1.6. Структури **1.7**, **1.8**, **1.9** і запропоновані водневі зв'язки, електростатичні та π - π стекингові взаємодії між **1.8** і АТФ.

Цзун та ін. повідомили про похідну L-аргініну **1.8**, а також його взаємодію з АТФ у водних розчинах (Рис. 1.6) [49]. Характерною рисою цієї системи є гасіння, індуковане додаванням АТФ при значеннях рН \square 4.0. Зміни аніон-індукованої флуоресценції **1.8** тестували у водних розчинах при рН 3.0. Сполука **1.8** демонструє ефект комплексоутворення з підвищеним гасінням флуоресценції (CHEQ) для АТФ з константою асоціації $K_a = 3,49 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$, а також відносно невеликі ефекти CHEQ для АДФ і АМФ. Для інших аніонів флуоресцентні зміни майже не спостерігаються.

Морено-Коррал і Лара синтезували акридино- і антрахіноновмісні циклофани, на основі (*S*),(*S*)-(+)-тетрандринового залишку і вивчили їх взаємодію з нуклеотидами і амінокислотами (Рис. 1.7) [50]. Використовуючи іонні пари та гідрофобні взаємодії, було знайдено, що обидва циклофани (**1.10** і **1.11**) збільшують афінитет до нуклеотидів зі збільшенням заряду гостя у послідовності АТФ>АДФ>АМФ. Константа асоціації **1.10** зростає в ряду $477 \pm 128 \text{ M}^{-1}$ (АМФ), $850 \pm 241 \text{ M}^{-1}$ (АДФ), $5404 \pm 758 \text{ M}^{-1}$ (АТФ), відповідно. У випадку **1.11** при рН 7.2 додавання АТФ викликало прогресивне зростання інтенсивності флуоресценції. Була підтверджена стехіометрія 1:2, з константою асоціації $K_{1.11} = 7191 \text{ M}^{-1}$ і $K_{1.12} = 165 \text{ M}^{-1}$. Цей ефект був пояснений перекриттям між акридиновим і нуклеотидним гетероциклами. Крім того, негативний вплив солей на ці комплекси також дозволяє припустити, що електростатичні взаємодії (утворення іонних пар) грають важливу роль в комплексі господар-гість.

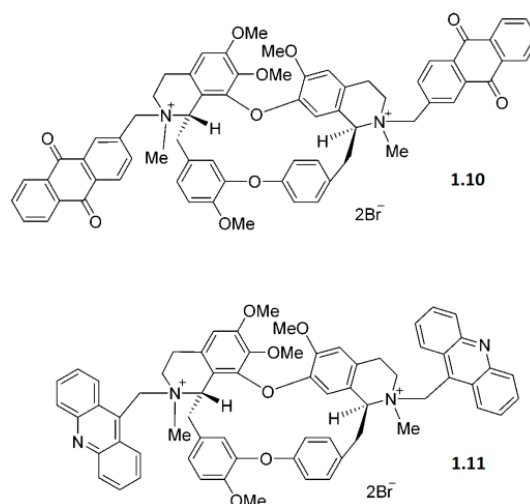


Рис. 1.7. Структури флуоресцентних зондів **1.10** та **1.11**.

Група Краля повідомила про тетрабруцин-порфіринову похідну як фотометричний сенсор, що здатен проявляти з нуклеотидами декілька типів зв'язування, що приводить до збільшення селективності до АТФ відносно АДФ і АМФ у фізіологічних умовах (Рис. 1.8) [51]. Внаслідок помітної агрегації **1.12** у воді, всі вимірювання проводилися в буфері метанол -

водний HEPES (1:1). Додавання нуклеотидів (АМФ, АДФ, АТФ) викликало зниження інтенсивності поглинання **1.12**. Розраховані значення констант стійкості для комплексів 1:1 **1.12** і нуклеотидів: 64000, 6700 і 2400 М⁻¹ для АТФ, АДФ і АМФ відповідно, свідчать про високу селективність даної структури до АТФ.

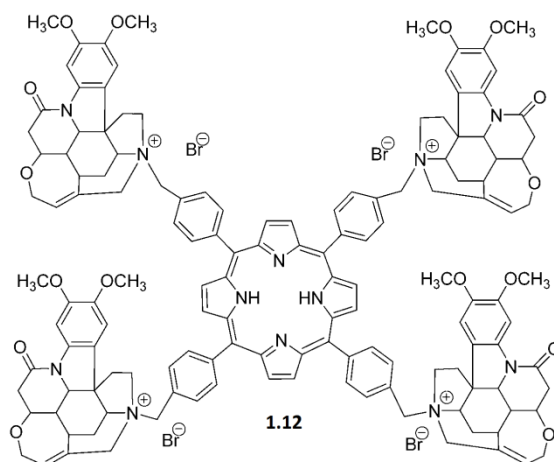


Рис. 1.8. Структура хемосенсора **1.12**.

Чжан з колегами сконструювали ціаніновий барвник ближнього ІЧ діапазону, що має два фрагменти боронової кислоти (Су-ВА) для флуоресцентного зондування АТФ [52]. Оскільки боронати в молекулі барвника зв'язуються з *цис*-діольною частиною АТФ, дана робота є унікальним прикладом ковалентного зв'язування зонду з аналітом. При цьому важливим є введення катіонної поверхнево-активної речовини додецилтриметиламонійброміду (DTAB) у кількості нижче його критичної концентрації міцелоутворення, адже без цього молекули Су-ВА перетворюються на Н-агрегати, які практично не флуоресціюють (Рис. 1.9). При додаванні АТФ відбувається різке збільшення флуоресценції внаслідок утворення везикул АТФ/Су-ВА/DTAB, в яких флуоресцентний барвник добре диспергований та захищений.

Вимірювання проводили в аміачному буфері при рН 10, де була показана висока селективність у присутності інших нуклеотидів.

Спектральні зміни, викликані поверхнево-активною речовиною, автори пояснювали взаємодією *цис*-діольної частини рибози АТФ з групою $-B(OH)_2$ в Cy-BA та електростатичними взаємодіями з катіонною поверхнево-активною речовиною.

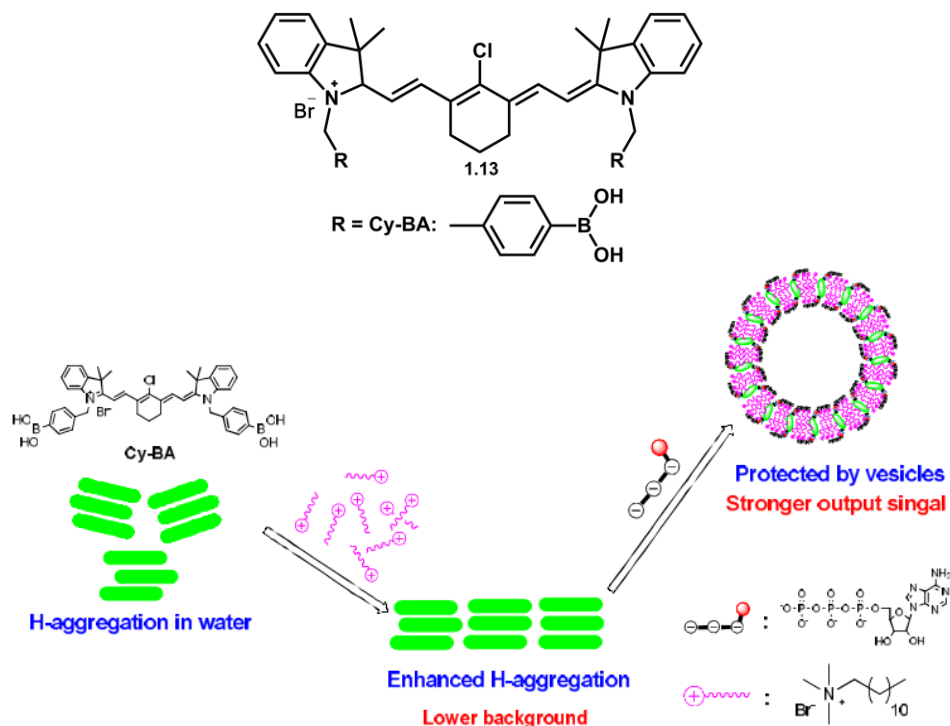


Рис. 1.9. Структура та принцип роботи ціанінового барвника **1.13**.

1.2. Хемосенсори на основі взаємодії водневих зв'язків: азакраун, амідні та похідні сечовини

У 2006 році Баззікалупі, Бенчіні та ін. повідомили про новий фенантроліновий макроцикл **1.14**, який може вибірково розпізнавати і детектувати АТФ серед нуклеозидтрифосфатів при рН 6 (Рис. 1.10) [53]. Поступове додавання АТФ до розчину **1.14** викликає лінійне зменшення інтенсивності флуоресценції **1.14** при 365 нм, а флуоресценція **1.14** повністю гаситься у присутності 1 еквіваленту АТФ. Інші нуклеотиди, такі як АДФ, АМФ, ГТФ та ТТФ викликали невелике зниження інтенсивності флуоресценції, в той час як у присутності надлишку ЦТФ спостерігалось падіння флуоресценції на третину. Розрахунки молекулярної динаміки

зв'язування у комплексах показали, що зігнута конформація нуклеотидів дозволяє утворення водневих зв'язків γ -фосфатних груп АТФ і ЦТФ з протонною аміногрупою бензильного залишку. Проте, γ -фосфат ЦТФ відштовхується від групи бензильного амонію і не може забезпечити утворення водневих зв'язків, в той час як γ -фосфат АТФ може забезпечити кілька сильних водневих зв'язків з цими групами, що приводить до селективності відносно АТФ.

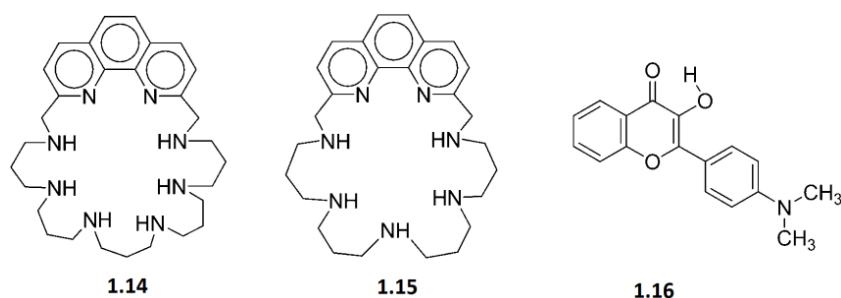


Рис. 1.10. Структури хемосенсорів **1.14**, **1.15**, **1.16**.

Баззікалупі, Бенчіні та ін. продовжили роботу у даному напрямку і повідомили про нову похідну фенантроліну **1.15** та порівняли її властивості з **1.14** (Рис. 1.10) [54]. Було зазначено, що інтенсивність флуоресценції обох рецепторів залежить від рівня протонності поліамінного ланцюга сполук. Проте, тільки ланцюг рецептора **1.14** був досить довгим, щоб дозволити π -стекінг нуклеїнових основ з фенантроліновим ядром. Здатність до зв'язування **1.14** з нуклеотидами зменшується у порядку: АТФ \square ЦТФ > ТТФ \approx ГТФ. Показано, що у зігнутих конформаціях зонду **1.15**, необхідних для утворення комплексу з нуклеотидом, нуклеїнові основи не можуть досягти відповідного розташування, щоб утворити π -стекінгову пару з фенантроліном. Вимірювання інтенсивності флуоресценції при різних значеннях рН показало, що **1.14** також дозволяє детектувати АТФ ратіометричним методом, проте у вузьких межах рН, від 4,5 до 7. Це дозволило припустити, що ефект гасіння, ймовірно, пов'язаний з процесом перенесення протона з групи амонію до фосфат-аніону ланцюга.

Українські науковці Пивоваренко В.Г., Вадзюк О.Б. та Костерін С.О. запропонували найпростішу конструкцію для флуоресцентної детекції АТФ. У 2006 році вони повідомили про новий флуоресцентний зонд на основі флавонолу **1.16** (Рис. 1.10), який може детектувати АТФ у водному буфері за нейтральних значень рН [55]. У цих умовах зонд **1.16** має спектр збудження флуоресценції з максимумом близько 400-410 нм, а присутність АТФ викликає батохромний зсув максимуму на 60 нм та утворення нового максимуму при 470-480 нм із загальним збільшенням інтенсивності емісії. У спектрах флуоресценції зонда **1.16** взаємодія з АТФ викликає незначне зміщення максимуму флуоресценції з 545 до 555 нм. Показано, що даний ефект дозволяє реєструвати утворення АТФ у мітохондріях під впливом сукцинату. Зареєстроване явище дозволило кількісно оцінити концентрації АТФ в діапазоні від 10^{-3} до 10^{-5} М. Не зважаючи на простоту будови, зонд **1.16** показав високу селективність до АТФ відносно інших нуклеотидів, найближчих за будовою. На відміну від АТФ, інші нуклеозидфосфати, такі як АДФ, АМФ, ГТФ та НАД⁺ не генерували нову смугу в спектрах збудження зонда **1.16**.

Структури подандів стали популярними у синтезі нових флуоресцентних зондів для детекції АТФ. Триногі молекулярні сенсори **1.17-1.24** на основі 1,3,5-триамінометил-2,4,6-триетилбензену, які можуть утворювати систему з шести донорів водневого зв'язку, були вбудовані в гідрофільні поліуретанові матриці (Рис. 1.11) [56]. Було повідомлено, що ці сенсори забезпечують ефект «перемикача» для різних фосфат-іонів, включаючи АМФ і АТФ. Запропоновано зв'язування аніонів з **1.17-1.24** у комплекс 1:1 з симетрією C_3 , в якій всі три гілки рецепторів у рівній мірі беруть участь в його утворенні. Сенсори зі збільшеною ліпофільністю **1.18-1.20** та **1.22-1.24** були вбудовані в гідрофільні поліуретанові матриці для уникнення водорозчинності **1.18-1.20** і **1.22-1.24**. У масиві були застосовані вода (контроль), сироватка крові, а також зразки сироватки з додаванням

аніонів (фосфат, пірофосфат, АМФ або АТФ). Внаслідок властивостей, притаманних аніонам, чиста сироватка «вмикала» флуоресценцію масиву, створюючи тим самим унікальний відгук флуоресценції, який був далі модифікований додаванням аніонів. Аналіз головних компонент показує, що плівки **1.18-1.20** і **1.22-1.24** дозволили відрізнити фосфат, пірофосфат, АМФ і АТФ.

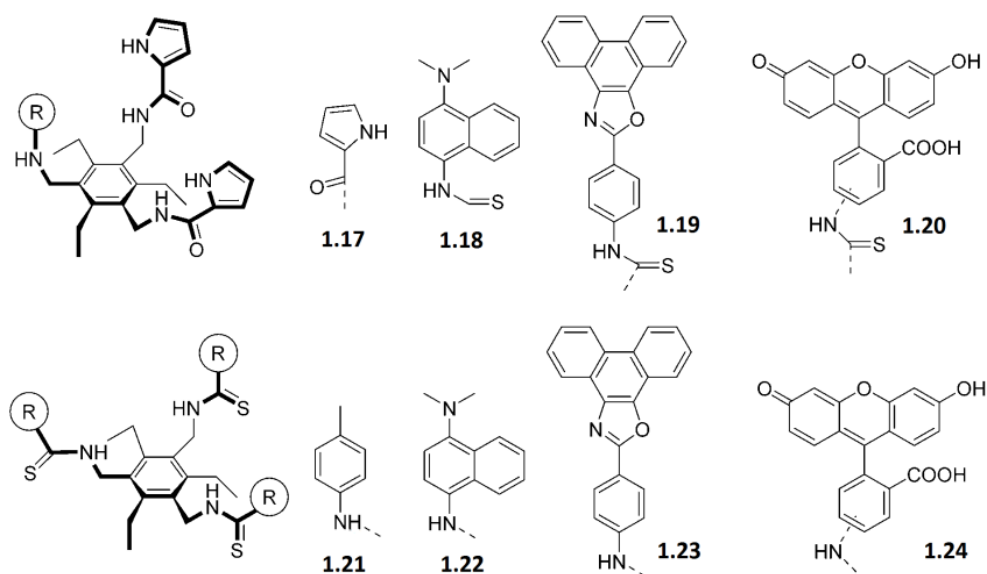


Рис.1.11. Структури **1.17 – 1.24**.

Було розроблено та синтезовано новий флуоресцентний хемосенсор на основі холевої кислоти **1.25** (Рис. 1.12) [57]; досліджено його взаємодію з фосфатами, АМФ, АДФ, АТФ, ЦТФ, ГТФ і ТТФ. Для вільного ліганда **1.25** спостерігалася типова флуоресценція антрацену з піками емісії при 443 нм, 419 нм і 397 нм і плечем при 473 нм. Коли АТФ додавали до водно-ацетонітрильного розчину (1:1) сенсора при рН 7.4, спостерігалася значне зниження флуоресценції **1.25**, в той час як інші гостьові молекули показали набагато менший ефект. Унікальність нового сенсора в тому, що він зв'язується з АТФ у 33-124 рази селективніше, ніж інші нуклеотиди; його афінитет падає у наступному порядку: АТФ>АДФ>ЦТФ>ГТФ>ТТФ>H₂PO₄⁻ ≈ P₂O₇⁴⁻. 30 нМ АТФ приводить до 15% гасіння флуоресценції **1.25**, і

зондування можна проводити у водних розчинах з чутливістю на субмікромолярному рівні.

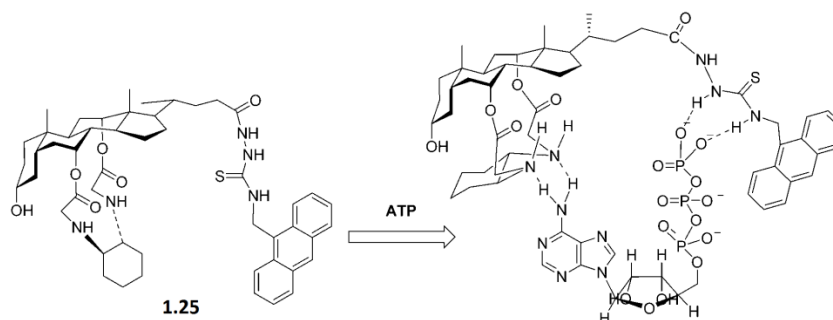


Рис. 1.12. Запропонований спосіб зв'язування **1.25** з АТФ.

Похідну нафталіміду та родаміну (НР), яка функціонує на основі фотоперенесення енергії збудження (FRET механізму), дослідили як ратіометричний флуоресцентний зонд для виявлення АТФ. У даній системі розкриття кільця родамін-спіролактаму, індуковане АТФ, генерує довгохвильову емісію родаміну, яка може діяти як акцептор енергії від збудженого ядра нафталіміду. Нафталімід виступає у ролі донора енергії, оскільки його спектр флуоресценції добре співпадає зі спектром поглинання родаміну. Зонд показує високу селективність до АТФ відносно інших аніонів, особливо органічних фосфатних аніонів [58].

1.3. Хемосенсиори на основі комплексів цинку як центрів зв'язування

Повідомлено про молекулярне розпізнавання і флуоресцентне зондування з використанням різних синтетичних рецепторів, що складаються з Zn^{2+} -комплексів як загального центру зв'язування [59].

У 2004 році група під керівництвом науковця з Японії Акію Ойїда повідомила про два флуоресцентні хемосенсиори що містять два іони цинку, координовані дипіколіламініними хелаторами у складі різних флуорофорів (Рис. 1.13) [60]. **1.26** і **1.27** показали високу селективність до різних фосфат-аніонів у водному розчині. Ці сенсори показали сильніший афінітет до

похідних пірофосфату, особливо до АТФ і АДФ у порівнянні з монофосфатами. Ефективна константа зв'язування (K_{app}) **1.26** для АТФ і АДФ $> 10^7 \text{ M}^{-1}$, а для **1.27** $K_{app} = 4.0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (для АТФ) і $1.6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (для АДФ).

Оскільки **1.27** не є селективним для конкретного виду фосфату, в тому числі для фосфорильованих пептидів у водному розчині, автори провели роботу, використовуючи нову систему, в якій **1.27** і **1.28** (Рис. 1.13) були вмонтовані в глікозилітований аміно-ацетатний гідрогель (TSH 1) [61]. При додаванні АТФ інтенсивність флуоресценції **1.27** при 435 нм збільшилася у 2,6 рази, а константа зв'язування перевищувала 10^6 M^{-1} . Після того як рецептор **1.28** був іммобілізований в гідрогелі, додавання різних аніонів привело до змін флуоресценції: емісія **1.28** (при 512 нм) збільшилася з синім зсувом для фенілфосфату, а інтенсивність зменшилася з червоним зсувом емісії для АТФ, фосфату і фосфотирозину, в той час як нефосфорильовані аніони не викликали змін флуоресценції. Важливо відзначити, що гідрофобна частина даного гідрогелю мала вирішальне значення для змін флуоресценції, індукованих гостем.

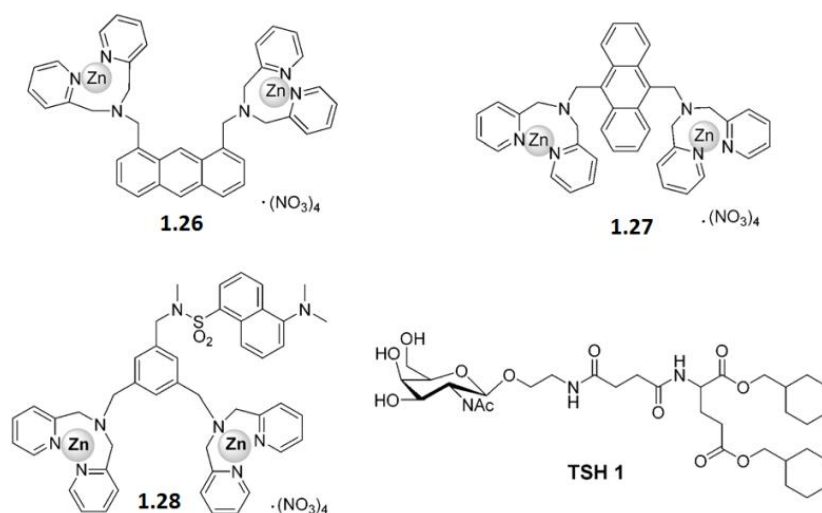


Рис. 1.13. Структури цинкових комплексів **1.26** – **1.28** та TSH1.

У 2006 році Оїда та Хамачі розробили хемосенсиори з подвійною емісією **1.29** і **1.30** на основі акридину для детекції похідних

нуклеозидфосфатів в нейтральних водних умовах (Рис. 1.14) [62]. При додаванні АТФ до **1.29** при рН 7.2 максимум випромінювання при 468 нм зміщувався в синю область, до 441 нм. У випадку **1.30** спостерігалася спектральна зміна при зв'язуванні АТФ: початкова зелена флуоресценція **1.30** ставала синьою. Обидва зонди показали наступний афінитет до АТФ: $7,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ і $5,3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ для **1.29** і **1.30**, відповідно. Зміну довжини хвилі випромінювання було пояснено відходом одного з іонів Zn^{2+} від атома Нітрогену акридину в результаті формування біядерного Zn^{2+} -комплексу. Розроблений хемосенсор був успішно застосований у біологічних дослідах, таких як моніторинг флуоресценції при гідролізі нуклеозидфосфатів під впливом ферменту апірази, а також перенесення глікозилу, що каталізується глікозилтрансферазою.

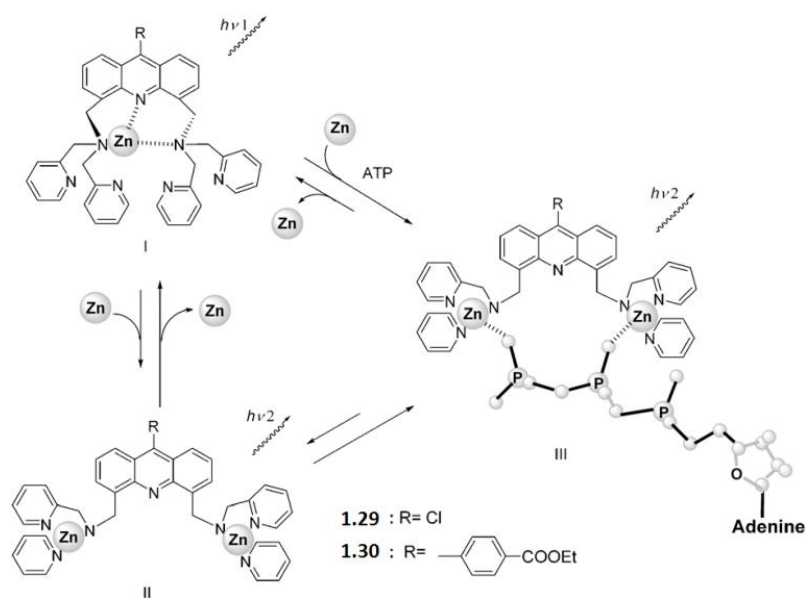


Рис. 1.14. Структури **1.29** і **1.30**, а також зображення механізму подвійного випромінювання з нуклеозидфосфатами.

У тому ж році, Оїда та Хамачі повідомили про новий хемосенсор (**1.31**), який складається з ксантенового флуорофора, що містить два 2,2'-дипіколіламінові (ДПА)- Zn^{2+} залишки як фосфат-зв'язуючий сайт для виявлення АТФ (Рис. 1.15) [63]. У воді при нейтральних рН зміни в спектрах збудження флуоресценції зі збільшенням концентрації АТФ відбувалися на трьох довжинах хвиль (322, 360, 407 нм), з двома

ізоемісійними точками. Хемосенсор **1.31** показав сильну спорідненість до нуклеозидпірофосфатів, таких як АТФ ($K_a = 4,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$), ГТФ ($K_a = 1,0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$) і АДФ ($K_a = 2,8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$), в той час як зв'язування з HPO_4^{2-} іоном і АМФ було відносно слабким.

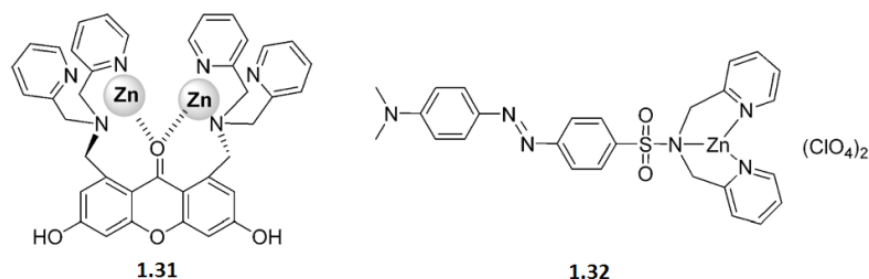


Рис. 1.15. Структури **1.31** та **1.32**.

Дас та ін. повідомили про хромогенний комплекс катіона цинку (**1.32**), який може вибірково зв'язуватися з АТФ у водному середовищі, на відміну від інших біологічно важливих аніонів, таких як АДФ, АМФ, пірофосфат або фосфат (Рис. 1.15) [64]. Цинк-дипіколіламінова частина в **1.32** діє як фрагмент рецептора АТФ, в той час як диметиламінофеніл-азофенільна група діє як репортер. При додаванні АТФ (рН 7.2) максимум поглинання зміщується від 463 нм до 484 нм зі зміною кольору від блідо-жовтого до світло-рожевого. Невеликий червоний зсув у 8 нм спостерігався з АДФ і ніяких змін в спектрах поглинання не спостерігалось при додаванні АМФ, пірофосфату або H_2PO_4^- . Крім того, цей зонд може бути використаний як колориметричний барвник для дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*), де фарбування можна досліджувати за допомогою простої світлової мікроскопії.

Цікавою у науковому плані є розробка групи Ойїда ратіометричних хемосенсорів **1.33** і **1.34** на основі індукованої зв'язуванням з АТФ модуляції флуоресцентного резонансного перенесення енергії збудження (FRET) (Рис. 1.16) [65]. При додаванні АТФ у водному розчині при рН 7.2 збудження кумаринової частини при 341 нм викликало появу нової смуги у

спектрах флуоресценції, яка мала природу перенесення енергії збудження з кумарину до ксантену. Розрахована ефективність FRET у комплексах **1.33** і **1.34** з АТФ становила 76% і 83% відповідно. Константа стабільності комплексів становила (K_{app}) $2,9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ для АТФ зі стехіометрією зв'язування 1:1. Під час титрування **1.34** з АТФ, спостерігалось зниження флуоресценції кумаринового флуорофору і значне збільшення флуоресценції ксантену. Ці хемосенсиори використовувалися для моніторингу флуоресценції ферментативних реакцій в режимі реального часу з подальшою демонстрацією в дослідженні флуоресцентної візуалізації нуклеозидполіфосфатів в живих клітинах.

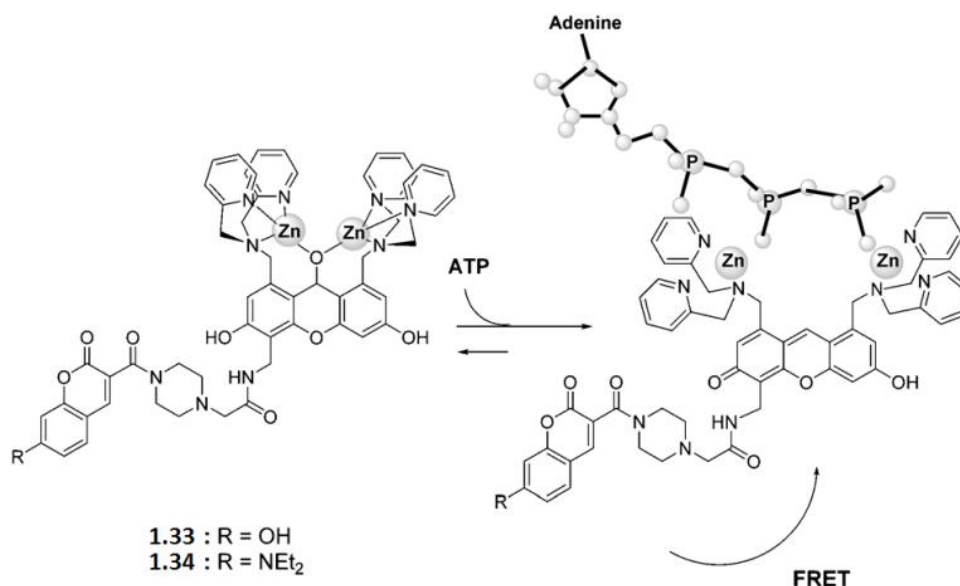


Рис. 1.16. Схематичне зображення механізму зв'язування хемосенсорів **1.33** і **1.34** з АТФ.

Іншими авторами було запропоновано спрощену модифікацію рецептора АТФ у флуоресцентному цинк-вмісному хемосенсорі (**1.35**). Тут досягається усунення фонові флуоресценції вільного зонда шляхом включення у комплекс з ним барвника пірокатехінового фіолетового як гасника (Рис. 1.17) [66]. Додавання цього гасника викликає зниження флуоресценції **1.35** шляхом формування комплексу 1:1 з константою стабільності $2.89 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$. Поява АТФ у розчині приводить до значного

посилення флуоресценції внаслідок дисоціації сенсорного ансамблю флуорофор - гасник. Константа стабільності комплексу **1.35** з АТФ визначена як $1.36 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$.

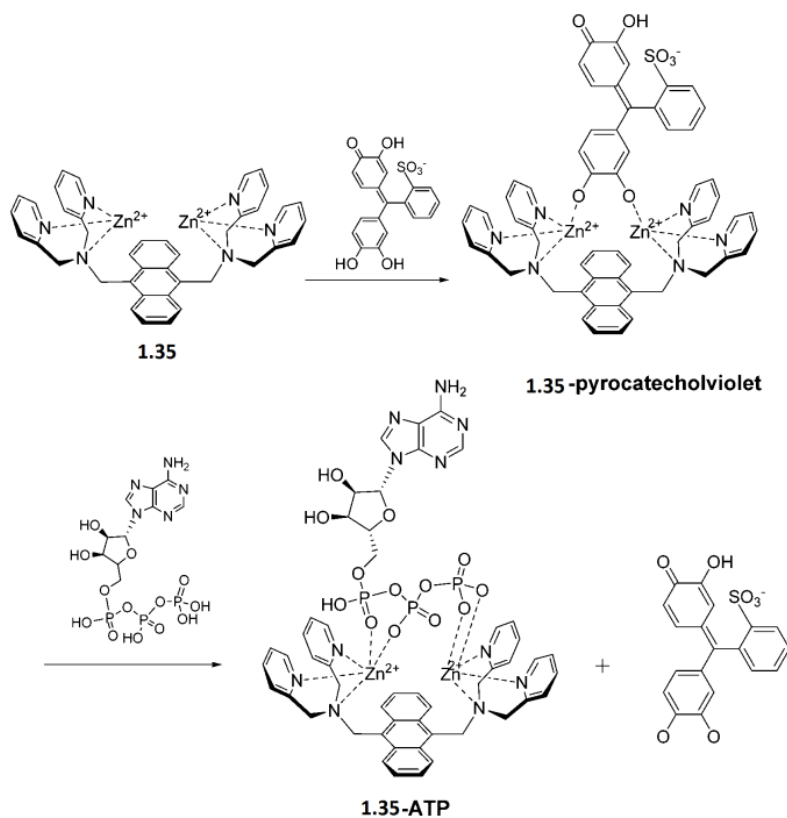


Рис. 1.17. Схематичне зображення координації флуоресцентного хемосенсора **1.35** з АТФ.

Чен та ін. повідомили про тетраазамакроцикл (**1.36**), що містить дві антрилові групи як хелатори, які можуть вибірково зв'язувати іони Zn^{2+} . При цьому розгорається флуоресценція ексимерів антрацену (Рис. 1.18) [67]. Комплекс **1.36-Zn²⁺** виявляв чудову селективність відносно АТФ в нейтральному водному розчині, демонструючи при цьому зменшення емісії антраценового ексимеру і помітне збільшення емісії мономеру. Як показано на Рис. 1.18, Zn^{2+} зближує флуорофори у просторі за рахунок координації чотирма атомами Нітрогену макроциклу і ще двома на лінкерах. При додаванні 10 екв. пірофосфату або АТФ до розчину, випромінювання ексимеру **1.36-Zn²⁺** гасилося, в той час як емісія мономеру збільшувалася в 3.8 і 13.7 разів відповідно.

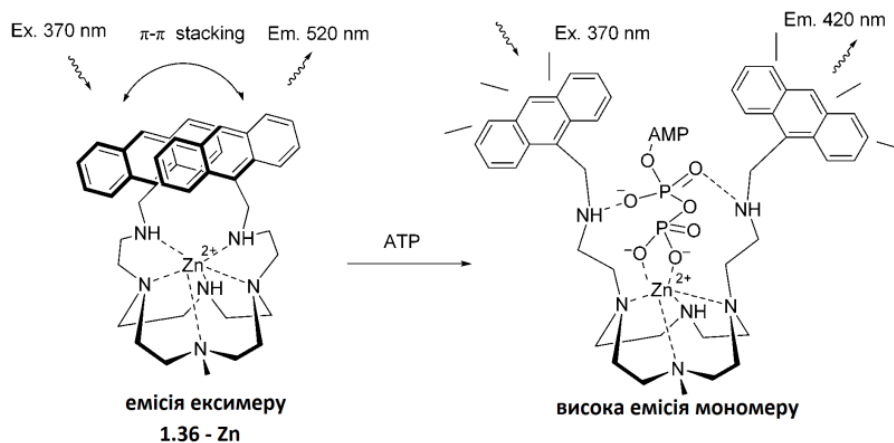


Рис. 1.18. Схематичне зображення механізму генерації флуоресцентного сигналу при зв'язуванні **1.36-Zn** з АТФ.

Мор з співробітниками повідомив про хемосенсор з нафталімідним флуорофором (**1.37**) для АТФ на основі Zn^{2+} -дипіколіламінного рецептора (Рис. 1.19) [68]. Для нього при рН 7.4 зі збільшенням концентрації АТФ спостерігалось значне (~ 2.3 кратне) зростання інтенсивності флуоресценції з максимумом при 535 нм. Серед різних органічних аніонів лише для АДФ і АТФ константи зв'язування є близькими. Утворення **1.37** при взаємодії з Zn^{2+} катіонами веде до розгорання флуоресценції, а подальша взаємодія з АТФ – до ще більшого розгорання та батохромного зміщення смуги флуоресценції, оскільки при появі АТФ у комплексі взаємодія між Zn^{2+} і ароматичною NH-групою послаблюється (Рис. 1.19).

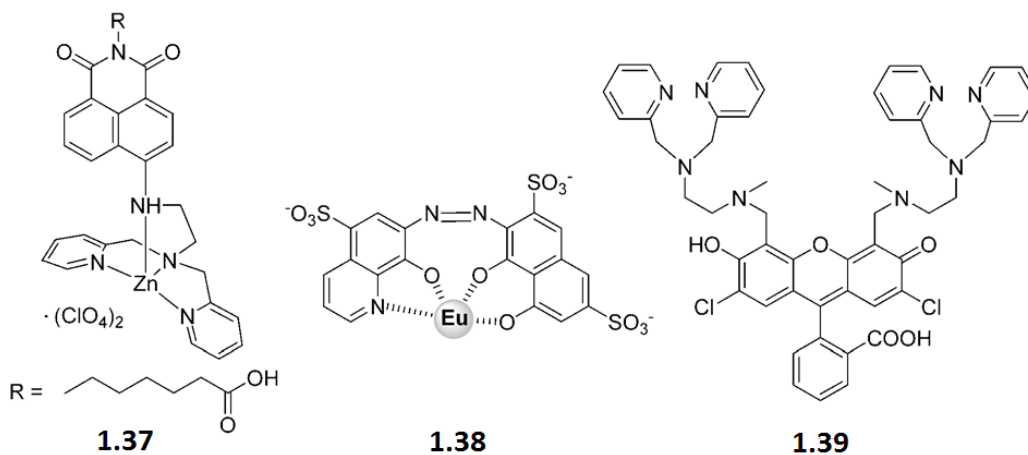


Рис. 1.19. Структури хемосенсорів **1.37** – **1.39**.

1.4. Люмінесцентні хемосенсиори на основі лантанодів і використання інших металічних комплексів у рецепторі АТФ

В останні роки були вивчені АТФ сенсори, що використовують як рецептор аналіту інші іони металів або комплекси металів, таких як ітербій (Yb^{3+}), рутеній (Ru^{2+}), європій (Eu^{3+}), тербій (Tb^{3+}), ітрій (Y^{3+}), манган (Mn^{2+}) або кобальт (Co^{2+}). Деякі з цих комплексів мають координаційно ненасичені центральні іони металу а, отже, мають вільні координаційні місця для аніонів, що забезпечує зміни оптичних властивостей.

Ксу та ін. повідомили про координаційно ненасичені лантанідні комплекси (**1.38**), і показали, що не тільки фосфат і пірофосфат, але також і ДНК та РНК можуть створювати зміни у поглинанні та флуоресцентних спектрах сполуки **1.38** (Рис. 1.19) [69]. У ТРІС буфері (рН 7.4) **1.38** з АМФ і АДФ давали оптичні відповіді схожі на ті, що дають HPO_4^{2-} і $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, відповідно. З АТФ спостерігалось інтенсивне поглинання, зміщене у довгохвильову частину спектру. Константа стійкості комплексу **1.38** з АТФ була визначена як $2.2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$

Юн та ін. повідомили про нову похідну флуоресцеїну, що містить дві (2-аміноетил)біс(2-піридилметил)аміногрупи для детекції пірофосфату та АТФ у водному розчині (Рис. 1.19) [70]. Хемосенсор **1.39** в присутності Mn^{2+} (2,5 екв.), показав значне селективне підвищення флуоресценції при додаванні пірофосфату або АТФ при рН 7.4 і значно менше підвищення флуоресценції з АДФ. Обчислені константи стабільності комплексів з АТФ і АДФ становили $4,2 \cdot 10^4$, $3,5 \cdot 10^4$ та $1,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, відповідно. Варто зазначити, що різниця у флуоресцентній відповіді на пірофосфат і фосфат-аніони, а також на АТФ в порівнянні з АДФ та АМФ в цій системі була показовою.

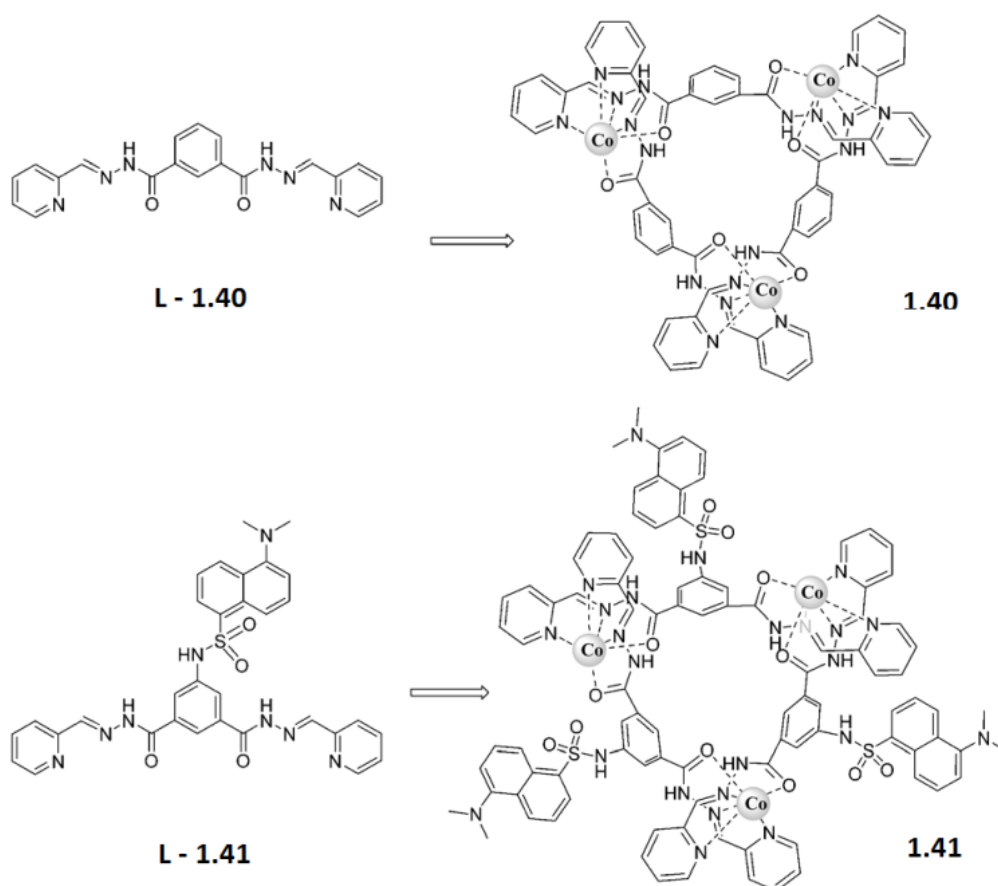


Рис. 1.20. Структури **1.40** – **1.41**.

Металоспіральні трикутники, які складаються з хромофорних вузлів та тригерних точок з водневим зв'язком, були запропоновані групою Дуана для селективного визначення АТФ у водних середовищах (Рис. 1.20) [71]. Спіральні трикутники на основі кобальту(II) були синтезовані шляхом додавання NH_4PF_6 до метанольного розчину лігандів (**1.39**, **1.40**) та $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Ці спіральні трикутники на основі кобальту (II) **1.40** та **1.41** демонстрували майже однакові спектральні зміни в УФ-видимому діапазоні при додаванні АТФ, які полягали у значному зростанні поглинання при 380 нм. Стехіометрія комплексів з АТФ була близькою до 1:1, а константи асоціації ($\log K_{\text{ass}}$) становили 2,55 та 3,86, відповідно.

Юнг, Кім та їх колеги розробили водорозчинний супрамолекулярний полімер на основі C_3 -симетричного терпіридинового комплексу **1.42** з Tb^{3+} (S1-Tb), який може надавати інформацію в реальному часі про частку АТФ, АДФ та АМФ внаслідок люмінесценції (Рис. 1.21) [72].

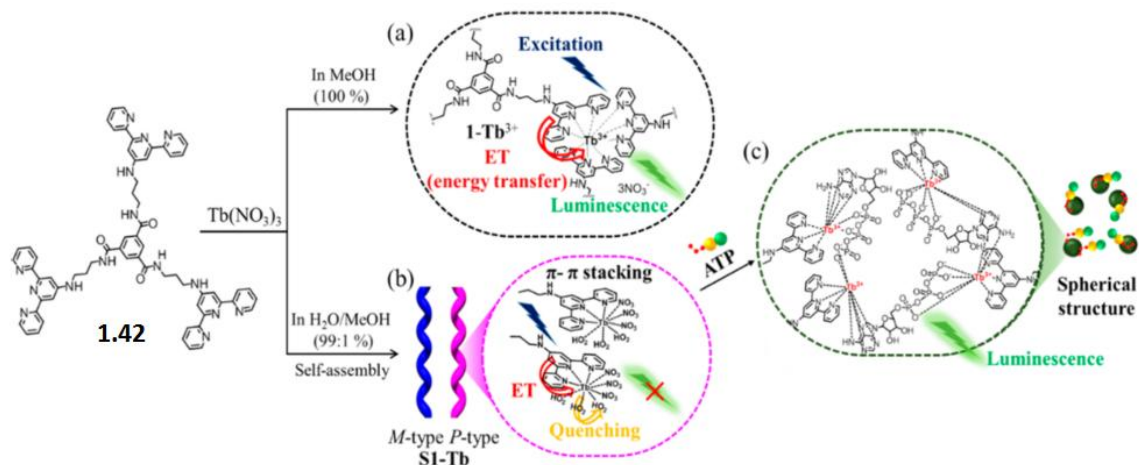


Рис. 1.21. Структура та принцип роботи **1.42** [73].

Зонд **1.42** демонструє селективність в ряду з іншими нуклеозидфосфатами та працює в буферному розчині HEPES (pH 7.4), в діапазоні концентрацій АТФ 2-20 мкМ. Автори пропонують використовувати час життя люмінесценції S1-Tb для контролю кількості АТФ, АДФ і АМФ *in vitro* після ферментативного гідролізу АТФ.

Відомо, що окремі рутенієві комплекси з нітрогеновмісними ароматичними лігандами мають люмінесцентні властивості. Кілька 3,3'-модифікованих біпіридил-рутенієвих комплексів було синтезовано для розпізнавання органічних аніонів [73], зокрема і АТФ **1.43** (Рис. 1.22).

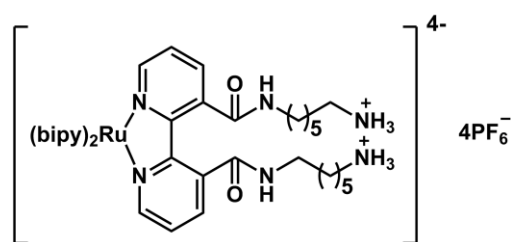


Рис. 1.22. Структура рутенієвого комплексу **1.43**.

У роботі [73] дослідники визначили стехіометрію комплексів, а також константи зв'язування для аденозин моно-, ди- та трифосфату. Комплекси АМФ та АДФ з **1.43** формувалися у стехіометрії 1:2 ($\log K = 7,24$ та $9,36$ відповідно), тоді як комплекс з АТФ мав стехіометрію 1:1 ($\log K = 5,81$). Згідно до описаних у статті кривих титрування, найбільшу спорідненість

зонд **1.43** демонструє відносно АТФ, причому АДФ і пірофосфат мають подібні афінності, а найслабкіша взаємодія спостерігається з АМФ. Практичним недоліком цієї роботи є те, що вимірювання проводили в ацетонітрилі, і результати неможливо екстраполювати на водні розчини.

1.5. Хемосенсори на основі зшитих з полімерів або мезопористих матеріалів

Група Шінкаї повідомила про водорозчинну похідну катіонного політіюфену **1.44**, який демонструє колориметричну і флуоресцентну відповіді при зв'язуванні з АТФ за рахунок електростатичних і гідрофобних кооперативних взаємодій (Рис. 1.23) [74]. При поступовому додаванні АТФ до **1.44** у воді максимум поглинання поступово зміщується батохромно з 400 нм до 538 нм, зі зміною кольору від жовтого до рожево-червоного. Після додавання еквімолярної кількості АМФ, АДФ, УТФ, карбоксилату, фосфату або іонів трифосфату у водні розчини **1.44** більшість розчинів лишались жовтими ($\lambda_{\max} \square 435$ нм), окрім тих, що містили АДФ або УТФ, які давали помаранчевий колір. Крім того, зміна кольору розчину супроводжувалась гасінням флуоресценції. Найбільш ефективно гасіння (84%) спостерігалось у присутності АТФ.

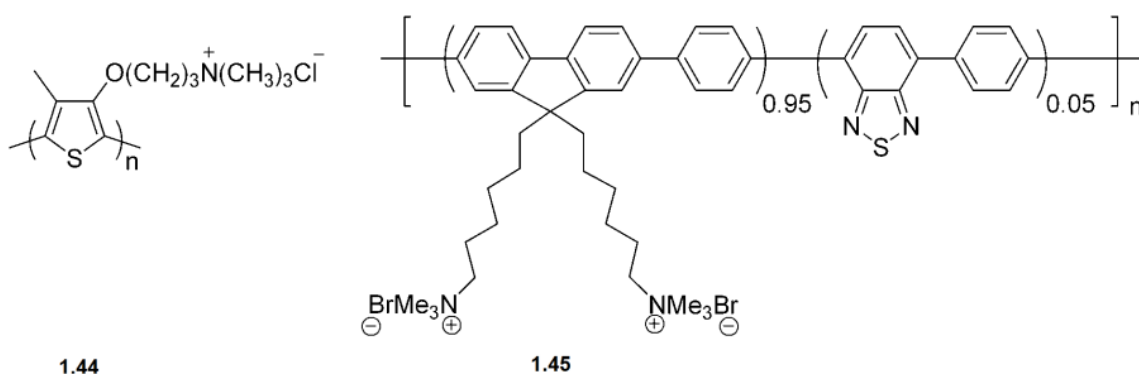


Рис. 1.23. Структури полімерів **1.44** та **1.45**.

Ші та ін. дослідили кон'югований полімер **1.45** і опублікували свою роботу як перше спостереження колориметричного розрізнення 15-ти нуклеозидфосфатів (НФ) (Рис. 1.23) [75]. При додаванні НФ при рН 7.4, максимальне поглинання **1.45** змістилося від 405 до 416 (АМФ), 455 (АДФ), 542 (АТФ), 499 (УТФ), 480 (ТТФ), 540 (ГТФ) і 469 нм (ЦТФ), відповідно. Лінійний дискримінантний аналіз (ЛДА) і колориметричний метод були використані для класифікації цих нуклеотидів. Відповідно до змін кольору, рожево-фіолетова група складалась з АТФ, АДФ, УТФ, ТТФ, ГТФ, ГДФ і ГМФ, а решта вісім нуклеотидів були другою жовто-помаранчевою групою. Ця різниця в кольорі може бути використана як колориметричний метод грубого розрізнення певних НФ, особливо для АТФ над АДФ і АМФ, і УТФ над УДФ і УМФ.

Група Ванга повідомила про водорозчинний комплекс кон'югованих полімерів/ферментних субстратів, які можуть бути використані як зонд для безперервних і чутливих аналізів флуоресценції для НФ (моно-, ди- та три-, Рис. 1.23) [76]. Максимум флуоресценції **1.45** при рН 7.5 розташований приблизно при 410 нм, а емісія флуоресценції 2,1,3-бензотіадіазольних (БТ) ядер при 540 нм не спостерігалася. Додавання субстратів аніонного характеру (АТФ) приводило до значного гасіння випромінювання флуоренової ланки при 410 нм та розгорання емісії БТ ланки при 540 нм, з поступовим зсувом кольору випромінювання від синього до зеленого. Такий явний зсув кольору емісії свідчить про агрегацію ланцюгів **1.45**. Менше гасіння емісії **1.45** реєстрували при додаванні АДФ або АМФ, а також відсутність емісії спостерігалася для БТ ланки при 540 нм. Цей результат показав, що АДФ і АМФ, що містять менш негативні заряди в порівнянні з АТФ, не викликають агрегацію **1.45**.

Аморо та ін. повідомили про використання антриметиламінового ліганду **1.46**, іммобілізованого на мезопористих кремнеземових UVM-7 матеріалах, для флуоресцентного визначення АТФ у водних середовищах

при рН 2.8 (Рис. 1.24) [77]. Для твердого мезопористого кремнеземового матеріалу UNA(2-E)-С додавання АТФ приводило до гасіння емісії антрацену. Він мав значно більшу чутливість до АТФ у порівнянні з іншими кремнеземами ($\log K=4,78$). Для UNA(10-E)-С, окрім зменшення флуоресценції при 415 нм, додавання АТФ приводило до зростання інтенсивності нової смуги емісії при 500 нм. Поява нової неструктурованої широкої смуги, зсунутої в червону частину спектру по відношенню до смуги мономеру, була пояснена утворенням ексимерів між сусідніми антраценовими групами. Як показано на Рис. 1.24, у присутності АТФ завдяки зменшенню електростатичного відштовхування антраценові групи можуть наблизитись, створюючи більше можливостей для утворення ексимерів.

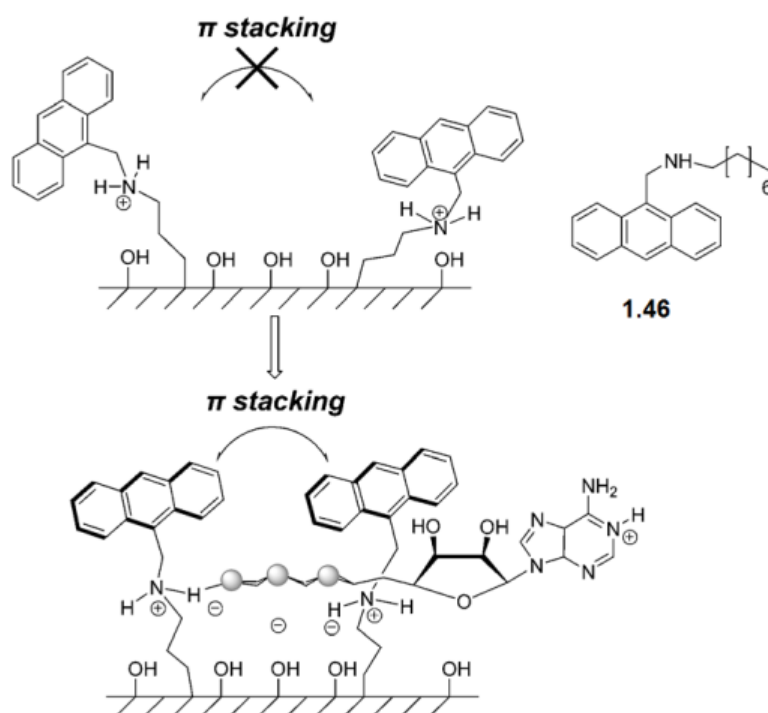


Рис.1.24. Структура ліганду **1.46** і модель для пояснення збільшення інтенсивності смуги ексимеру через присутність АТФ.

Про нову сенсорну систему, що утворюється через приєднання різних поліамінових ланцюгів, функціоналізованих індольним флуорофором до бемітової матриці, повідомили Гарсія-Еспана та ін. (Рис. 1.25) [78].

Дослідження флуоресценції в стаціонарному режимі показали, що ці матеріали мають високу чутливість до протонів, іонів металів, таких як Cu^{2+} та Zn^{2+} , а також для аніонних нуклеотидів – АТФ, АДФ та АМФ. Всі три матеріали показали зменшення інтенсивності флуоресценції при збільшенні концентрації АТФ, однак **1.47** показав менший афінитет, ніж інші два. Встановлено, що серед усіх факторів, у процесі розпізнавання «гість-хазяїн» важливу роль відіграє π -стекінг електронно-насиченого кільця індолу та аденінового кільця нуклеотиду. АДФ і АМФ показали менш ефективну взаємодію з цими трьома матеріалами.

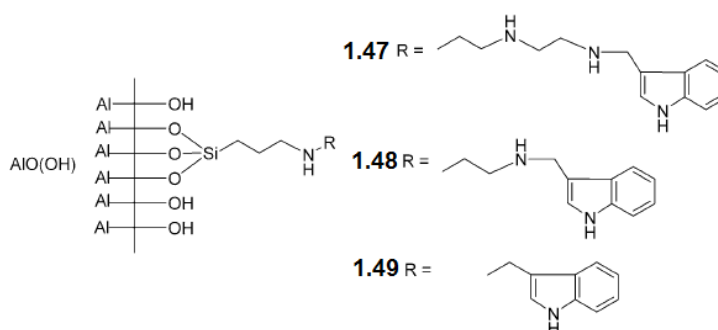


Рис.1.25. Структура лігандів на основі матеріалів **1.47**, **1.48** та **1.49**.

Тао зі співавторами розробили нову систему флуоресцентного детектування АТФ з використанням АТФ-опосередкованого процесу агрегації модифікованої піреном арилборонової кислоти (**1.50**) на полікатіоні (**1.51**) (Рис. 1.26) [79]. Суттєві спектральні зміни спостерігалися в цій системі при додаванні АТФ та АДФ, але не АМФ. Зі збільшенням концентрації АТФ у водному розчині полікатіону при рН 10.2 широка смуга флуоресценції з максимумом випромінювання ексимеру при 482 нм стає інтенсивнішою. Ця система може виявити концентрації АТФ в діапазоні від 0,4 до 5 μM .

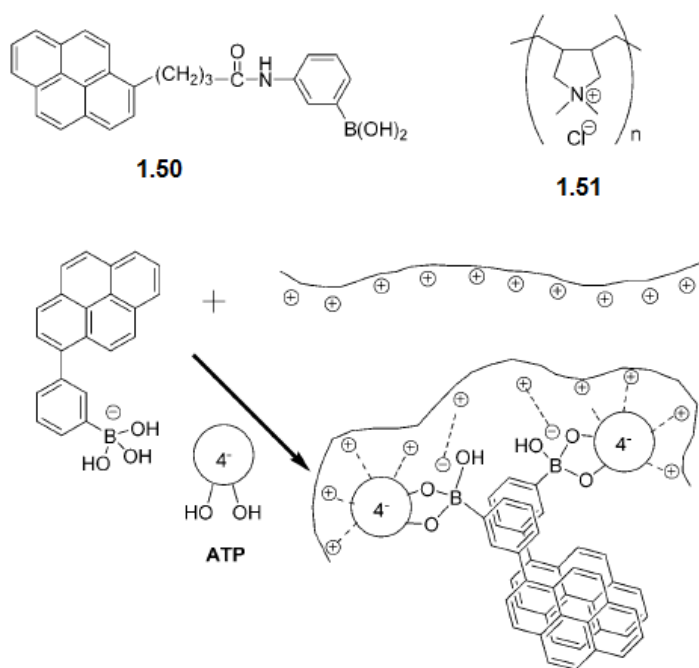


Рис.1.26. Структури модифікованої піреном арилборонової кислоти **1.50**, полікатиону **1.51** і АТФ-опосередкована агрегація **1.50** на **1.51**.

Нещодавно було розроблено двомодальний колориметричний та флуоресцентний зонд для виявлення АТФ на основі самочинної агрегації катіонної похідної політіофену (ПТ) (Рис.1.27) з антраценовими групами в бічному ланцюзі. Межа визначення АТФ таким сенсором становила 10^{-9} М [80].

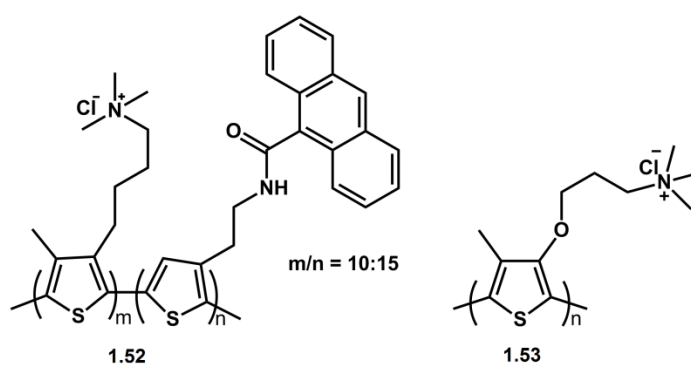


Рис.1.27. Структура двомодального зонда **1.52**.

Запропоновано, що при додаванні АТФ оптичний зонд **1.52** та АТФ агрегують за рахунок електростатичних взаємодій. Просторові обмеження в агрегатах **1.52**/АТФ змушують **1.52** приймати більш плоску конформацію, що, як наслідок, приводить до агрегації **1.52**-структур. Під час цього

процесу антраценові групи з великою ароматичною площиною в бічному ланцюзі **1.52** сприяють агрегації полімеру шляхом π - π -стекингу, чим забезпечують збільшену чутливість до АТФ у порівнянні з катіонною системою **1.53** (Рис.1.27).

Хуанг зі співавторами повідомили про нову водорозчинну катіонну похідну політіюфену [81], що може бути специфічно локалізована в лізосомах та використана як флуоресцентний зонд для визначення АТФ у клітинах. Сполука **1.54** (Рис. 1.28) демонструє високу селективність до АТФ за фізіологічних значень рН з межею визначення АТФ 10^{-11} М. Зонд має низьку цитотоксичність, задовільну проникність та фотостабільність у клітинах та може застосовуватись для моніторингу концентрації АТФ у лізосомах у режимі реального часу.

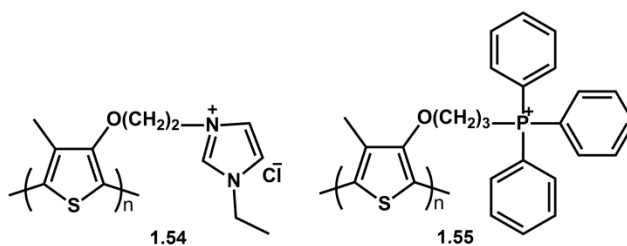


Рис. 1.28. Структури хемосенсорів **1.54** та **1.55**.

Автори продовжили свою роботу та розробили нову водорозчинну катіонну політіюфенову похідну [81] **1.55**, що може бути використана як флуоресцентний зонд для визначення АТФ у клітинних мембранах (Рис. 1.28). Сполука **1.55** має гарну чутливість та селективність до АТФ з межею визначення 27 нМ. Була продемонстрована робота зонду для моніторингу рівня АТФ у клітинних мембранах під час апоптозу.

Також було представлено ратіометричний зонд на основі політіюфену (ПТ) [82] **1.56** (Рис. 1.29), робота якого базується на резонансному фотоперенесенні енергії збудження та гасінні, що викликане агрегацією (ACQ).

Утворення комплексу полімер - АТФ приводить до конформаційних змін ПТ-основи та агрегації. Зонд демонструє ратіометричний сигнал та сильну спорідненість до АТФ ($K_{app} = 3,12 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$) у водному розчині за фізіологічних рН, на відміну від інших фосфатів.

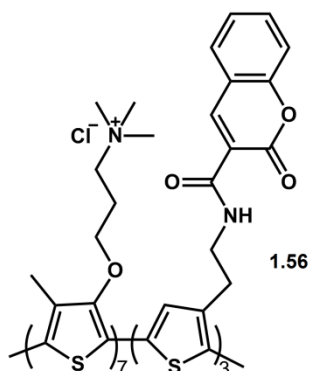


Рис. 1.29. Структура хемосенсора **1.56**.

Чжао з колегами представили два кон'юговані полімери, що містять арилборонову кислоту PPE-PBA та четвертинну амонійну групу PFP-NMe₃⁺ як комбінований зонд **1.57** для визначення АТФ [83]. Нейтральний PPE-PBA полімер може розпізнавати рибозильний фрагмент АТФ, утворюючи ковалентні зв'язки, в той час як PFP-NMe₃⁺ може взаємодіяти з негативно зарядженими фосфатами АТФ шляхом електростатичних взаємодій. Внаслідок того, що спектр випромінювання PFP-NMe₃ та спектр поглинання PPE-PBA збігаються, у присутності АТФ виникає ефективне Ферстерівське перенесення енергії збудження.

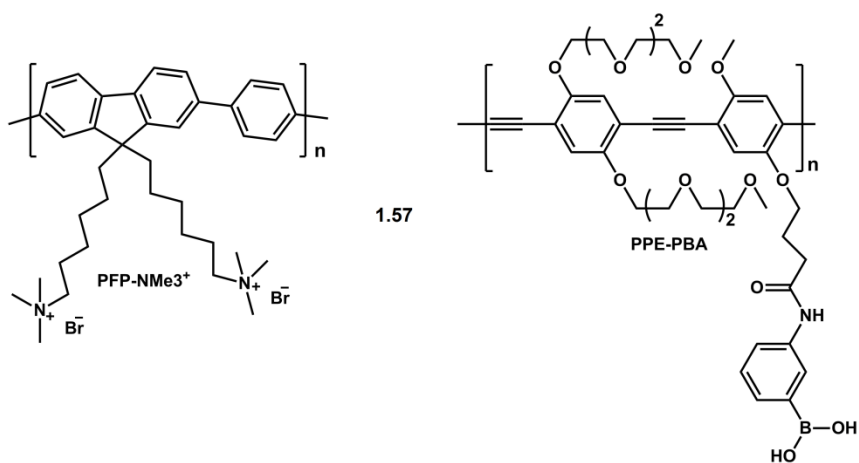


Рис. 1.30. Структура та принцип роботи комбінованого зонда **1.57**.

Такий комбінований зонд (Рис.1.30) на основі кон'югованих полімерів, що базується на багатосайтовому зв'язуванні та FRET стратегії, може відрізняти АТФ від інших фосфатів, таких як АДФ, АМФ та ін. Межі детекції АТФ зондом складають 2,5 – 180 мкмоль.

1.6. Хемосенсори на основі олігонуклеотидів

Останніми роками було розроблено кілька нових стратегій для визначення АТФ, де застосовуються олігонуклеотиди або пептиди [84], що специфічно зв'язуються з окремими молекулами-мішенями (сигнальні аптамери) [85] та синтетичні рецептори типу «хазяїн-гість» [86].

Чанбей з колегами запропонували новий флуоресцентний зонд, олігонуклеотидний бакен **1.58** для аналізу АТФ [87]. При зв'язуванні **1.58** з двома короткими олігонуклеотидами у присутності АТФ відбувається з'єднання олігонуклеотидів Т4 ДНК лігазою і подальше конформаційне перетворення ДНК-шпильки у подвійну спіраль. (Рис.1.31). На відміну від ДНК-шпильки, в утвореній спіралі флуорофор і гасник не контактують один з одним, тому флуоресценція розгорається. Даний метод доволі чутливий, з межею виявлення 0,5 нМ та демонструє гарну вибірковість.

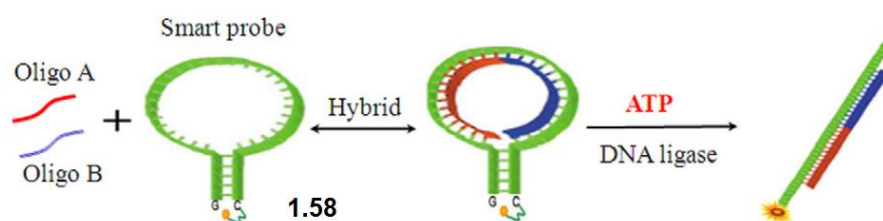


Рис. 1.31. Схема роботи зонда **1.58**.

Інші китайські вчені запропонували метод детекції АТФ за допомогою складного флуоресцентного зонда [88], що містить аптамер і молекулярний бакен (МБ). Як компонент розпізнавання молекули тут був використаний АТФ-аптамер, а також олігонуклеотид (одноланцюгова коротка нитка)

частково комплементарний до аптамеру і МБ як друга частина. При наявності АТФ аптамер зв'язувався з ним, що супроводжувалось гібридизацією МБ і олігонуклеотиду та розгоранням флуоресценції. Межа детекції АТФ таким молекулярним пристроєм: - 0,1 нМ. Даний спосіб дозволяє виявити АТФ з високою селективністю в присутності ГТФ, ЦТФ та УТФ.

Лі з колегами розробили біфункціональний олігонуклеотидний зонд [89] з двома циклами, що складаються з АТФ і тромбін-аптамерних послідовностей, відповідно, для окремого аналізу двох різних аналітів: АТФ і тромбіну. Межі детекції були оцінені як 25 нМ для АТФ і 12 нМ для тромбіну, відповідно. Біфункціональний олігонуклеотидний зонд показав високу селективність відносно АТФ і тромбіну у порівнянні з їх аналогами.

1.7. Флуоресцентні наноматеріали

Зважаючи на унікальні властивості квантових точок (КТ), останнім часом почали з'являтися повідомлення про використання їх як зондів для детекції фосфатовмісних сполук [90].

Нанокристали CdTe, покриті тіогліколієвою кислотою (TGA-CdTe КТ), застосовували для визначення АТФ методом гасіння флуоресценції [91]. Також, було запропоновано зонд, що працює за принципом розгорання флуоресценції КТ за фізіологічних значень рН, на основі TGA-CdTe, що модифіковані люмінесцентними комплексами катіона Eu^{3+} . Сенсорна платформа показала значну флуоресцентну відповідь на НТФ [92].

Каллан із колегами повідомив про модифікацію комерційно доступних КТ CdSe-ZnS шляхом заміни гідрофобних поверхневих лігандів з (2-меркаптоетил)триметиламонійхлоридом. Запропонований сенсор демонстрував значне флуоресцентне гасіння – близько 80% від АТФ та 25% від ГТФ, у той час як у присутності інших аналітів флуоресцентний сигнал

не змінювався [93]. Нещодавно було запропоновано використання нанокластерів аурому (AuNC) для визначення фосфатовмісних сполук. Зв'язані з глутатіоном нанокластери аурому, декоровані катіонами Fe^{3+} (AuNCs @ GSH- Fe^{3+}), застосовувалися як сенсори АТФ та пірофосфату [94].

Таїландські вчені розробили сенсор для АТФ на основі немодифікованих водорозчинних Cys-CdS КТ **1.59**, що працює у 100% водному розчині [95]. Синтезовані КТ Cys-CdS містили 3,42 ммоль цистеаміну на грам Cys-CdS КТ та мали квантовий вихід 0,004. У присутності АТФ інтенсивність люмінесценції збільшувалася у 2,5 рази. Даний сенсор має гарну стабільність сигналу та швидкий час відгуку.

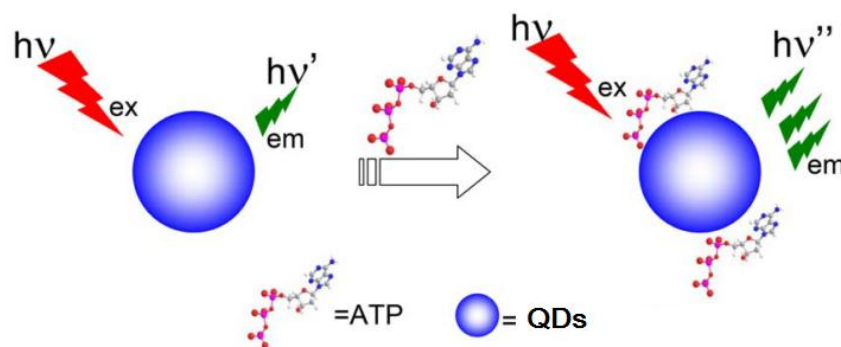


Рис. 1.32. Принцип роботи сенсорів **1.59** та **1.60**.

Можливий механізм роботи базується на електростатичних взаємодіях що конкурують з водневими зв'язками між АТФ та протонованою аміногрупою на поверхні Cys-CdS КТ. Робочий діапазон сенсора досить вузький, від 20 до 80 мкМ АТФ.

Ши та ін. представили флуоресцентний зонд для детекції АТФ на основі Zn^{2+} модифікованих L-цистеїн-зшитих CdTe КТ **1.60**, де використали ефект високої спорідненості між катіоном Zn^{2+} та АТФ [96]. Ними знайдені гарні лінійні залежності між інтенсивністю флуоресценції та концентрацією АТФ у межах $5\text{-}50 \text{ мкмоль}\cdot\text{л}^{-1}$, а також висока селективність до АТФ в порівнянні з іншими фосфатовмісними сполуками. Даний метод дозволяє визначати АТФ у зразках сироватки людини.

Нову стратегію для флуоресцентної детекції аденозинтрифосфату було розроблено з використанням ДНК-міченого карбоксифлуоресцеїну (FAM), (FAM-ДНК) [97]. Як зонд виступав ковалентний кон'югат FAM-ДНК **1.61**, а наночастинки CeO_2 (наноцерій) діяли як гасник.

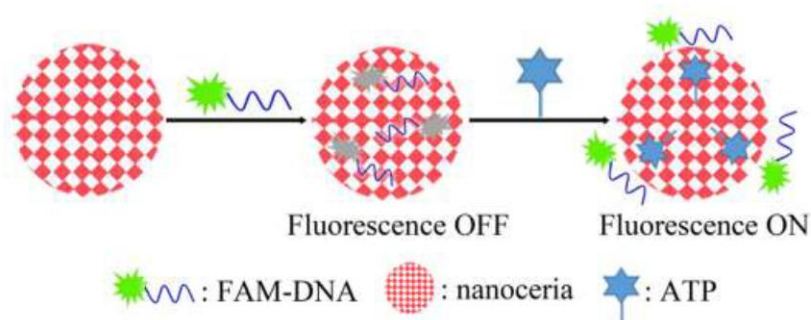


Рис. 1.33. Принцип роботи хемосенсора **1.61**.

FAM-ДНК, прикріплений до поверхні наноцерію, діє шляхом координації між фосфатною групою ДНК та поверхнею НЧ, яка викликала повне гасіння флуоресценції **1.61** внаслідок процесу фотоперенесення електрону (PET). Було знайдено, що АТФ може витіснити адсорбовану ДНК з поверхні наноцерію, збільшуючи при цьому інтенсивність флуоресценції FAM-ДНК (Рис. 1.33). Діапазон виявлення АТФ знаходиться в межах від 0,1 нМ до 1,5 мкМ. Також даний метод може бути використаний для аналізу АТФ у крові та сечі.

Отже, комплексоутворення хемосенсорів з АТФ проявляється у наступних спектральних ефектах:

- посилення власної флуоресценції («вмикання» зонду), викликане зв'язуванням з АТФ;
- затіометричні зміни співвідношення двох смуг емісії або збудження флуоресценції на двох різних довжинах хвиль;
- зміна ефективності резонансного перенесення енергії збудження (FRET), що викликана структурними змінами частин рецептора АТФ і спричинені цим ратіометричні зміни флуоресценції.

Структура більшості флуоресцентних зондів для виявлення АТФ досить складна, та включає флуорофор, з'єднаний із рецептором АТФ. Щоб досягти максимальної спорідненості та селективності, рецептор АТФ, як правило, складається з декількох зв'язувальних одиниць, що забезпечують стекінг-взаємодії з аденіновим фрагментом, а також водневі зв'язки та електростатичні взаємодії з фосфатними групами аніона АТФ [98-101].

Серед проаналізованих показників, малі органічні люмінесцентні хемосенсиори мають переваги - універсальна продуктивність та швидка відповідь. Процес взаємодії між малими зондами та аналітами може включати координацію до катіона металу, водневі зв'язки, π - π стекінг та електростатичну взаємодію. У результаті такої взаємодії змінюються сигнали флуоресценції. На жаль, у більшості описаних методів детекції існують серйозні обмеження. Наприклад, деякі зонди не можуть працювати в фізіологічних умовах [52], а інші не можуть дати чіткий сигнал, або селективність не є ідеальною [46]. Всі ці недоліки обмежують практичне застосування в біологічних системах. Оскільки нуклеотиди та їх похідні мають вагомe значення для організмів, необхідно розробити працюючі зонди, які можуть бути застосовані для контролю біологічних подій, пов'язаних з нуклеотидами. Варто зазначити, що актуальним та перспективним завданням є розробка малих флуоресцентних зондів для детекції АТФ та інших нуклеозидфосфатів, що генерують чіткий сигнал у реальному часі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ДО РОЗДІЛУ 1

33. Gourine A. V., Llaudet E., Dale N., Spyer K. M. ATP Is a Mediator of Chemosensory Transduction in the Central Nervous System. *Nature*. **2005**, 436, 108–111.
34. Patel A., Malinovska L., Saha S., Wang J., Alberti S., Krishnan Y., Hyman A. A. Biochemistry: ATP as a Biological Hydrotrope. *Science*. **2017**, 356, 6339, 753–756.
35. Martinez-Manez R., Sancenon F., Fluorogenic and Chromogenic Chemosensors and Reagents for Anions. *Chemical Reviews*. **2003**, 103, 11, 4419–76.
36. Xu Z., Chen X., Kim H. Na., Yoon J. Sensors for the Optical Detection of Cyanide Ion. *Chemical Society Reviews*. **2010**, 39, 1, 127–37.
37. Anzenbacher P., Gale P. A. Supramolecular Chemistry of Anionic Species Themed Issue Chemical Society Reviews Anion Receptor Chemistry: Highlights from 2008 and 2009w. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 39, 3581–4008.
38. Kim S. K., Sessler J. L. Supramolecular Chemistry of Anionic Species Themed Issue Ion Pair Receptorsw. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 3784–3809.
39. Li A.-F., Wang J.-H., Wang F. Jiang Y.-B. Supramolecular Chemistry of Anionic Species Themed Issue The Uses of Supramolecular Chemistry in Synthetic Methodology Development Anion Complexation and Sensing Using Modified Urea and Thiourea-Based Receptors. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 39, 3581–4008.
40. Wu Y., Wen J., Li H., Sun S., Xu Y. Fluorescent Probes for Recognition of ATP. *Chinese Chemical Letters*. **2017**, 28, 10, 1916–24.
41. Dong J., Zhao M. In-Vivo Fluorescence Imaging of Adenosine 5'-Triphosphate. *Trends in Analytical Chemistry*. **2016**, 80, 190–203.
42. Chen X., Zhou Y., Peng X., Yoon J. Fluorescent and Colorimetric Probes for Detection of Thiols. *Chemical Society Reviews*. **2010**, 39, 6, 2120–35.

43. Hosseini M. W., Blacker A. J., Lehn J. M. Multiple Molecular Recognition and Catalysis. Nucleotide Binding and ATP Hydrolysis by a Receptor Molecule Bearing an Anion Binding Site, an Intercalator Group, and a Catalytic Site. *Journal of the Chemical Society. Chemical Communications*. **1988**, 6, 9, 596–598.
44. Abe H., Mawatari Y., Teraoka H., Fujimoto K., Inouye M. Synthesis and Molecular Recognition of Pyrenophanes with Polycationic or Amphiphilic Functionalities: Artificial Plate-Shaped Cavitant Incorporating Arenes and Nucleotides in Water. *Journal of Organic Chemistry*. **2004**, 69, 2, 495–504.
45. Xu Z., Singh N. J., Lim J., Pan J., Kim H. N., Park S., Kim K. S., Yoon J. Unique Sandwich Stacking of Pyrene-Adenine-Pyrene for Selective and Ratiometric Fluorescent Sensing of ATP at Physiological pH. *Journal of the American Chemical Society*. **2009**, 131, 42, 15528–33.
46. Wang D., Zhang X., Hea C. Duan C. Aminonaphthalimide-Based Imidazolium Podands for Turn-on Fluorescence Sensing of Nucleoside Polyphosphates. *Organic & Biomolecular Chemistry*. **2010**, 8, 13, 2923–25.
47. Atilgan S., Akkaya E. U. A Calixpyridinium-Pyranine Complex as a Selective Anion Sensing Assembly via the Indicator Displacement Strategy. *Tetrahedron Letters*. **2004**, 45, 9269–9271.
48. Neelakandan P. P., Hariharan M., Ramaiah D. Synthesis of a Novel Cyclic Donor-Acceptor Conjugate for Selective Recognition of ATP. *Organic Letters*. **2005**, 7, 26, 5765–68.
49. Zong G., Xian L., Lu G. L-Arginine Bearing an Anthrylmethyl Group: Fluorescent Molecular NAND Logic Gate with H⁺ and ATP as Inputs. *Tetrahedron Letters*. **2007**, 48, 22, 3891-3894.
50. Moreno-Corral R., Lara K. O. Complexation Studies of Nucleotides by Tetrandrine Derivatives Bearing Anthraquinone and Acridine Groups. *Supramolecular Chemistry*. **2008**, 20, 4, 427–35.

51. Kejík Z., Záruba K., Michalík D., Šebek J., Dian J., Pataridis S., Volka K., Král V. Optical Sensing System for ATP Using Porphyrin-Alkaloid Conjugates. *Chemical Communications*, **2006**, 1, 14, 1533–35.
52. Zhang P., Zhu M., Luo H., Zhang Q., Guo L., Li Z., Jiang Y.-B. Aggregation-Switching Strategy for Promoting Fluorescent Sensing of Biologically Relevant Species. A Simple Near-Infrared Cyanine Dye Highly Sensitive and Selective for ATP. *Analytical Chemistry*, **2017**, 89, 11, 6210–6215.
53. Bazzicalupi C., Biagini S., Bencini A., Faggi E., Giorgi C., Matera I., Valtancoli B. ATP Recognition and Sensing with a Phenanthroline-Containing Polyammonium Receptor. *Chemical Communications*. **2006**, 1, 4087–89.
54. Bazzicalupi C., Bencini A., Biagini S., Faggi E., Meini S., Giorgi C., Spepi A. Valtancoli B. Exploring the Binding Ability of Phenanthroline-Based Polyammonium Receptors for Anions: Hints for Design of Selective Chemosensors for Nucleotides. *Journal of Organic Chemistry*. **2009**, 74, 19, 7349–63.
55. Pivovarenko V. G., Vadzyuk O. B., Kosterin S. O. Fluorometric Detection of Adenosine Triphosphate with 3-Hydroxy-4-(Dimethylamino)flavone in Aqueous Solutions. *Journal of Fluorescence*. **2006**, 16, 1, 9–15.
56. Zyryanov G. V., Palacios M. A., Anzenbacher P. Rational Design of a Fluorescence-Turn-On Sensor Array for Phosphates in Blood Serum. *Angewandte Chemie - International Edition*. **2007**, 46, 41, 7849-52.
57. Wang H. Chan W.-H. A Cholic Acid-Based Fluorescent Chemosensor for the Detection of ATP. *Organic & Biomolecular Chemistry*. **2008**, 6, 1, 162–68.
58. Cheng D., Li Y., Wang J., Sun Y., Jin L., Lib C., Lu Y. Sensitive Fluorescent and Colorimetric Detection of ATP Based on a Strategy of Self-Promoting Aggregation of a Water-Soluble Polythiophene Derivative. *Chem. Commun.* **2015**, 51, 8544–46.

59. Sakamoto T., Ojida A., Hamachi I. Molecular Recognition, Fluorescence Sensing, and Biological Assay of Phosphate Anion Derivatives Using Artificial Zn(II)-Dpa Complexes. *Chemical Communications*. **2009**, 0, 141–52.
60. Ojida A., Mito-oka Y., Sada K., Hamachi I. Molecular Recognition and Fluorescence Sensing of Monophosphorylated Peptides in Aqueous Solution by Bis(zinc(II)-Dipicolylamine)-Based Artificial Receptors. *Journal of the American Chemical Society*. **2004**, 126, 8, 2454–63.
61. Yamaguchi S., Yoshimura I., Kohira T., Tamaru S., Hamachi I. Cooperation between Artificial Receptors and Supramolecular Hydrogels for Sensing and Discriminating Phosphate Derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, **2005**, 127, 33, 11835–41.
62. Ojida A., Miyahara Y., Wongkongkatep J., Tamaru S., Sada K., Hamachi I. Design of Dual-Emission Chemosensors for Ratiometric Detection of ATP Derivatives. *Chemistry - An Asian Journal*. **2006**, 1, 555–63.
63. Ojida A., Nonaka H., Miyahara Y., Tamaru S., Sada K., Hamachi I. Bis(Dpa-Zn II) Appended Xanthone: Excitation Ratiometric Chemosensor for Phosphate Anions. *Angewandte Chemie - International Edition*, **2006**, 45, 33, 5518–21.
64. Jose D. A., Mishra S., Ghosh A., Shrivastav A., Mishra S. K., Das A. Colorimetric Sensor for ATP in Aqueous Solution. *Organic Letters*. **2007**, 9, 10, 1979–82.
65. Kurishita Y., Kohira T., Ojida A., Hamachi I. Rational Design of FRET-Based Ratiometric Chemosensors for in Vitro and in Cell Fluorescence Analyses of Nucleoside Polyphosphates. *Journal of the American Chemical Society*. **2010**, 132, 38, 13290–99.
66. Jang H. H., Yi S., Kim M. H., Kim S., Lee N. H., Han M. S. A Simple Method for Improving the Optical Properties of a Dimetallic Coordination Fluorescent Chemosensor for Adenosine Triphosphate. *Tetrahedron Letters*. **2009**, 50, 46, 6241–43.

67. Huang X., Lu Y., He Y., Chen Z. A Metal-Macrocyclic Complex as a Fluorescent Sensor for Biological Phosphate Ions in Aqueous Solution. *European Journal of Organic Chemistry*. **2010**, 10, 1921–27.
68. Moro A. J., Cywinski P. J., Körstena S., Mohr G. J. An ATP Fluorescent Chemosensor Based on a Zn(II)-Complexed Dipicolylamine Receptor Coupled with a Naphthalimide Chromophore. *Chemical Communications*, **2010**, 46, 7, 1085–87.
69. Li S.-H., Yu C.-W., Yuan W.-T., Xu J.-G. A Lanthanide Hybrid Cluster as a Selective Optical Chemosensor for Phosphate-Containing Anions in Aqueous Solution. *Analytical Sciences*. **2004**, 20, 10, 1375–77.
70. Swamy K. M. K., Kwon S. K., Lee H. N., Kumar S. M. S., Kim J. S., Yoon J. Fluorescent Sensing of Pyrophosphate and ATP in 100% Aqueous Solution Using a Fluorescein Derivative and Mn²⁺. *Tetrahedron Letters*, **2007**, 48, 49, 8683–86.
71. Wu H., He C., Lin Z., Liu Y., Duan C. Metallohelical Triangles for Selective Detection of Adenosine Triphosphate in Aqueous Media. *Inorganic Chemistry Communications*. **2009**, 48, 2, 408–10.
72. Jung S. H., Kim K. Y., Lee J. H., Moon C. J., Han N. S., Park S.-J., Kang D., Song J. K., Lee S. S., Choi M. Y., Jaworski J., Jung J. H. Self-Assembled Tb³⁺ Complex Probe for Quantitative Analysis of ATP during Its Enzymatic Hydrolysis via Time-Resolved Luminescence in Vitro and in Vivo. *ACS Applied Materials and Interfaces*. **2016**, 9, 1, 722–729.
73. Berni E., Henaff L. L., Jarrige L., Girard E., Jonusauskas G., Gosse I., Pinet S. Functionalized Ruthenium Complexes: Selective “Turn-on” Detection of Biologically Relevant Anionic Species. *European Journal of Organic Chemistry*. **2017**, 25, 3620–3630.
74. Li C., Numata M., Takeuchi M., Shinkai S. A Sensitive Colorimetric and Fluorescent Probe Based on a Polythiophene Derivative for the Detection of ATP. *Angewandte Chemie - International Edition*. **2005**, 44, 39, 6371–74.

75. Yao Z., Feng X., Hong W., Li C., Shi G. A Simple Approach for the Discrimination of Nucleotides Based on a Water-Soluble Polythiophene Derivative. *Chemical Communications*. **2009**, 405, 4696–98.
76. An L., Tang Y., Feng F., Hea F., Wang S. Water-Soluble Conjugated Polymers for Continuous and Sensitive Fluorescence Assays for Phosphatase and Peptidase. *Journal of Materials Chemistry*. **2007**, 17, 4147–52.
77. Descalzo A. B., Marcos M. D., Martínez-Máñez R., Soto J., Beltrán D., Amorós P. Anthrylmethylamine Functionalised Mesoporous Silica-Based Materials as Hybrid Fluorescent Chemosensors for ATP. *Journal of Materials Chemistry*. **2005**, 15, 2721–31.
78. Aucejo R., Alarcón J., Soriano C., Guillem M. C., García-España E., Torres F. New Sensing Devices Part 1□: Indole-Containing Polyamines Supported in Nanosized Boehmite Particles. *Journal of Materials Chemistry*. **2005**, 15, 2920–27.
79. Kanekiyo Y., Naganawa R., Tao H. Fluorescence Detection of ATP Based on the ATP-Mediated Aggregation of Pyrene-Appended Boronic Acid on a Polycation. *Chemical Communications*, **2004**, 0, 1006–7.
80. Huang B.-H., Geng Z.-R., Ma X.-Y., Zhang C., Zhang Z.-Y., Wang Z.-L. Lysosomal ATP Imaging in Living Cells by a Water-Soluble Cationic Polythiophene Derivative. *Biosensors and Bioelectronic*. **2016**, 83, 213–20.
81. Huang B., Geng Z., Yan S., Li Z., Cai J., Wang Z. Water-Soluble Conjugated Polymer as a Fluorescent Probe for Monitoring ATP Level Fluctuation in Cell Membranes during Cell Apoptosis and in Vivo Water-Soluble Conjugated Polymer as a Fluorescent Probe for Monitoring ATP Level Fluctuation in Cell Membranes. *Analytical Chemistry*. **2017**, 89, 17, 8816–8821.
82. An N., Zhang Q., Wang J., Liu C., Shi L., Liu L., Denga L., Lu Yan. A New FERT-Based Ratiometric Probe for Fluorescent and Colorimetric Analyses of Adenosine 5'-triphosphate. *Polymer Chemistry*. **2017**, 8, 1138–45.

83. Zhao Q., Zhang Z., Tang Y. A New Conjugated Polymers-Based Combination Probe for ATP Detection Using Multisite-Binding and FRET Strategy. *Chemical Communications*. **2017**, 53, 9414–17.
84. Butterfield S. M., Waters M. L. A Designed Beta-Hairpin Peptide for Molecular Recognition of ATP in Water. *Journal of the American Chemical Society*. **2003**, 125, 9580–81.
85. Jhaveri S. D., Kirby R., Conrad R., Maglott E. J., Bowser M., Kennedy R. T., Glick G., Ellington A. D. Designed Signaling Aptamers That Transduce Molecular Recognition to Changes in Fluorescence Intensity. *Journal of the American Chemical Society*. **2000**, 122, 11, 2469–73.
86. Sancenón F., Descalzo A. B., Martínez-Máñez R., Miranda M. A., Soto J. A Colorimetric ATP Sensor Based on 1,3,5-Triarylpen-2-En-1,5-Diones. *Angewandte Chemie - International Edition*. **2001**, 40, 14, 2640–43.
87. Ma C., Chen H., Han R., He H., Zeng W. Fluorescence Detection of Adenosine Triphosphate Using Smart Probe. *Analytical Biochemistry*. **2012**, 429, 1, 8–10.
88. Zeng X., Zhang X., Yang W., Jia H., Li Y. Fluorescence Detection of Adenosine Triphosphate through an Aptamer – Molecular Beacon Multiple Probe. *Analytical Biochemistry*. **2012**, 424, 1, 8–11.
89. Li F., Du Z., Yang L., Tang B. Selective and Sensitive Turn-on Detection of Adenosine Triphosphate and Thrombin Based on Bifunctional Fluorescent Oligonucleotide Probe. *Biosensors and Bioelectronic*. **2013**, 41, 907–10.
90. Bogomolova A., Aldissi M. Real-Time Aptamer Quantum Dot Fluorescent Flow Sensor. *Biosensors and Bioelectronics*. **2011**, 26, 10, 4099–4103.
91. Wang Y., Zheng J., Zhang Z., Yuan C., Fu D. CdTe Nanocrystals as Luminescent Probes for Detecting ATP, Folic Acid and L-Cysteine in Aqueous Solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **2009**, 342, 1–3, 102–6.

92. Hong J., Pei D., Guo X. Quantum Dot-Eu³⁺ conjugate as a Luminescence Turn-on Sensor for Ultrasensitive Detection of Nucleoside Triphosphates. *Talanta*. **2012**, 99, 939–43.
93. Callan J. F., Mulrooney R. C., Kamila S. Luminescent Detection of ATP in Aqueous Solution Using Positively Charged CdSe-ZnS Quantum Dots. *Journal of Fluorescence*. **2008**, 18, 6, 1157–61.
94. Li P.-H., Lin J.-Y., Chen C.-T., Ciou W.-R., Chan P.-H., Luo L., Hsu H.-Y., Diau E. W.-G., Chen Y.-C. Using Gold Nanoclusters as Selective Luminescent Probes for Phosphate-Containing Metabolites. *Analytical Chemistry*. **2012**, 84, 13, 5484–88.
95. Thesana W., Tuntulani T., Ngeontae W. A Highly Selective Turn-on ATP Fluorescence Sensor Based on Unmodified Cysteamine Capped CdS Quantum Dots. *Analytica Chimica Acta*. **2013**, 783, 65–73.
96. Shi F., Li Y., Lin Z., Ma D., Su X. A Novel Fluorescent Probe for Adenosine 5'-Triphosphate Detection Based on Zn²⁺-Modulated L-Cysteine Capped CdTe Quantum Dots. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2015**, 220, 433–40.
97. Li F., Hu X., Wang F., Zheng B., Du J., Xiao D. A Fluorescent “on-off-on” Probe for Sensitive Detection of ATP Based on ATP Displacing DNA from Nanoceria. *Talanta*. **2017**, 179, 285–91.
98. Imamura H., Nhat K. P. H., Togawa H., Saito K., Iino R., Kato-Yamada Y., Nagai T., Noji H. Visualization of ATP Levels inside Single Living Cells with Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Genetically Encoded Indicators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2009**, 106, 37, 15651–56.
99. Tang J.-L., Li C.-Y., Li Y.-F., Zou C.-X. A Ratiometric Fluorescent Probe with Unexpected High Selectivity for ATP and Its Application in Cell Imaging. *Chemical Communications*, **2014**, 50, 97, 15411–14.

100. Wang J., Liu X., Pang Y. A Benzothiazole-Based Sensor for Pyrophosphate (PPi) and ATP: Mechanistic Insight for Anion-Induced ESIPT Turn-On. *Journal of Materials Chemistry B*. **2014**, 2, 38, 6634–38.
101. Yushchenko D. A., Vadzyuk O. B., Kosterin S. O., Duportail G., Mély Y., Pivovarenko V. G. Sensing of Adenosine-5'-Triphosphate Anion in Aqueous Solutions and Mitochondria by a Fluorescent 3-Hydroxyflavone Dye. *Analytical Biochemistry*. **2007**, 369, 2, 218–25.

РОЗДІЛ 2

СКРИНІНГ ХРОМОНІВ ТА ХІНОЛОНІВ ДЛЯ ВИМІРЮВАННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТУ В ШИРОКОМУ ДІАПАЗОНІ

На початок нашого дослідження було відомо лише один флуоресцентний зонд з класу 3-гідроксифлавонів, що давав флуоресцентну відповідь при зв'язуванні з АТФ у водному розчині. Метою даної частини роботи є вивчення взаємозв'язку структура-ефективність у визначенні АТФ для серії 33 флуоресцентних барвників класів 3-гідроксифлавонів, бісфлавонолів та 3-гідроксихінолонів (Рис. 2.1). Сполуки відрізняються за їх планарністю, величиною та кількістю ароматичних кілець, полярністю і зарядом, а також електронною густиною на їх хромоновій частині. Для вибору найкращого сенсора АТФ ми проаналізували їх флуоресцентну відповідь та чутливість до АТФ, концентраційний діапазон детекції АТФ та стехіометричні характеристики комплексів.

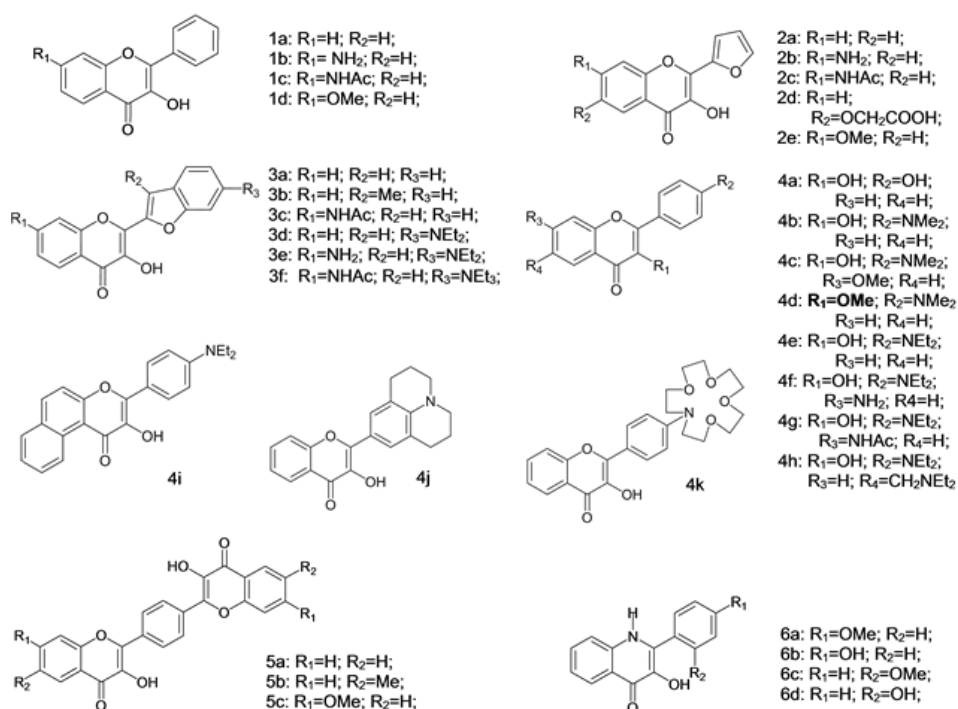
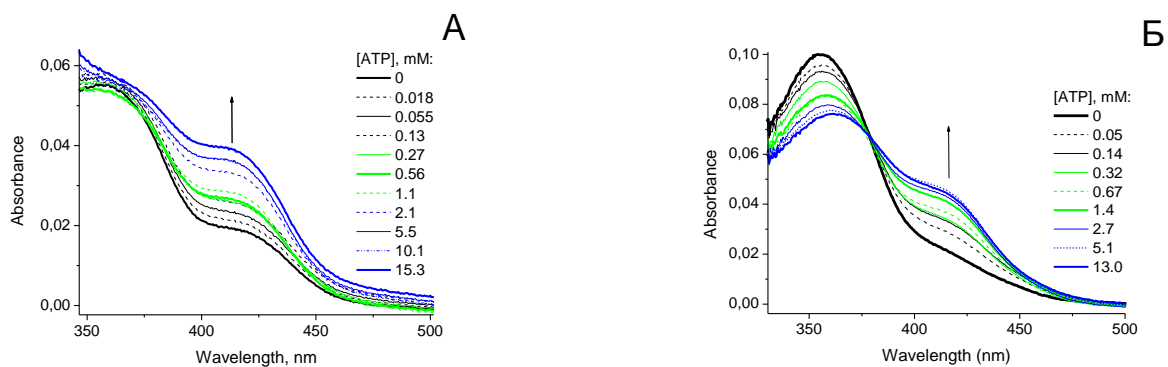


Рис. 2.1. Структури вивчених барвників.

2.1. Спектри поглинання

Досліджені барвники показують дві послідовні зміни у своїх спектрах поглинання при підвищенні концентрації АТФ. Подібно до барвника **4b** [101], вони демонструють гіпохромізм на перших кроках титрування, після чого при більш високих концентраціях АТФ з'являється нова смуга. (Рис. 2.2 Б – Г). Амплітуда цих змін різна для різних барвників. Як можна було очікувати, менш поляризовані барвники без донорних груп у боковому циклі (**1a-d**, **2a-e**, **3a-c**) демонструють зміни з низькою амплітудою або навіть відсутність гіпохромізму (Рис. 2.2 А і Рис. 2.3). На відміну від них, барвники з донорною групою (гідроксильною або діалкіламіно-) у спектрах поглинання демонструють як гіпохромізм, так і нову смугу (**4a-k**, Рис. 2.2 Б, Г) або переважно гіпохромізм (**4j**, Рис. 2.2 В). Ізобестична точка, яка присутня в більшості титрувань свідчить про рівновагу вільного барвника лише з одним продуктом реакції, ймовірно, комплексом барвник-АТФ зі стехіометрією 1:1. Ця стехіометрія підтверджується відповідними апроксимаціями кривих титрування за рівнянням (1), припускаючи, що $n = 1$ (Табл. 2.1, Рис. 2.2 Д). Отримані значення констант стійкості (K) досліджених барвників до АТФ показують, що їх значення залежать від структури барвника і перебувають у межах від 0,3 до $3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$.



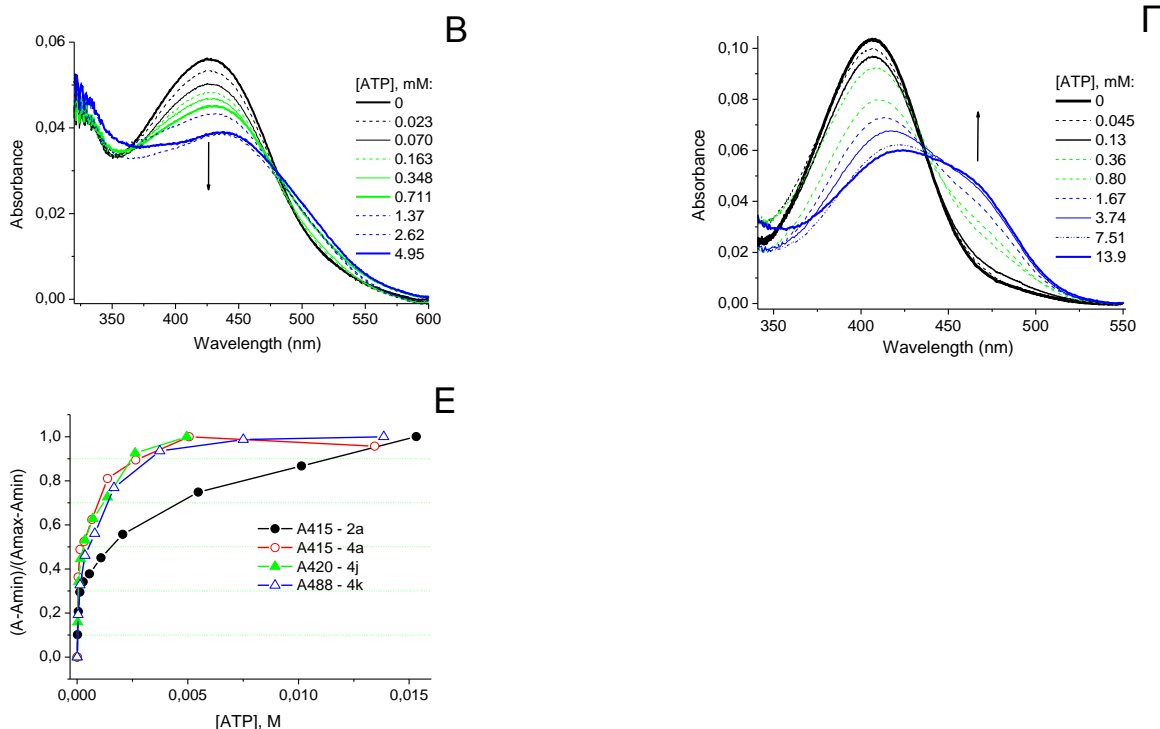


Рис. 2.2. Типові набори титрування досліджуваних барвників АТФ, що контролюються абсорбційною спектроскопією. Титрування проводили з барвниками **2a** (А), **4a** (Б), **4j** (В) та **4к** (Г). Зростання (для барвників **2a**, **4a**, **4к**) або зменшення поглинання (для **4j**) на окремій довжині хвилі порівняно з концентрацією АТФ (Д). Суцільні лінії описують відповідність експериментальних даних рівнянню (1).

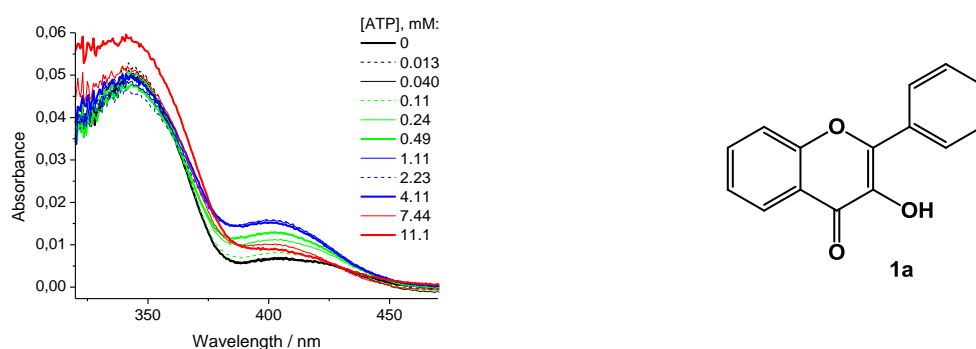


Рис. 2.3. Спектри поглинання барвника **1a** при різних концентраціях АТФ в ТРИС буфері, рН 7.4.

Таблиця 2.1.

Константи стабільності К, положення максимумів поглинання та флуоресценції та Стоксів зсув комплексів декількох барвників з АТФ.

Барвник	Концентрація барвника ($\times 10^{-6}$ М)	$K^{[a]}$ (10^3 М $^{-1}$)	λ_{abs} (нм)	λ_{fb} (нм)	ΔS (см $^{-1}$)
1a	2.5	2.7 \pm 0.7	401	453	2860
2a	2.5	0.35 \pm 0.1	410	464	2840
4a	2.5	0.90 \pm 0.2	412	471	3130
4b	3.0	2.2 \pm 0.4	448	557	4340
4e	3.0	0.30 \pm 0.06	450	550	4040
4k	3.5	1.3 \pm 0.4	437	593	5410

[a] Константи стійкості були отримані за допомогою апроксимації кривих титрування вивчених барвників з АТФ на Рис. 2.2 Д та Таблиця 2.2 до рівняння (1), використовуючи $n = 1$.

Таблиця 2.2.

Флуоресцентні характеристики досліджуваних барвників та їх комплексів з АТФ.

Барвник	λ_{exc}	λ_{excATP}	$\Delta\nu$, см $^{-1}$	λ_{emDye}	λ_{emATP}	ΔS_{ATP}	I_{ATP}/I_D
	1	2	3	4	5	6	7
1 1a	345	397	3800	408; 508	453	3113	13
2 1b	363	402	2700	511	478	3955	2.0
3 1c	354	401	3300	418; 520	464	3385	37
4 1d	351	390	2900	412; 509	454	3614	51
5 2a	364	415	3400	427; 503	464	2544	28
6 2b	373	428	3400	534	484	2703	53
7 2c	369	426	3600	434; 520	474	2377	18
8 2d	361	415	3600	432; 508	470	2819	9.1
9 2e	365	408	2900	426; 508	463	2911	16
10 3a	370	430	3800	444; 512	477	2291	7.8
11 3b	365	427	4000	457	457	1537	1.7
12 3c	377	442	3900	453; 536	491	2257	12

13 3d	450	450	0	612	605	5882	2.0
14 3e	438	460	1100	620	608	5515	3.0
15 3f	456	457	0	641	614	6281	2.6
16 4a	359	408	3300	446	471	3278	13
17 4b	416	471	2800	552	557	3278	8.2
18 4c	417	451	1800	540	551	4024	10
19 4d	395	421	1600	538	539	5200	14
20 4e	426	480	2600	520	550	2651	19
21 4f	404	460	3000	543	556	3753	5.9
22 4g	427	472	2200	564	574	3764	13
23 4h	447	487	1800	568	573	2990	4.2
24 4i	408	408	0	520; 572	565	6810	4.4
25 4j	422	462	2000	581	585	4551	3.6
26 4k	402	462	3200	536	552	3529	9.3
27 5a	352	407	3800	422; 525	460	2830	2.8
28 5b	350	401	3600	439; 514	461	3245	9.9
29 5c	330	403	5500	432; 520	461	3121	11
30 6a	360	376	1200	422; 488	446	4174	4.2
31 6b	357	375	1300	412; 484	444	4144	3.1
32 6c	352	368	1200	418; 489	452	5050	3.9
33 6d	354	371	1300	420; 485	450	5024	3.0

1 - Положення максимуму збудження вільного барвника; **2** - положені максимуму збудження комплексу барвник:АТФ; **3** - зсув максимуму збуджені комплексу барвник:АТФ; **4** - положення максимуму емісії вільного барвника; **5** положення максимуму емісії комплексу барвник:АТФ; **6** - Стоксів зсув еміс комплексу барвник:АТФ; **7** - співвідношення піків інтенсивностей еміс комплексу барвник:АТФ та вільного барвника.

2.2. Спектри збудження та флуоресценції сполук

АТФ як чотиризарядний аніон, може створювати потужний вплив на молекули оточення через своє електростатичне поле. Крім того, АТФ здатен утворювати водневі зв'язки (ВЗ) з оточенням, оскільки має як групи-донори і групи-акцептори ВЗ у своєму складі. 3-Гідроксихромони та 3-гідроксихінолони вже добре відомі своєю спектральною чутливістю до всіх зазначених факторів, а саме до електричних полів [102, 103], до донорів ВЗ [102], включаючи воду [104, 105], та до акцепторів ВЗ [106], тож очікувалось, що комплексоутворення з АТФ також забезпечить суттєві зміни їх флуоресценції.

Оскільки ефекти в спектрах збудження випробовуваних барвників виявились більш виразними та однорідними, спочатку зупинимось на їх аналізі.

Значне зростання інтенсивності флуоресценції при збільшенні концентрації АТФ є загальним явищем для всіх вивчених барвників (Рис. 2.4). Воно було очікуваним, тому що сильне гасіння флуоресценції вільних флавонолів у воді – це відоме явище [107]. Загалом, при зв'язуванні з АТФ інтенсивність флуоресценції досліджуваних барвників збільшується у 30-50 разів (Табл. 2.2). Такий сильний ефект свідчить про суттєве зменшення локальної концентрації води в сольватній сфері флуорофора та імовірно збільшення жорсткості оточення барвника. Одночасно з гіпохромізмом, що спостерігається в спектрах поглинання, всі ці особливості дозволяють припустити, що стекінг між барвником та аденіновим фрагментом АТФ відіграє важливу роль у формуванні комплексу [101].

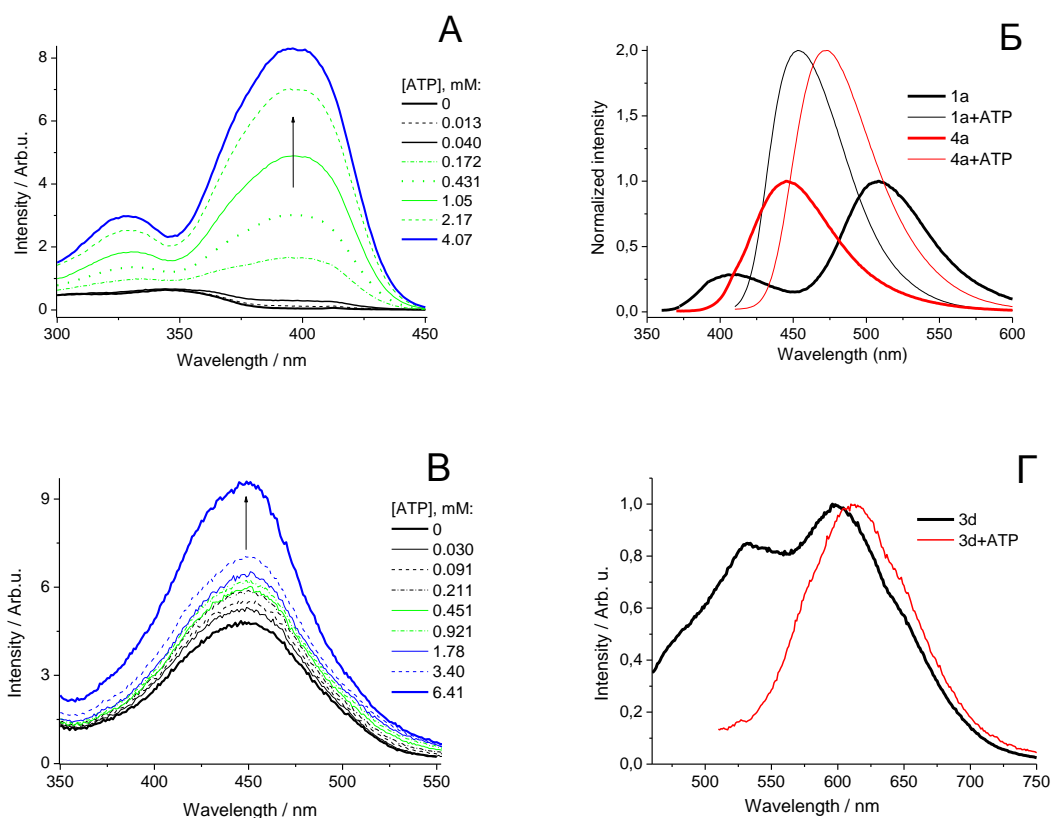


Рис. 2.4. Типові зміни в спектрах збудження вивчених барвників (показані для барвника **1a**) при збільшенні концентрації АТФ (А). $\lambda_{em} = 460$ нм. Типовий вигляд спектрів випромінювання досліджуваних барвників за відсутності та наявності АТФ (Б). Для **1a**: $\lambda_{ex} = 360$ нм (вільний барвник) і 400 нм у присутності АТФ ($C_{ATP} = 4$ ммоль). Для **4a**: $\lambda_{ex} = 360$ нм (вільний барвник) і 415 нм ($C_{ATP} = 7$ ммоль). Окремий випадок: спектри збудження **3d** при збільшенні концентрації АТФ (В). $\lambda_{em} = 600$ нм. Нормалізовані спектри флуоресценції **3d** (Г). $\lambda_{ex} = 450$ нм для вільного барвника та 488 нм для зв'язаного з АТФ ($C_{ATP} = 6,4$ мМ).

Цікаво, що для переважної більшості барвників зв'язування з АТФ веде до появи в спектрі збудження нової смуги, сильно зміщеної в червону ділянку спектру (на 40-70 нм або $3000-6000$ cm^{-1} , Рис. 2.4 А, Таблиця 2.2). Такий сильний червоний зсув ніколи не спостерігався для вивчених барвників серій 1–6, окрім випадку комплексу з АТФ [55, 102]. Цей зсув було пояснено електрохромним ефектом зарядженої частини АТФ [101]. Отже встановлений спектральний ефект створює унікальну можливість селективного збудження комплексу барвник-АТФ у присутності вільного барвника. Варто зазначити, що комплекси барвник-АТФ, які забезпечують

найбільш інтенсивну смугу в спектрах збудження, з'являються лише як плече у спектрах поглинання. Ця різниця між спектрами поглинання та збудження відображає велику різницю квантових виходів флуоресценції між різними популяціями комплексу барвник-АТФ.

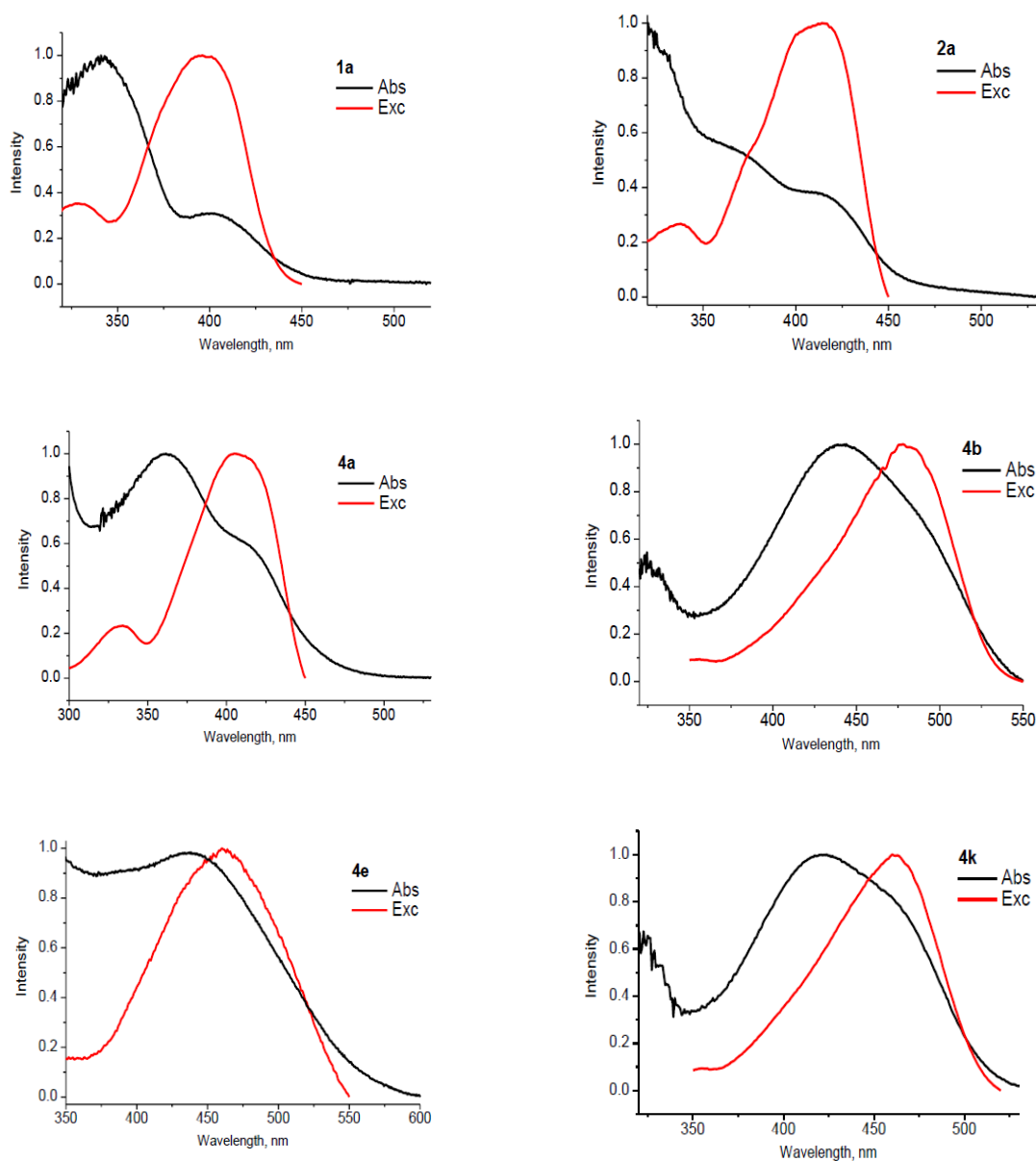


Рис. 2.5. Нормалізовані спектри поглинання (чорний) та збудження флуоресценції (червоний) АТФ комплексів барвників **1a**, **2a**, **4a**, **4b**, **4e** та **4k**, що отриманні за насичених концентрацій АТФ (~ 6 мМ).

Оскільки АТФ існує в клітинах у вигляді комплексу з катіоном Mg^{2+} , важливо було перевірити, чи дозволяють наші зонди виявляти АТФ за наявності фізіологічних концентрацій Mg^{2+} та за високої іонної сили. З цією

метою ми повторили титрування барвника **4b** АТФ у присутності 5 мМ Mg^{2+} і 150 мМ NaCl. Одержані спектри (Рис. 2.6. **а**) за положенням максимумів та ходом змін дуже схожі з результатами, отриманими у відсутності Mg^{2+} та NaCl (Рис. 2.6. **б**). Отже, спектральні зміни, як і самі криві титрування (Рис. 2.6. **в**) вказують на те, що іонна сила середовища та фізіологічні концентрації катіонів Mg^{2+} чинять незначний вплив на зв'язування барвника **4b** з АТФ.

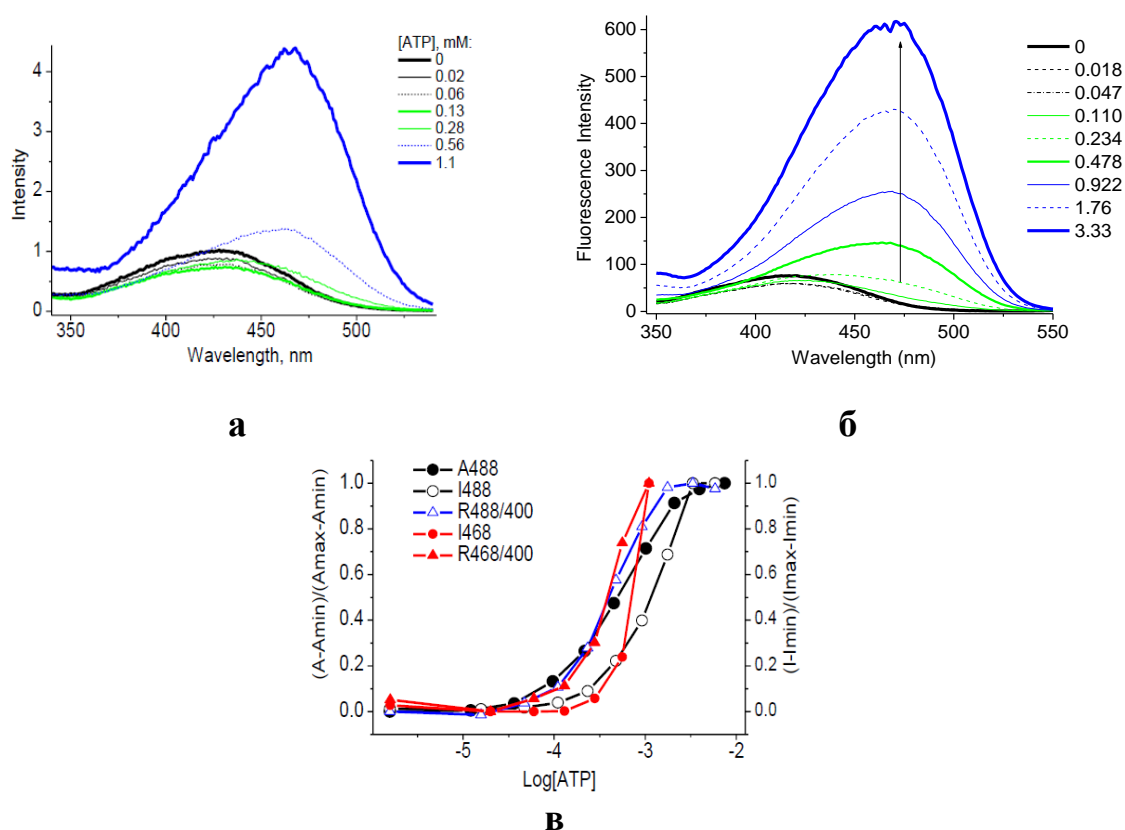


Рис. 2.6. **а** – Спектр збудження флуоресценції барвника **4b** при різних концентраціях АТФ в ТРИС-буфері, рН 7.4 у присутності 5 мМ $MgCl_2$ та 150 мМ NaCl. $\lambda_{em} = 550$ нм. **б** – Спектр збудження флуоресценції барвника **4b** при різних концентраціях АТФ в ТРИС-буфері, рН 7.4. $\lambda_{em} = 550$ нм. **в** – Залежність поглинання A_{488} , інтенсивності флуоресценції ($\lambda_{ex} = 488$ нм, $\lambda_{em} = 550$ нм) та співвідношення інтенсивності флуоресценції від логарифму концентрації АТФ для барвника **4b**. Червона крива представлена на малюнку **а** (отримана в 5 мМ $MgCl_2$ і 150 мМ NaCl).

Слід зауважити, що декілька барвників, які мають додаткове бензенове кільце або метильовану 3-ОН-групу (**3d**, **f**, **4d**, **i**), не генерують нову смугу в спектрі збудження за присутності АТФ. Для них зафіксовано

лише збільшення інтенсивності флуоресценції (Рис. 2.4 В), що є очевидним наслідком виключення води з сольватної оболонки барвника. Для цих барвників відсутність електрохромного ефекту свідчить про те, що флуорофорна частина барвника у комплексі перебуває далеко від зарядженої трифосфатної групи АТФ.

Для переважної більшості досліджених барвників у водному розчині відбувається внутрішньомолекулярне перенесення протону в збудженому стані (*англ.* excited state intramolecular proton transfer, ESIPT), про що свідчать дві смуги в їх спектрах флуоресценції. Ці смуги відповідають емісії початкової збудженої нормальної N* форми та утвореної таутомерної T* форми барвника [102-107]. У неполярних середовищах швидкість реакції ESIPT висока, а отже T* смуга домінує в спектрі. Хоча вода зазвичай пригнічує ESIPT [107], смуга T* спостерігається в спектрах 20-ти барвників серії 1–6, часто як основний компонент спектру випромінювання (**1a, e, d 2b, c, 3e, 4j, 5a-c, 6e-d**). У комплексах з АТФ дві смуги зливаються в одну, розташовану між смугами вільного зонду (Рис. 2.4. Б, Г). Оскільки сильні електричні поля гальмують ESIPT [108] або сприяють дисоціації ОН-групи [101], можна припустити, що в комплексі з АТФ барвники існують або в нормальній N*, або в аніонній формі A*.

2.3. Робочі діапазони концентрації АТФ зондів

Далі було побудовано залежності відносного збільшення інтенсивності флуоресценції та співвідношення інтенсивностей на двох аналітичних довжинах хвиль у спектрі збудження від логарифму концентрації АТФ і порівняно отримані криві з відносними змінами спектрів поглинання (Рис. 2.7). Всі три типи кривих збігаються досить добре, проте крива зміни інтенсивності флуоресценції є зміщеною в сторону більш високих концентрацій АТФ у всіх випадках. Разом із зафіксованим розмиттям ізобестичних точок при високих концентраціях АТФ у спектрофотометричних титруваннях (Рис. 2.2 Б-Г) цей зсув може бути

результатом утворення комплексу барвник-АТФ із стехіометрією 1:2, що має сильнішу флуоресценцію, як це було описано раніше [101] для сполуки **4b**. Утворення комплексу з сильнішою флуоресценцією також може пояснити різницю у формі та положенні спектрів поглинання та збудження при високих концентраціях АТФ.

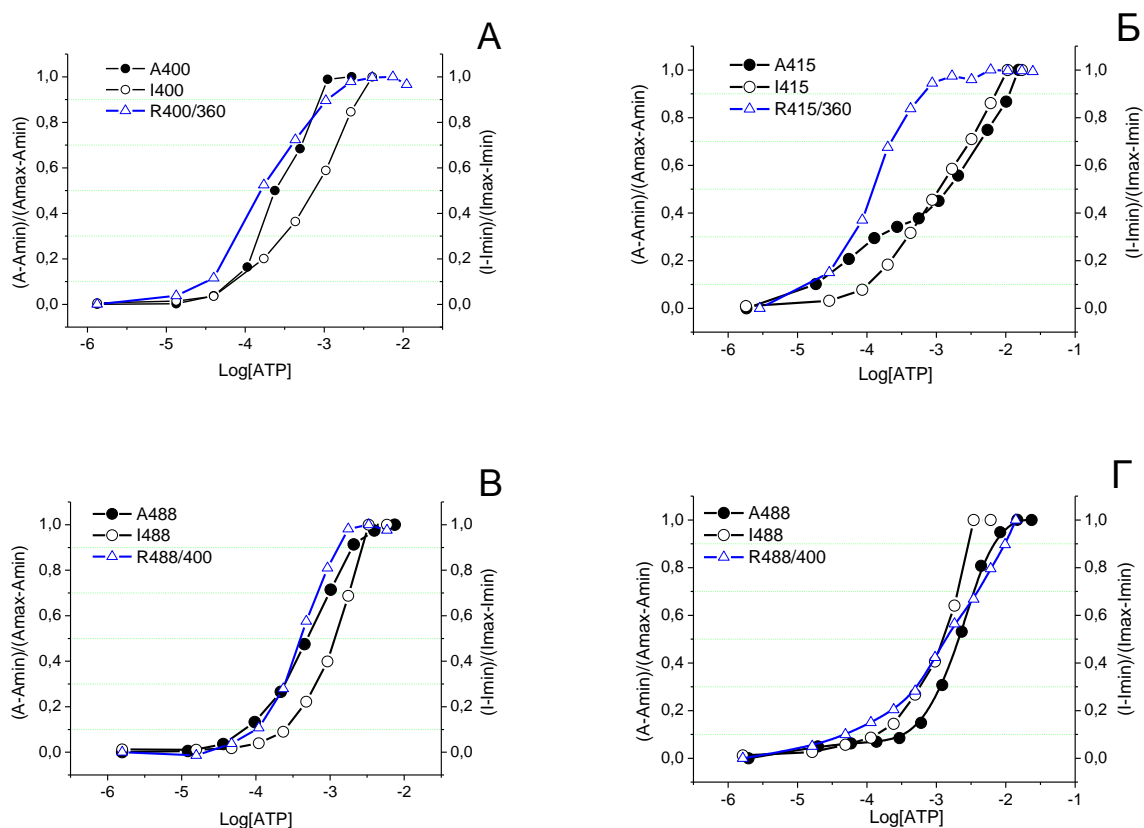


Рис. 2.7. Залежності оптичної густини А (●), інтенсивності флуоресценції І (○) та співвідношення інтенсивностей флуоресценції R (Δ) від логарифму концентрації АТФ для барвників **1a** (А), **2a** (Б), **4b** (В) та **4e** (Г) Довжина хвилі реєстрації вказана на графіках. $\lambda_{\text{Em}} = 460$ нм для **1a**, 470 нм для **2a**, 550 нм для **4b** та **4e**.

Отже, одержані ефекти в спектрах збудження та випромінювання дозволяють вимірювати концентрацію АТФ у розчинах за зростанням інтенсивності флуоресценції або за співвідношенням інтенсивностей флуоресценції на двох довжинах хвиль у режимі збудження або емісії. Для

інтенсометричних вимірювань найменші за розмірами барвники з серії **1a-d** та **2a-e** є найкращими кандидатами, оскільки вони демонструють найвище (20-55 разів) збільшення інтенсивності флуоресценції, що, таким чином, демонструє їх найвищу чутливість до АТФ (Рис. 2.4 А, Таблиця 2.2). Більшість інших барвників підходять для ратіометричного визначення АТФ, маючи велику (до 5500 см^{-1}) різницю у положеннях смуг збудження вільного та зв'язаного барвника (Таблиця 2.2).

Діапазони концентрацій АТФ, що виявляють зонди, оцінювалися в інтенсометричних та ратіометричних підходах за АТФ-індукованими змінами спектрів збудження флуоресценції (Рис. 2.7, Таблиця 2.2). Діапазони концентрацій визначали шляхом фіксації концентрацій АТФ, що давали від 2 до 98% змін інтенсивності флуоресценції або співвідношення інтенсивності зв'язаного до вільного зонда $I_{\text{АТФ}}/I_{\text{В}}$. Таким чином, інтенсометричний режим дає діапазон виявлення АТФ в межах 10^{-6} - 10^2 М. Це є зручним діапазоном для вимірювання рівнів АТФ у клітинах, де середня концентрація становить 2,5 мМ для нормальних клітин і 3,1 мМ для пухлинних клітин відповідно [7]. Виявлення нижчих концентрацій АТФ (4-6 мкМ) можливе з барвниками **2b**, **c**, **e**, **3f**, **4c**, **f**, **g**, і **5b**, тоді як більшість опублікованих флуоресцентних зондів демонструють на один порядок (0,2-0,5 мкМ) кращу чутливість і можуть використовуватися лише для виявлення більш низьких концентрацій АТФ (Таблиця 2.2, [109-113]). Найвищі концентрації АТФ можна виміряти за допомогою барвника **4d** (57000 мкМ, Рис. 2.8) та барвників **2a**, **3b**, **5b** (10000 мкМ). Діапазони концентрацій АТФ, які можна виміряти за допомогою цих барвників, добре узгоджуються з відомими концентраціями АТФ у клітинах [109, 114], тоді як найкращі опубліковані флуоресцентні зонди мають верхню межу детекції лише 250 мкМ [115] і відповідають найнижчому концентраційному діапазону АТФ у клітинах. Загалом, найширший діапазон виявлення АТФ мають барвники **2c**, **e**, **3f**, **4f**, **g**, **i**, **5b**, де він перевищує 3 порядки.

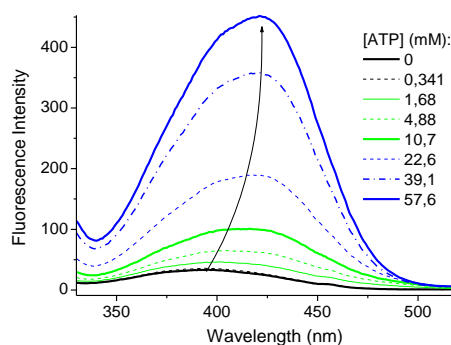


Рис. 2.8. Спектри збудження флуоресценції барвника **4d** при різних концентраціях АТФ в ТРИС-буфері, рН 7.4. $\lambda_{em} = 550$ нм.

Діапазон виявлення у ратіометричному режимі зміщується в 2-10 разів до нижчих концентрацій АТФ, що дозволяє визначати концентрації АТФ в діапазоні 1 – 5000 мкМ. Барвник **2b** відображає найширший діапазон (4 – 5000 мкМ) виявлення АТФ ратіометричним методом. Наші серії сполук дозволяють кількісно визначати АТФ від 10^{-6} до $5,7 \cdot 10^{-2}$ М, що охоплює концентрації АТФ у живих клітинах [116]. Зазначимо, що для вивчених барвників визначення АТФ можливе в межах 3-х порядків діапазону концентрацій, що набагато ширше, ніж для кращих опублікованих зондів [109–113], де діапазон концентрацій АТФ охоплює 2 порядки. Таке розширення діапазону концентрацій може бути пов'язане з утворенням двох послідовних комплексів з АТФ.

2.4. Чутливість барвників до АТФ за амплітудою відповіді

Щоб оцінити чутливість барвників до АТФ, ми визначили амплітуду їх флуоресцентної відповіді $S(I)$, яка була розрахована за формулою:

$$S(I) = \Delta I / (\text{Log}C_{\max} - \text{Log}C_{\min}),$$

де $\Delta I = (I_{\max} - I_{\min}) / I_{\min}$ є нормованим збільшенням інтенсивності флуоресценції, I_{\max} , I_{\min} , C_{\max} та C_{\min} – максимальна та мінімальна інтенсивність флуоресценції та верхня і нижня межі виявлення АТФ в

інтенсометричному режимі відповідно. У ратіометричному режимі амплітуду флуоресцентної відповіді $S(R)$ обчислювали аналогічним чином.

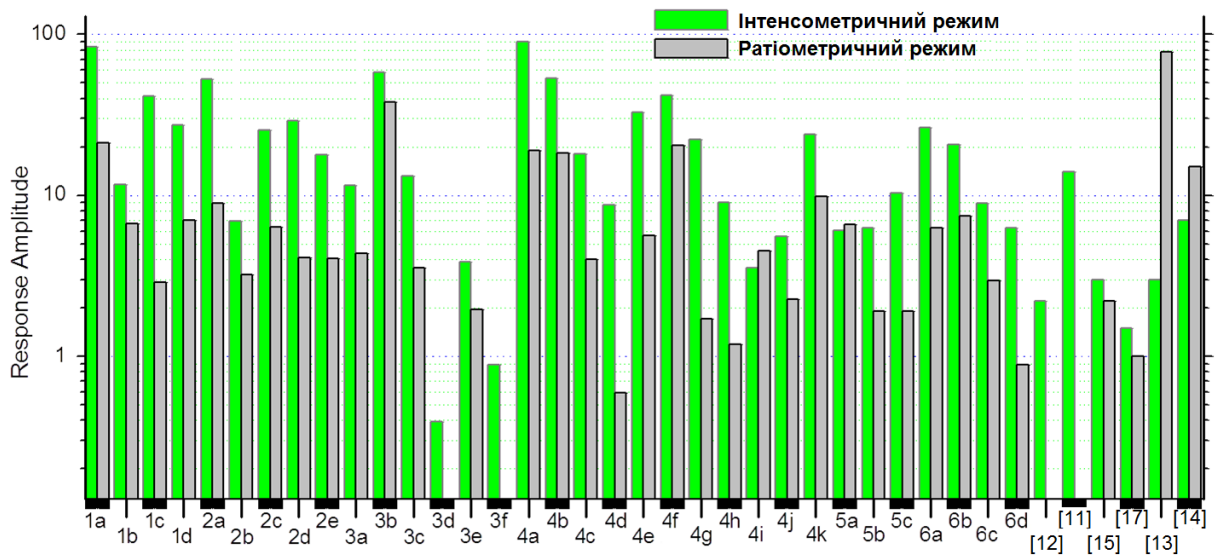


Рис. 2.9. Чутливість барвників до АТФ у інтенсометричному режимі (зелений) та за співвідношенням інтенсивностей флуоресценції (сірий). У квадратних дужках позначені посилання на раніше відомі АТФ зонди (див. також Таблицю 2.2).

Більшість барвників демонструють високу амплітуду відповіді на АТФ (Рис. 2.9, Таблиця 2.2), яка досягає декількох порядків інтенсивності флуоресценції або співвідношення інтенсивностей флуоресценції при збільшенні концентрації АТФ у десять разів. У багатьох випадках вона перевищує амплітуду відповіді найбільш відомих зондів [109-110]. З огляду на набагато менший розмір і значно ширший діапазон детекції у порівнянні з найбільш відомими зондами, наші зонди показують себе як удосконалені універсальні інструменти для вимірювання АТФ у розчинах.

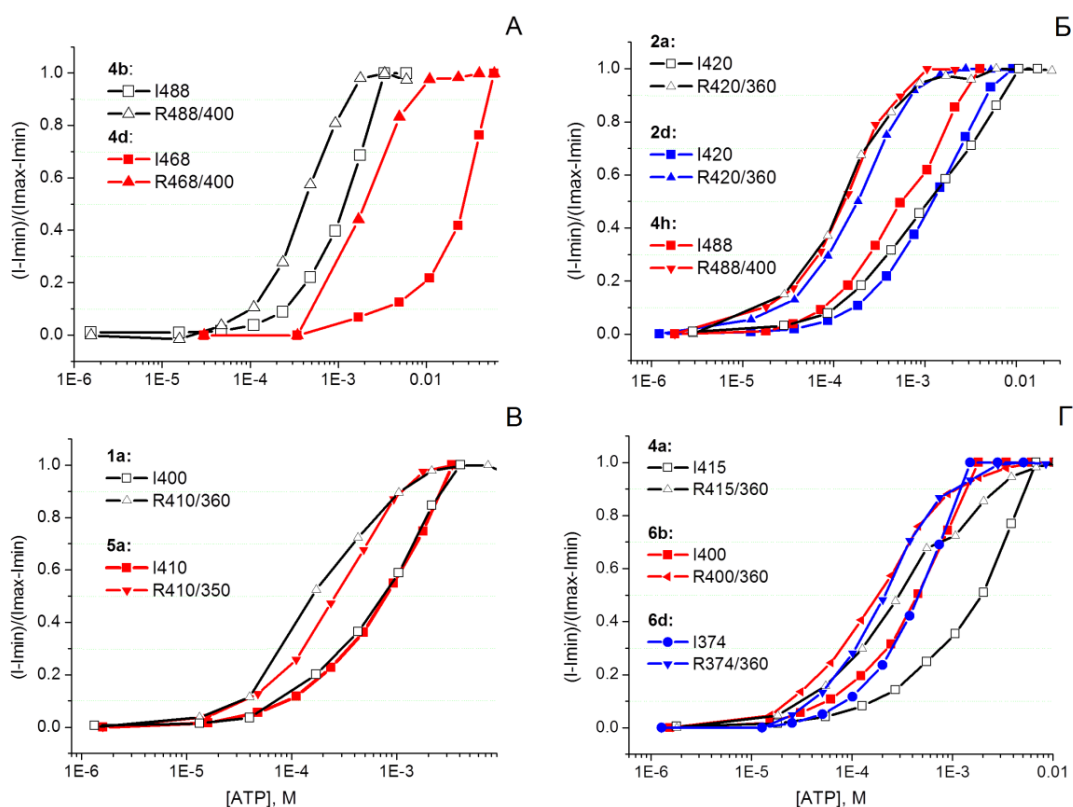


Рис. 2.10. Порівняльна відповідь різних барвників на АТФ в інтенсометричних (\square) та ратіометричних (Δ) режимах. (А) 3-метоксифлаво́н **4d** (червоний) проти 3-гідроксифлаво́ну **4b** (чорний). (Б) Аніонний барвник **2d** (синій) проти катіонного **4h** (червоний) та нейтрального **2a** (чорний). (В) Флавоно́л **1a** (чорний) проти бісфлавоно́лу **5a** (червоний). (Г) 3,4'-дигідроксифлаво́н **4a** (чорний) проти 3,4'-дигідроксихіноло́ну **6b** (червоний) та 3,2'-дигідроксихіноло́ну **6d** (синій).

2.5. Зв'язок структура-відповідь

Аналізуючи дані, представлені вище, ми прийшли до висновку, що більшість барвників можуть бути ефективно використані для виявлення АТФ. Кілька барвників зовсім не генерують ратіометричну відповідь (**3d**, **f**) або дають лише слабку відповідь (**3e**, **4i**, **4j**, **6d**) в інтенсометричних і ратіометричних режимах (Таблиця 2.2, Рис. 2.11 а). Низька амплітуда відповіді на АТФ барвників діетиламінобензофурилової серії **3d** та **3f** при задовільній їх спорідненості до АТФ може бути результатом відсутності електрохромного ефекту трифосфату АТФ у комплексі барвник-АТФ. Наявність у цих барвниках двох планарних частин близького розміру, ймовірно, змінює відносну орієнтацію партнерів у комплексі. Це стосується

і сполуки **4i**, де додаткове бензенове кільце в хромоновій частині перешкоджає генерації ратіометричної відповіді на перших етапах титрування (Рис. 2.11 б). Крім того, у всіх згаданих випадках відбувається сильне гасіння флуоресценції барвника водою незалежно від того, чи є барвники вільними або зв'язаними з АТФ. Барвник **4d** без 3-ОН групи демонструє зменшену спорідненість та зменшену амплітуду ратіометричної флуоресцентної відповіді відносно АТФ порівняно з іншими барвниками (Рис. 2.10 А). Це показує ключову роль 3-ОН групи, яка, ймовірно, утворює Н-зв'язки з основними атомами АТФ [101].

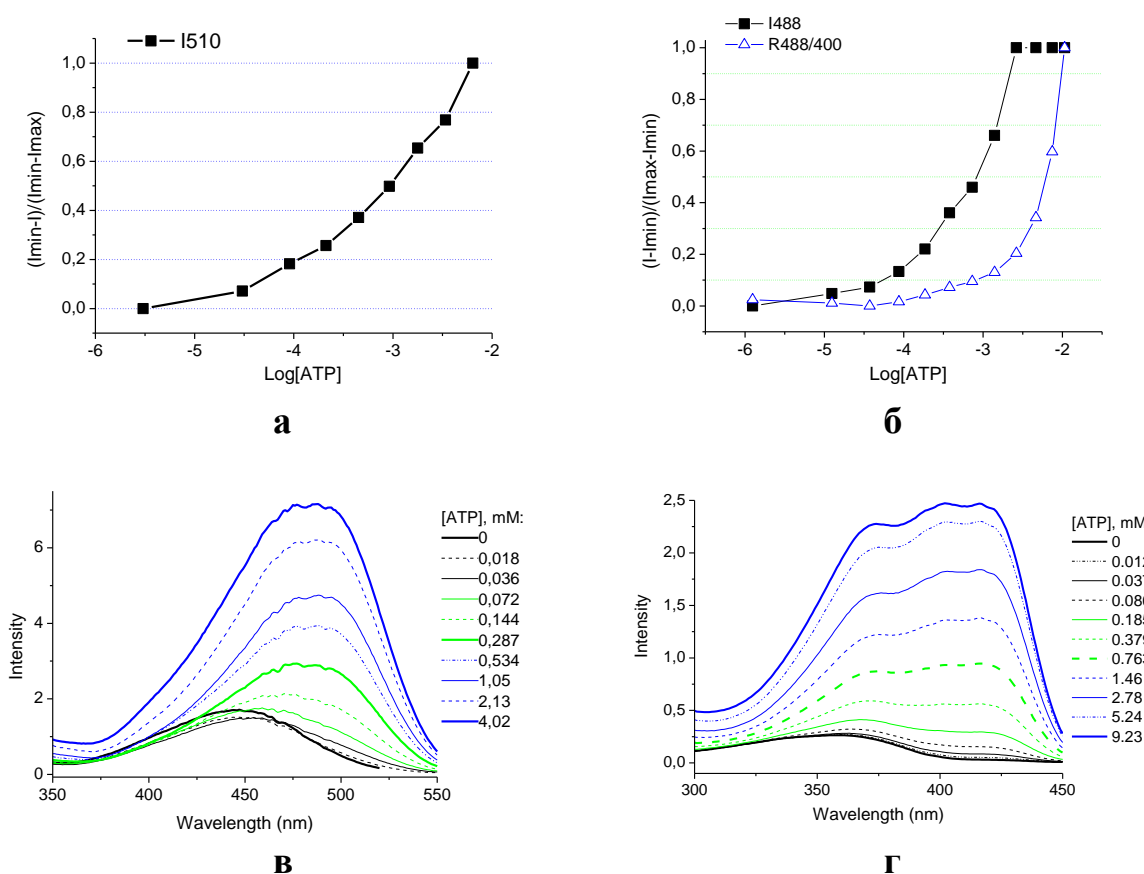


Рис. 2.11. **а** - Залежність інтенсивності флуоресценції ($\lambda_{ex} = 450$ нм, $\lambda_{em} = 510$ нм) від логарифму концентрації АТФ для барвника **3d**; **б** - Залежність інтенсивності флуоресценції ($\lambda_{ex} = 488$ нм, $\lambda_{em} = 570$ нм) та співвідношення інтенсивностей флуоресценції від логарифму концентрації АТФ для барвника **4i**; **в** – спектр збудження флуоресценції барвника **4h** при різних концентраціях АТФ в ТРИС-буфері, рН 7.4. $\lambda_{em} = 570$ нм; **г** – спектр збудження флуоресценції барвника **2d** при різних концентраціях АТФ в ТРИС-буфері, рН 7.4. $\lambda_{em} = 470$ нм.

Дві сполуки, які містять позитивно (**4h**) і негативно (**2d**) заряджені групи, демонструють однакову флуоресцентну відповідь на АТФ (Рис. 2.11 **в, г**), а їх спорідненість до АТФ близька до спорідненості незарядженого барвника **2a** (Рис. 2.10 **Б**), що стало для нас несподіваним результатом. Це вказує на малий вплив зарядженої групи в положенні 6 хромонової частини на стійкість комплексу барвник – АТФ. Така ситуація може бути лише у випадку, коли заряджена трифосфатна група АТФ розташована далеко від 6-го положення барвника в комплексі барвник – АТФ, як це було запропоновано раніше [101, 108].

Важливу інформацію про структуру комплексу барвник-АТФ дають спектральні дані бісфлавонолів **5a-c** та 3-гідроксихінолонів **6a-d**. Перша група барвників має два залишки хронону, здатні до утворення стекінг-комплексу з аденіновим фрагментом АТФ, і дві гідроксильні групи, важливі для стабільності комплексу барвник-АТФ. Проте, ці барвники демонструють спорідненість, схожу на інші барвники, що свідчить про малий вплив другої хромонової частини та другої 3-ОН групи на утворення комплексу (Рис. 2.10 **В**). 2-Арилхінолони **6a-d** є нітрогеновмісними ізостерами флавонів. На відміну від флавонів, хінолони **6a-d** є непланарними сполуками з великим (45-60°) двограним кутом між двома ароматичними фрагментами та високою (≥ 10 ккал моль⁻¹) енергією планаризації [117]. Вони мають додатковий донор ВЗ – ендциклічну NH групу. Остання, ймовірно, відповідає за підвищену спорідненість до АТФ порівняно з хромонами серії 1-4 (Рис. 2.10 **Г**). Примітно, що зміна положення ОН-групи в фенольному кільці з 4' у **6b** до 2' у **6d** не впливає на спорідненість до АТФ. Ще однією помітною різницею флуоресцентної відповіді хінолонів є близькі положення максимумів збудження смуг вільних і зв'язаних з АТФ форм. Як і у випадку хромонів **3d-3f** та **4i**, ця особливість може бути результатом орієнтації, близької до ортогональної, їх молекулярних диполів відносно електричного поля аніона АТФ.

Взагалі, всі спостережувані особливості вказують на те, що крім Н-зв'язування з 3-ОН-групою, стекінг-взаємодії між хромоною або хінолоною частиною барвника та аденіною основою молекули АТФ можуть відігравати важливу роль у формуванні та стабільності комплексів барвник-АТФ.

2.6. Висновки

Всі досліджені барвники взаємодіють з аніоном АТФ у водному буфері, утворюючи комплекси, які можна ідентифікувати за яскравою флуоресценцією і за максимумом збудження, зміщеним в червону ділянку спектру на $3000-6000 \text{ см}^{-1}$ у порівнянні з вільним барвником. Оскільки такий сильний зсув не відбувається при зв'язуванні з ліпідами, білками, вуглеводами або нуклеїновими кислотами, ця властивість дозволяє проводити селективне збудження комплексів барвник-АТФ у присутності цих біологічних молекул. Спектри емісії барвників також різко змінюються. Спостережувана подвійна флуоресценція зникає, даючи одну смугу комплексу барвник-АТФ, розташовану між двома смугами вільного барвника. Константи стійкості утворених комплексів сильно залежать від структури барвника і лежать в інтервалі $0,3-3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$. Крім того, розмиття ізобестичної точки при високих концентраціях АТФ та відсутність збігу інтенсометричних та ратіометричних кривих титрування дозволяють припустити, що може утворюватися інший комплекс барвник-АТФ із стехіометрією 1:2 та з нижчою спорідненістю, як це було запропоновано для барвника **4b** раніше [101]. Послідовне утворення двох комплексів розширює діапазон виявлення АТФ до 3 порядків, що дає змогу виміряти концентрації АТФ в діапазоні від 1 мкМ до 57 мМ, а інші відомі зонди мають діапазон виявлення лише в 2 порядки. Це є корисним поліпшенням для зондів АТФ, оскільки АТФ охоплює широкий діапазон концентрацій у клітинах, від 1 мкМ, концентрація при якій АТФ здійснює регулюючі функції, до 5-10 мМ, концентрація необхідна для сольобілізації білка [116]. Крім того, амплітуда

відповіді досліджених барвників у інтенсометричному та ратіометричному режимах настільки ж висока, як і у кращих із описаних зондів, а значний зсув поглинання комплексу барвник – АТФ у червону ділянку спектру дозволяє проводити його вибіркове збудження у присутності вільного барвника.

Таким чином, більшість із досліджених барвників можуть бути зондами АТФ. Серед усіх барвників **2c, e, 3b, 4a, f, g, i** та **5b** демонструють найкращий діапазон і чутливість виявлення АТФ, перевищуючи можливості опублікованого аналога **4b** та добре узгоджуються з діапазоном концентрації АТФ, що існує в клітинах. Вони можуть бути збуджені в діапазоні 400-500 нм, а їх емісію можна зареєструвати в діапазоні довжин хвиль, який залежить від барвника: 450-500 нм (для **2c, e** та **5b**) або 530-600 нм (для **4f, g, i**) або навіть 600-650 нм (для **3e**). Таким чином, вся серія барвників є набором, що дозволяє вибирати зонд з відповідним спектром збудження та емісії, розміром, гідрофобністю або зарядом для виявлення АТФ.

Оскільки комплексоутворення відбувається при нейтральних значеннях рН у межах фізіологічних концентрацій АТФ та Mg^{2+} , більшість досліджених барвників можуть бути використані як флуоресцентні зонди для вимірювання концентрації АТФ у розчинах та живих клітинах. Отримані результати також підтримують ідею про те, що природні 3-гідроксифлаволи, які мають вищу спорідненість до АТФ, ніж інші ароматичні молекули [116], можуть існувати як комплекси з АТФ у живих клітинах. Ці комплекси, ймовірно, співіснують з комплексами природних 3-гідроксифлавонів з деякими білками [118].

2.7. Експериментальна частина

3-Гідроксихромони [102, 103, 107, 119-123], бісфлавоноли [124] та 3-гідроксихінолони [125, 126] (Рис. 2.1) синтезували, за літературними

методиками. Для всіх отриманих зразків їх відповідну структуру та чистоту перевіряли за допомогою методів ЯМР, хроматомас-спектрометричного аналізу та тонкошарової хроматографії. Трис(гідроксиметиламіно)метан (ТРИС), динатрій аденозин-5'-трифосфат та інші реагенти були придбані у Sigma-Aldrich.

Спектри поглинання фіксували на спектрофотометрі Cary 4000 (Varian) та спектри флуоресценції – на спектрофлуориметрі FluoroMax 3.0 (Jobin Yvon, Horiba) при 25 °С. Спектри емісії були скореговані для коливань ламп. Всі пристрої обладнані термостатами.

Розчин АТФ одержували розчиненням зваженої кількості динатрієвої солі АТФ (від 20,0 до 40,0 мг) у 5 мл буферного розчину. Титрування з АТФ здійснювали шляхом додавання до вихідного розчину барвника (концентрації 3 мкМ в 1,5 мл 16 мМ ТРИС буфера, рН 7.4) розчину, що містить барвник в аналогічній концентрації та АТФ. Для отримання необхідної концентрації АТФ аліквоти (1, 2, 4, 8, 16, 30, 60, 120, 250 і 500 мкл) додавали до вихідного розчину послідовно, при постійному перемішуванні. Зафіксували проміжні спектри.

Для зменшення внеску емісії вільного барвника спектри збудження флуоресценції комплексів барвник-АТФ були записані на довжині хвилі максимуму емісії цих комплексів (див. Таблиця 2.2). З тієї ж причини всі титрування проводились при максимумі збудження зв'язаного барвника.

Значення констант стійкості K визначали за прямою апроксимацією кривих титрування змін поглинання у порівнянні з концентрацією АТФ за наступним рівнянням [127]:

$$A = A_0 + \frac{A_0 - A_i}{[P_{ye}^-]_{tot}} \times \frac{[+K [P_{ye}^-]_{tot} + n [ATP^-]_{tot}] - \sqrt{([+K [P_{ye}^-]_{tot} + n [ATP^-]_{tot}]^2 - 4nK^2 [P_{ye}^-]_{tot} [ATP^-]_{tot})}}{2K}$$

(1)

де A та A_t - поглинання при заданій і насиченій концентрації АТФ, відповідно, A_0 - поглинання за відсутності АТФ. $[АТФ]_{tot}$ - загальна концентрація АТФ, $[Dye]_{tot}$ - загальна концентрація барвника, K - видима константа стійкості, n - кількість молекул барвника на молекулу АТФ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ДО РОЗДІЛУ 2

102. Klymchenko A. S., Pivovarenko V. G., Demchenko A. P. Elimination of the Hydrogen Bonding Effect on the Solvatochromism of 3-Hydroxyflavones. *Journal of Physical Chemistry A*. **2003**, 107, 21, 4211–16.
103. Klymchenko A. S., Demchenko A. P. Electrochromic Modulation of Excited-State Intramolecular Proton Transfer: The New Principle in Design of Fluorescence Sensors. *Journal of the American Chemical Society*. **2002**, 124, 41, 12372–79.
104. Sholokh M., Zamotaiev O. M., Das R., Postupalenko V. Y., Richert L., Dujardin D., Zaporozhets O. A., Pivovarenko V. G., Klymchenko A. S., Mély Y. Fluorescent Amino Acid Undergoing Excited State Intramolecular Proton Transfer for Site-Specific Probing and Imaging of Peptide Interactions. *Journal of Physical Chemistry B*. **2015**, 119, 6, 2585–95.
105. Zamotaiev O. M., Postupalenko V. Y., Shvadchak V. V., Pivovarenko V. G., Klymchenko A. S., Mély Y. Monitoring Penetratin Interactions with Lipid Membranes and Cell Internalization Using a New Hydration-Sensitive Fluorescent Probe. *Org. Biomol. Chem*. **2014**, 12, 36, 7036–44.
106. Bilokin M. D., Shvadchak V. V., Yushchenko D. A., Klymchenko A. S., Duportail G., Mély Y., Pivovarenko V. G. 3-Hydroxybenzo[g]quinolones: Dyes with Red-Shifted Absorption and Highly Resolved Dual Emission. *Tetrahedron Letters*. **2009**, 50, 33, 4714–19.
107. Klymchenko A. S., Demchenko A. P. 3-Hydroxychromone Dyes Exhibiting Excited-State Intramolecular Proton Transfer in Water with Efficient Two-Band Fluorescence. *New Journal of Chemistry*. **2004**, 28, 6, 687.
108. Furukawa K., Hino K., Yamamoto N., Awasthi K., Nakabayashi T., Ohta N., Sekiya H. External Electric Field Effects on Excited-State Intramolecular Proton Transfer in 4'-N,N-Dimethylamino-3-Hydroxyflavone in Poly(methyl

- Methacrylate) Films. *The Journal of Physical Chemistry. A.* **2015**, 119, 37, 9599–9608.
109. Kurishita Y., Kohira T., Ojida A., Hamachi I. Organelle-Localizable Fluorescent Chemosensors for Site-Specific Multicolor Imaging of Nucleoside Polyphosphate Dynamics in Living Cells. *Journal of the American Chemical Society.* **2012**, 134, 45, 18779-89.
110. Zhang M., Ma W.-J., He C.-T., Jiang L., Lu T.-B. Highly Selective Recognition and Fluorescence Imaging of Adenosine Polyphosphates in Aqueous Solution. *Inorganic Chemistry.* **2013**, 52, 9, 4873–79.
111. Kurishita Y., Kohira T., Ojida A., Hamachi I. Rational Design of FRET-Based Ratiometric Chemosensors for in Vitro and in Cell Fluorescence Analyses of Nucleoside Polyphosphates. *Journal of the American Chemical Society.* **2010**, 132, 38, 13290–99.
112. Tang J.-L., Li C.-Y., Li Y.-F., Zou C.-X. A Ratiometric Fluorescent Probe with Unexpected High Selectivity for ATP and Its Application in Cell Imaging. *Chemical Communications.* **2014**, 50, 97, 15411–14.
113. Ojida A., Miyahara Y., Wongkongkatap J., Tamaru S., Sada K., Hamachi I. Design of Dual-Emission Chemosensors for Ratiometric Detection of ATP Derivatives. *Chemistry - An Asian Journal.* **2006**, 1, 555–63.
114. Imamura H., Nhat K. P. H., Togawa H., Saito K., Iino R., Kato-Yamada Y., Nagai T., Noji H. Visualization of ATP Levels inside Single Living Cells with Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Genetically Encoded Indicators. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **2009**, 106, 37, 15651–56.
115. Xu Z., Singh N. J., Lim J., Pan J., Kim H. N., Park S., Kim K. S., Yoon J. Unique Sandwich Stacking of Pyrene-Adenine-Pyrene for Selective and Ratiometric Fluorescent Sensing of ATP at Physiological pH. *Journal of the American Chemical Society.* **2009**, 131, 42, 15528–33.

116. Patel A., Malinovska L., Saha S., Wang J., Alberti S., Krishnan Y., Hyman A. A. Biochemistry: ATP as a Biological Hydrotrope. *Science*. **2017**, 356, 6339, 753–56.
117. Yushchenko D. A., Shvadchak V. V., Klymchenko A. S., Duportail G., Mély Y., Pivovarenko V. G. 2-Aryl-3-Hydroxyquinolones, a New Class of Dyes with Solvent Dependent Dual Emission due to Excited State Intramolecular Proton Transfer. *New Journal of Chemistry*. **2006**, 30, 5, 774–81.
118. Valant-Vetschera K.M., Wollenweber E. Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications. Taylor&Francis, London, **2006**, 617-749. ISSN-10: 0-8493-2021-6.
119. Klymchenko A. S., Ozturk T., Pivovarenko V. G., Demchenko A. P. A 3-Hydroxychromone with Dramatically Improved Fluorescence Properties. *Tetrahedron Letters*. **2001**, 42, 45, 7967–70.
120. Demchenko A. P., Ercelen S., Roshal A. D., Klymchenko A. S. Excited-State Proton Transfer Reaction in a New Benzofuryl 3-Hydroxychromone Derivative: The Influence of Low-Polar Solvents. *Polish Journal of Chemistry*. **2001**, 76 (2002), 1287–99.
121. Ercelen S., Klymchenko A. S., Demchenko A. P. Ultrasensitive Fluorescent Probe for the Hydrophobic Range of Solvent Polarities. *Analytica Chimica Acta*. **2002**, 464, 2, 273–87.
122. Klymchenko A. S., Pivovarenko V. G., Ozturk T., Demchenko A. P. Modulation of the Solvent-Dependent Dual Emission in 3-Hydroxychromones by Substituents. *New Journal of Chemistry*. **2003**, 27, 9, 1336.
123. Klymchenko A. S., Duportail G., Ozturk T., Pivovarenko V. G., Mély Y., Demchenko A. P. Novel Two-Band Ratiometric Fluorescence Probes with Different Location and Orientation in Phospholipid Membranes. *Chemistry and Biology*. **2002**, 9, 11, 1199–1208.
124. Svechkarev D. A., Doroshenko A. O., Kolodezny D. Yu. 1,4-Bis-(3-Hydroxy-4-Oxo-4H-Chromen-2-Yl)-Benzene (Bis-Flavonol): Synthesis,

- Spectral Properties and Principle Possibility of the Excited State Double Proton Transfer Reaction. *Central European Journal of Chemistry*. **2012**, 10, 1, 205–15.
125. Yushchenko D. A., Bilokin' M. D., Pyvovarenko O. V., Duportail G., Mély Y., Pivovarenko V. G. Synthesis and Fluorescence Properties of 2-Aryl-3-Hydroxyquinolones, a New Class of Dyes Displaying Dual Fluorescence. *Tetrahedron Letters*. **2006**, 47, 6, 905–8.
126. Білокін М. Д., Ющенко Д. А., Пивоваренко О. В., Пивоваренко В. Г., Синтез флуоресцентних барвників на основі 3-гідроксихінолін-4-онів і 3-гідроксинафтиридин-4-онів. *Ukrainica Bioorganica Acta*. **2008**, 1, 13–22.
127. Beltz H., Piémont E., Schaub E., Ficheux D., Roques B., Darlix J.-L., Mély Y. Role of the Structure of the Top Half of HIV-1 cTAR DNA on the Nucleic Acid Destabilizing Activity of the Nucleocapsid Protein NCp7. *Journal of Molecular Biology*. **2004**, 338, 4, 711–23.

РОЗДІЛ 3

ДИЗАЙН ТА СИНТЕЗ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ ЗОНДІВ НА ОСНОВІ 3-ГІДРОКСИФЛАВОНУ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АДЕНОЗИН-5'-ТРИФОСФАТУ

Багатокомпонентна структура зондів для детекції АТФ ускладнює їх синтез та вдосконалення. Через труднощі з їх внутрішньоклітинною доставкою з'являються серйозні обмеження у застосуванні. З цих причин великого попиту набувають прості за конструкцією зонди. У цьому аспекті зонд на основі 3-гідроксифлавонолу - 3-гідрокси-4'-(диметиламіно)флавонон (**1**) (Рис. 3.1), можна вважати одним із найпростіших та найбільш перспективних [55, 101].

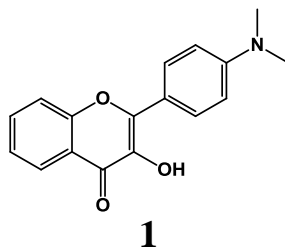
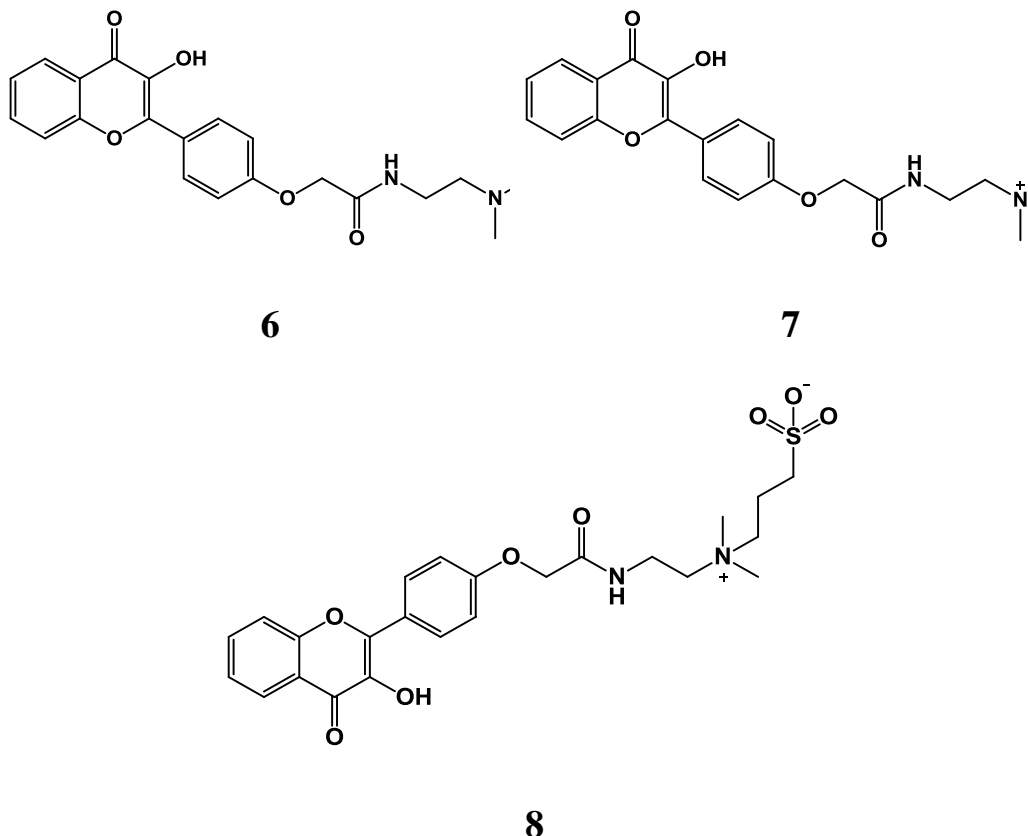


Рис. 3.1. FME зонд.

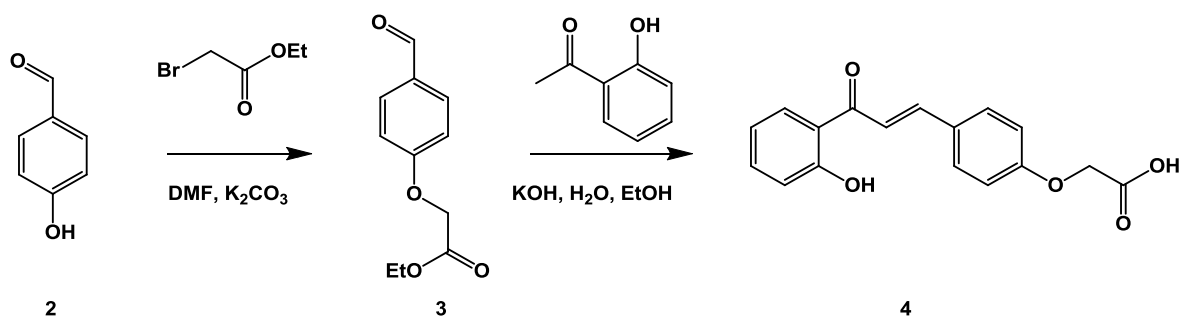
Синтетичний аналог природних флавонолів [128, 129] **1** утворює комплекс з АТФ та демонструє нову смугу в спектрах збудження флуоресценції та власне флуоресценції. У біологічному діапазоні рН у розчинах зонд **1** показує високу селективність до АТФ у порівнянні з іншими нуклеотидами. Він дозволяє виміряти концентрації АТФ у діапазоні 0,02-4 мМ [55], що добре корелює з концентрацією АТФ у деяких відділах живих клітин. Автори спостерігали утворення двох типів комплексів зі стехіометрією 1:1 та 1:2 між барвником **1** та АТФ. Застосовуючи цей зонд на мітохондріях, було зареєстровано продукцію АТФ у циклі Кребса під впливом фізіологічних концентрацій сукцинату [55].

3.1. Синтез катіонних та цвіттер-іонних флуоресцентних сенсорів для визначення АТФ

Беручи до уваги важливу роль, яку можуть відігравати електростатичні взаємодії при комплексоутворенні, з метою посилення афінітету зонду до АТФ, було синтезовано декілька катіонних та цвіттер-іонних похідних 3-гідроксифлавону **6-8**.

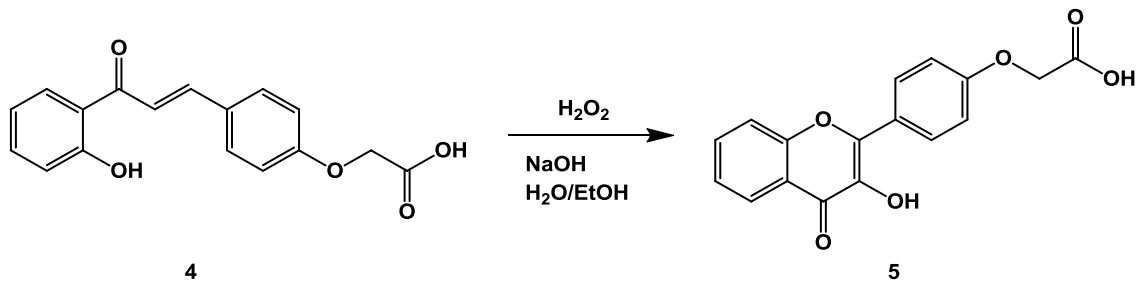


Сполуки **6 - 8** були отримані за наступною синтетичною схемою. На першій стадії гідроксибензальдегід **2** алкілювали етилбromoацетатом, щоб мати в молекулі групу, зручну для подальшого встановлення катіонних центрів. Bromoпохідна естеру оцтової кислоти, а не сама bromoцтова, виявилась більш зручною при виділенні продукту в умовах першої реакції. Етиловий естер **3** далі був легко гідролізований у реакції лужної конденсації з утворенням добре розчинної солі.



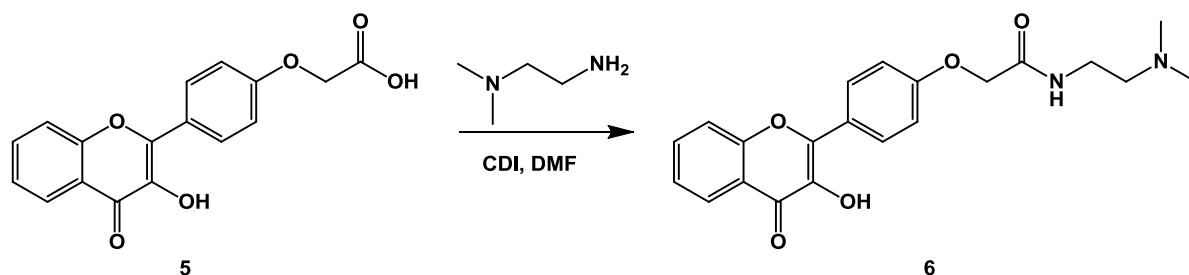
Друга стадія, конденсація альдегіду **3** з 2-гідроксиацетофеноном, проходила в системі етанол – 50%-ий водний КОН протягом доби, після чого реакційну суміш підкислювали, і утворювався осад проміжного халкону **4**, який виділяли у чистому вигляді.

Третя стадія, реакція Алгара – Флінна – Оямади [130, 131], була проведена в системі етанол-вода в лужних умовах. Після додавання пероксиду водню до халкону при охолодженні, реакційну суміш залишали перемішуватись на годину, після чого підкислювали. Утворювався осад флавонолу **5**. З виходом 38%.

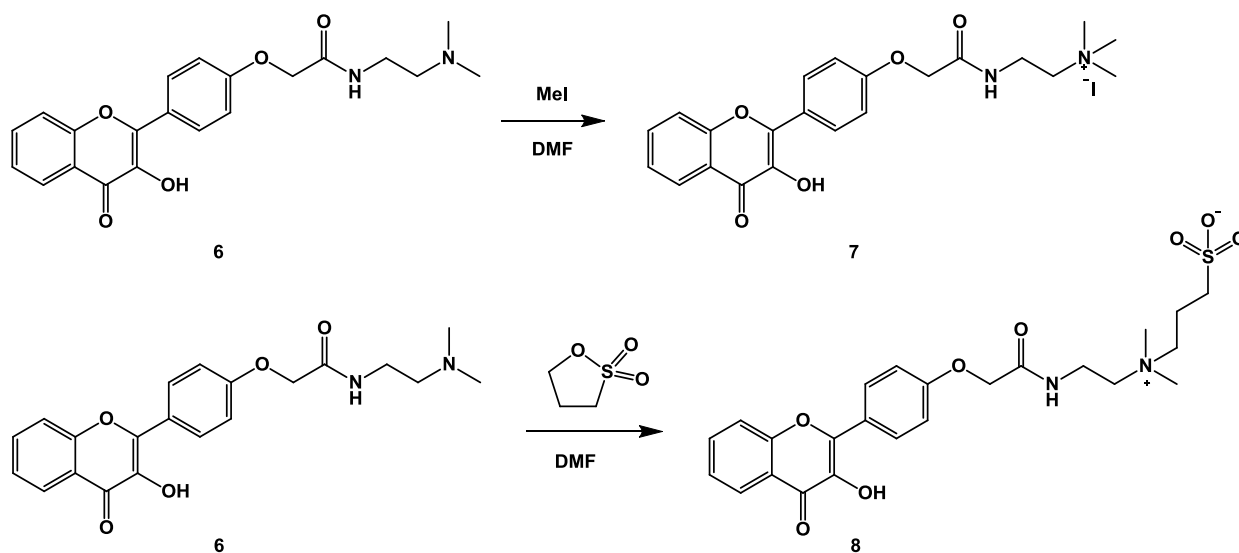


Нітрогеновмісний лінкер вводили в молекулу на четвертій стадії шляхом активування карбоксильної групи флавонолу **5**, з наступним ацилюванням 1-аміно-2-диметиламіноетану. Утворювався цільовий амід **6** з основною аміногрупою, яка при біологічних значеннях рН інсує у протонаній формі амонійного катіону. Основною особливістю в цій реакції є складність виділення – аміногрупа депротонує гідроксил в положенні 3, і це сильно збільшує водорозчинність. Однак, випробувавши ряд умов, були знайдено, що упарювання реакційної суміші досуха під

вакуумом з подальшою перекристалізацією флавонолу **6** з етанолу є найбільш зручним методом.

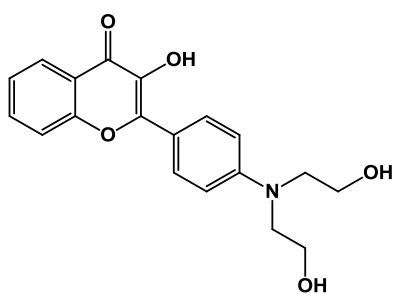


На завершальній стадії виконували алкілювання сполуки **6** метилйодидом або пропансультоном. На відміну від води і спиртів, цвіттеріонний амін **6** проявив низьку розчинність у апротонних розчинниках. Низька розчинність вихідної сполуки змусила нас використовувати розбавлені розчини, і витримувати реакційну суміш 2 дні. Не зважаючи на присутність у молекулі гідрокси-групи фенольного типу, алкілювання метилйодидом і пропансультоном відбувалось по більш нуклеофільному та стерично доступному атому Нітрогену. Амін **6** перетворювався в тетраалкіламонієву сіль **7** за кімнатної температури або за нагрівання до 80°C у випадку пропансультону, з отриманням сполуки **8**. Будова отриманих сполук підтверджена даними ЯМР спектроскопії та хроматомас-спектрометричного аналізу. Зокрема, у спектрі ^1H -ЯМР сполуки **6** окрім сигналів восьми ароматичних протонів відповідної до структури мультиплетності присутні сигнали трьох метиленових і двох метильних груп. У спектрі ^1H -ЯМР сполуки **7** зафіксовано появу сигналу третьої метильної групи та характерний молекулярний іон 397 m/z в хроматомас спектрі. Спектр ^1H -ЯМР сполуки **8** у порівнянні з сполукою **6** має нові сигнали протонів трьох метиленових груп, зміщених у сильну область спектру. Характерний молекулярний іон для **8** складає 505 m/z в позитивному та 503 m/z в негативному режимах, що теж є підтвердженням структури, запропонованої для сполуки **8**.

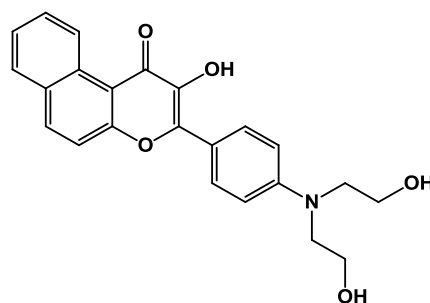


3.2. Модифіковані в положенні 4' амінофлавоноли

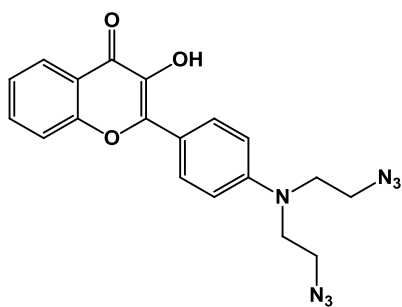
З метою підвищення константи зв'язування ($K_{зв}$) та зниження межі детекції АТФ було додатково використано іншу стратегію – збільшення кількості водневих зв'язків, що утворює зонд з АТФ, а також збільшення розмірів планарної частини зонду, яка бере участь у зв'язуванні з АТФ шляхом стекингу з ядром аденіну. Для цього було розроблено стратегію та синтезовано ряд сполук, структура яких дозволяє збільшити кількість вказаних міжмолекулярних взаємодій, а саме стекингу (сполуки **18** та **21**), водневих зв'язків (сполуки **13** та **18**) та іон-дипольних взаємодій (сполуки **16** та **21**).



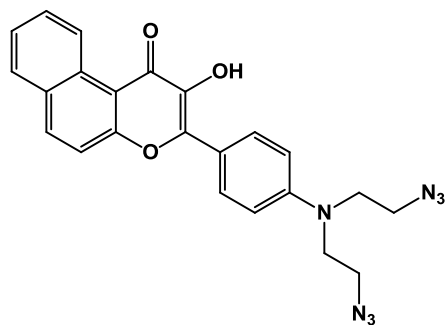
13



18

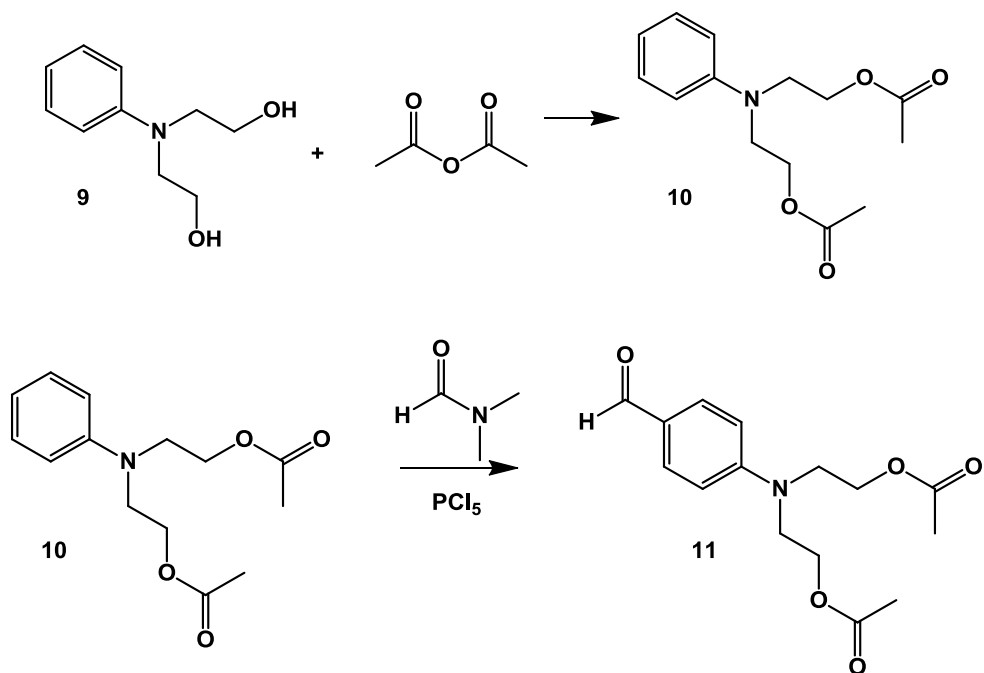


16

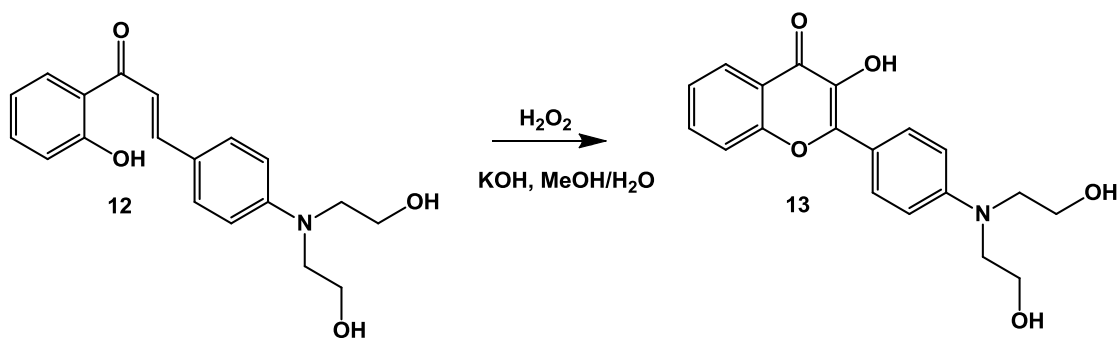


21

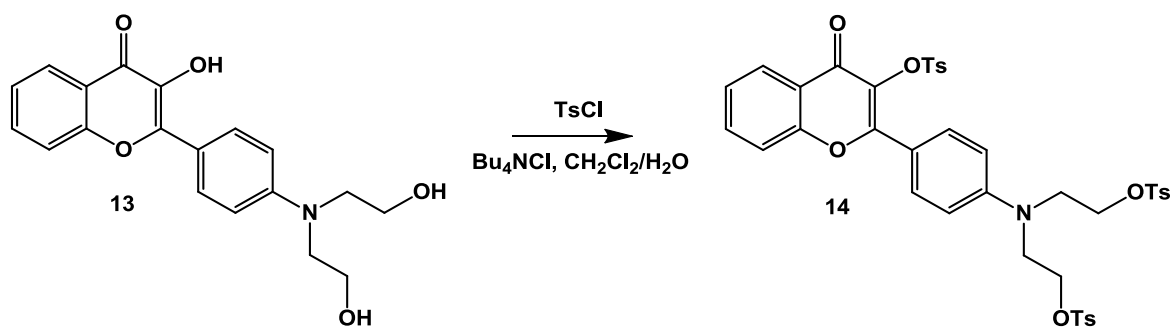
Ключову сполуку, альдегід **11** було отримано шляхом ацилювання N-фенілдіетаноламіну **9** ангідридом, з подальшим формілюванням діацетату **10** в умовах реакції Вільсмайера [132, 133].



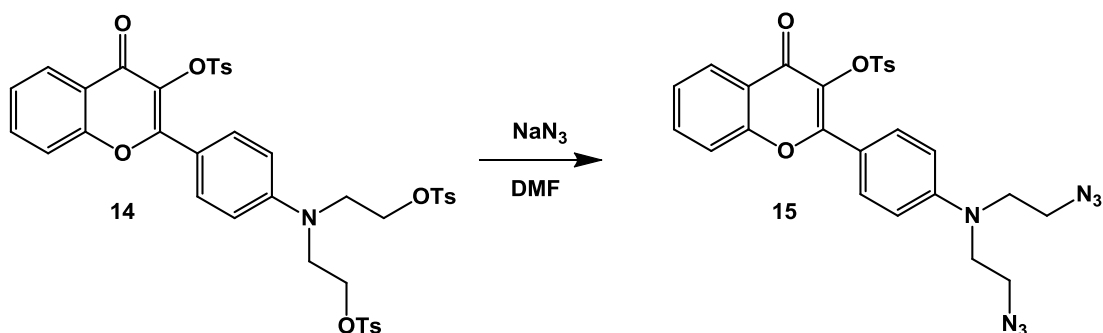
Ді-N,N-(2-ацетоксіетил)-4-форміланілін (**11**) вводили у реакцію конденсації з 2-гідроксиацетофеноном у лужному (30% KOH) метанольному розчині, в результаті якої було виділено халкон **12**. Наступною стадією була реакція Алгара – Флінна – Оямади [130, 131], окисна гетероциклізація **12**, що була проведена в системі метанол-вода в лужних умовах.



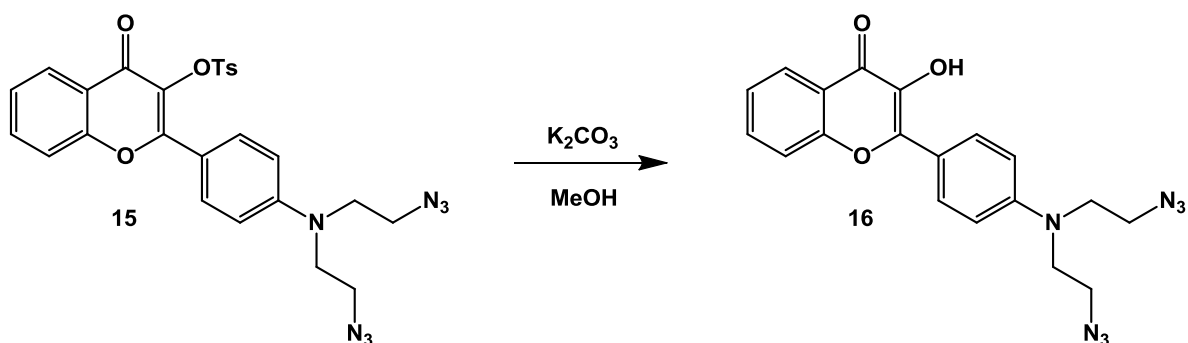
Після додавання пероксиду водню при охолодженні реакційну суміш залишали перемішуватись на годину, після чого підкислювали. Яскраво-жовтий осад флавонолу **13** – першої цільової сполуки, відфільтровували і ацилювали тозилхлоридом в умовах міжфазного каталізу тетрабутиламоній хлоридом у системі дихлорометан-вода. У результаті було отримано продукт **14**, де всі гідрокси-групи заміщені на тозилний залишок. Будова отриманих сполук підтверджена даними ЯМР спектроскопії та хроматомас-спектрометричного аналізу. Зокрема, у спектрі ^1H -ЯМР сполуки **13** зафіксовано зникнення сигналів метинових протонів халкону та поява сигналу 3-гідрокси-групи у слабкому полі (9.5 м.ч.) замість сигналу при 11.5 м.ч. для халкону. Характерний молекулярний іон в хроматомас спектрі – 342 m/z в позитивному та 340 m/z в негативному режимі теж є підтвердженням запропонованої для сполуки **13** структури. Для сполуки **14** у ^1H -ЯМР спектрі відслідковувалась поява сигналів ароматичних протонів та метильних груп тозилних залишків, а також зникнення сигналів відповідних гідрокси-груп. Характерний молекулярний іон в хроматомас спектрі – 804 m/z узгоджується з розрахованою молекулярною масою сполуки.



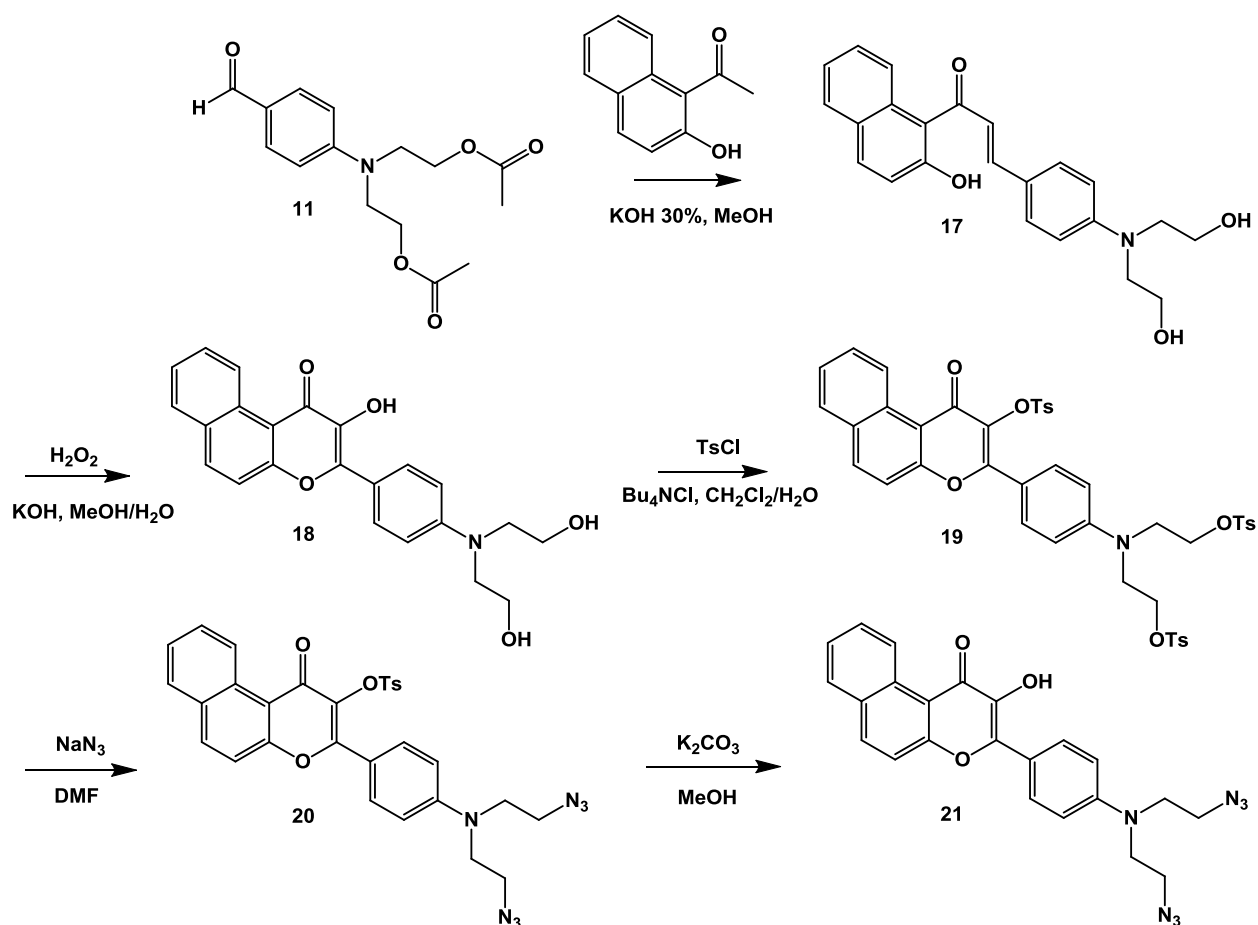
Далі було виконано нуклеофільне заміщення тозильних груп **14** на азидні. Реакція проводили у диметилформаміді з азидом натрію при нагріванні до 80°C протягом 5 годин. Одержали діазидопохідну **15**, зі збереженою тозильною групою у положенні 3 флавонолу.



Для зняття захисту, сполуку **15** кип'ятили півтори години з трьома еквівалентами поташу в метанолі. Після виділення та очистки отримали кристали 3-гідроксифлавону **16**. Будова отриманих сполук підтверджена даними ЯМР спектроскопії та хроматомас-спектрометричного аналізу. Для сполуки **15** в ^1H -ЯМР спектрі фіксували ароматичні протони лише однієї тозильної групи, в ІЧ спектрі була присутня характерна для валентних коливань азидної групи смуга, а її молекулярний іон 546 m/z повністю узгоджувався з розрахованою молекулярною масою. У ЯМР спектрі сполуки **16** були повністю відсутні сигнали тозильної групи, зафіксовано появу сигналу протону фенольної ОН групи. Молекулярний іон в хроматомас спектрі – 392 m/z та характерна для валентних коливань азидної групи смуга в ІЧ спектрі відповідають запропонованій для сполуки структурі.



Похідні **18** та **21** було отримано за аналогічною синтетичною схемою, використовуючи як вихідні сполуки для конденсації альдегід **11** та 1-ацетил-2-нафтол. Будова отриманих сполук підтверджена даними ЯМР спектроскопії та хроматомас-спектрометричного аналізу. Зокрема, у спектрі ^1H -ЯМР сполуки **18** фіксували зникнення сигналів метинових протонів халкону та поява сигналу 3-гідрокси-групи у слабкому полі (9.5 м.ч.) замість сигналу при 11.5 м.ч. для халкону. Молекулярний іон в хроматомас спектрі – 392 m/z в позитивному та 390 m/z в негативному режимі відповідає розрахованій молекулярній масі сполуки. У ^1H -ЯМР спектрі сполуки **21** повністю відсутні сигнали тозильної групи, з'являється сигнал протону ОН групи фенольного типу. Молекулярний іон в хроматомас спектрі – 442 m/z та смуга валентних коливань, характерна для азидної групи в ІЧ спектрі теж підтверджують структуру, запропоновану для сполуки **21**.



3.3. Дизайн та синтез молекулярних пінцетів

3.3.1. Синтез молекулярних пінцетів з довгим лінкером

За рахунок направленого дизайну флуоресцентного зонду є можливість покращити параметри його флуоресцентної відповіді на АТФ, зокрема збільшити афінитет, селективність зв'язування, а також концентраційний та динамічний діапазон флуоресцентної відповіді. Для досягнення цієї мети ми пропонуємо молекулярні пінцети, що складаються з двох флавонольних фрагментів, з'єднаних активним лінкером. Молекулярні пінцети є рецепторами з двома платформами для зв'язування аналізу [134]. Наявність двох планарних фрагментів веде до збільшення стекінг-взаємодій, що сприяє підвищенню спорідненості та селективності до планарних поліциклічних молекул у розчинах, у тому числі до аденіну АТФ [135, 136] та інших похідних пурину [137].

Будова лінкеру в молекулярному пінцеті теж має значення. За нашими уявленнями, лінкер зонду має бути оснащений NH-амідними групами. Такі групи в амінокислотному лінкері можуть утворювати водневі зв'язки безпосередньо з фосфатами АТФ або опосередковано – через молекули води, збільшуючи цим спорідненість до АТФ і стабілізуючи одну з конформацій комплексу зонд - АТФ (Рис.3.2).

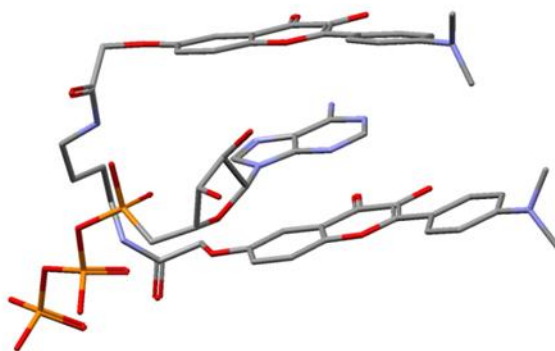
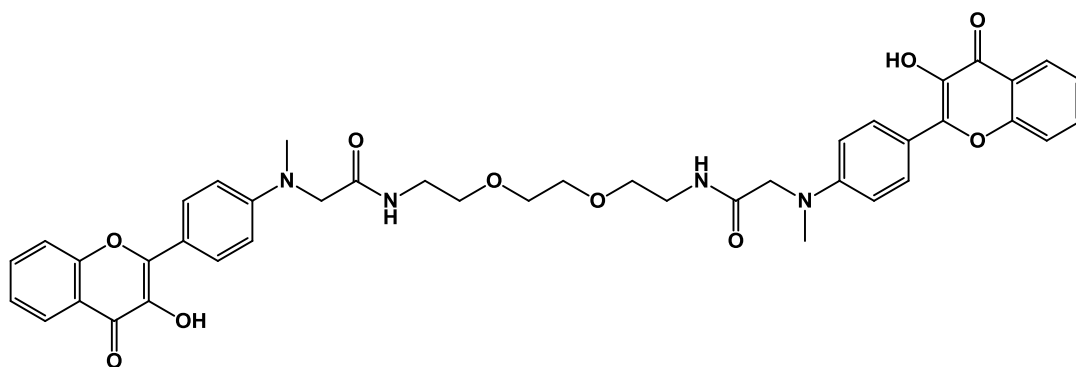
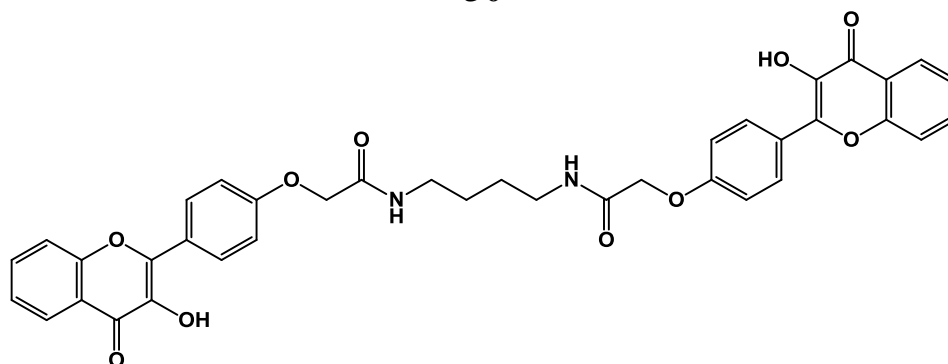


Рис. 3.2. ММ+ модель просторової будови комплексу пінцет - АТФ (атоми Гідрогену не вказані).

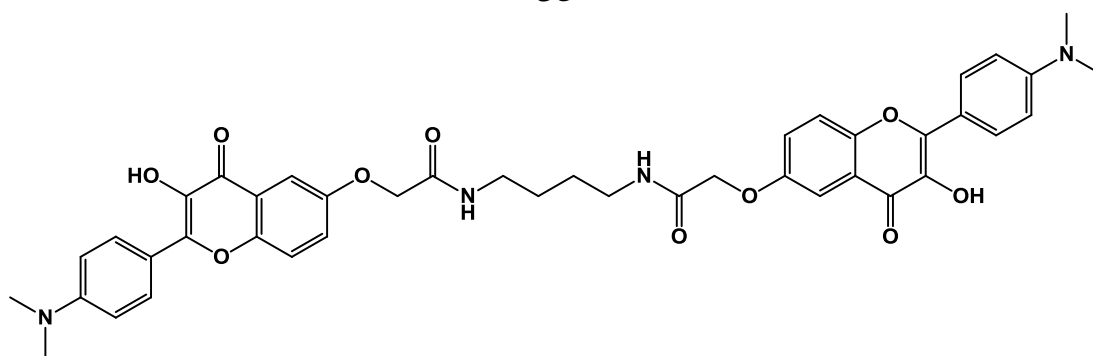
Були запропоновані наступні структури молекулярних пінцетів на основі 3-гідроксифлавону:



30



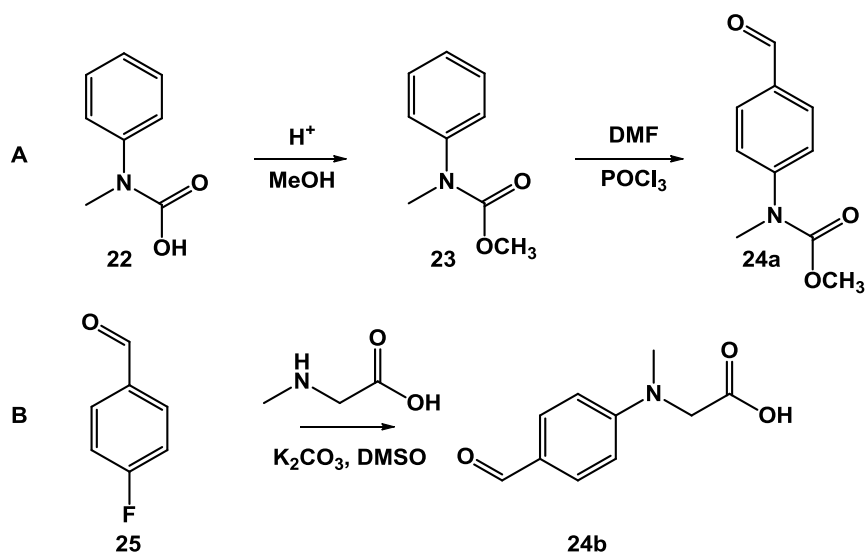
35



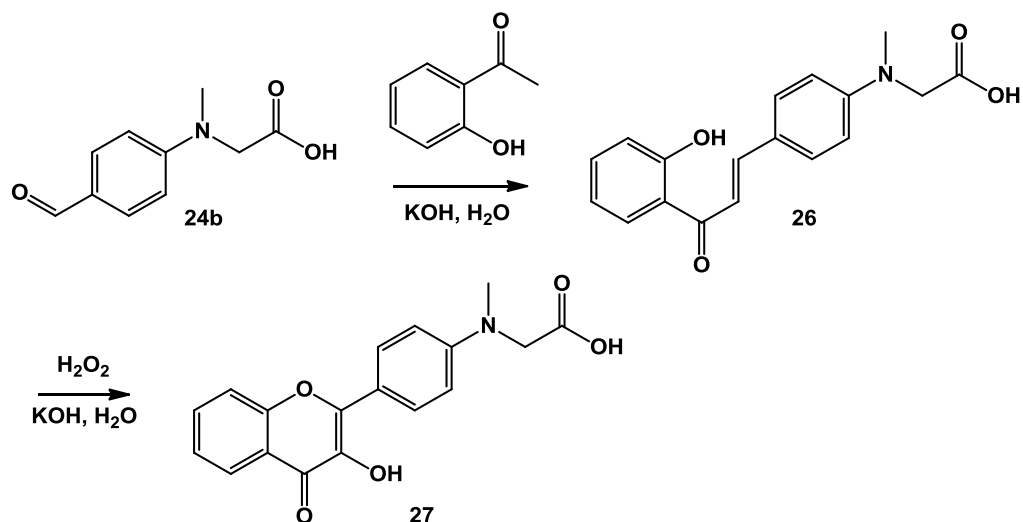
40

Ключовою стадією синтезу даних сполук є утворення флавонольної частини, яка надалі слугує активним елементом АТФ-рецептора типу пінцет. Синтез пінцету **30** можна виконати двома шляхами. У першій синтетичній послідовності можна використати реакцію конденсації гідроксиацетофенону з заміщеним 4-діалдкіламінобензальдегідом (**24a,b**) в халкон з подальшою окиснювальною циклізацією за методом Алгара –

Флінна – Оямади. Діалкіламінобензальдегід можна синтезувати виходячи з *N*-метил-*N*-фенілгліцину **22**, який захищають, перетворюючи на метиловий естер **23**. Необхідну проміжну сполуку **24a** можна отримати за реакцією формілювання за Вільсмаєром (схема **A**). Проте, такий шлях синтезу не завжди є ефективним, особливо коли в молекулі присутні інші функціональні групи. Тому ми застосували альтернативну схему, за якою діалкіламінобензальдегід отримували арилюванням *N*-метилгліцину 4-флуоробензальдегідом **25** (схема **B**), що значно спростило синтез.

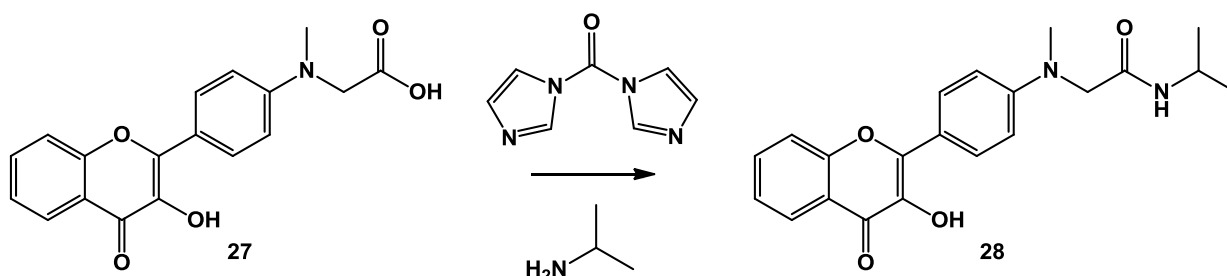


Далі проміжну сполуку **24b** конденсували з 2-гідроксиацетофеноном, з наступною окиснювальною циклізацією отриманого халкону у флавонол **27**. При цьому не було потреби захищати кислотну функцію гліцину, оскільки циклізацію проводили в лужному середовищі.



Таким чином, обрана для синтезу цільових сполук проста схема **В** виявила на практиці свою зручність.

Для попередньої оцінки реакційної здатності кислоти **27** її було перевірено у синтезі **28**. Карбоксильну групу флавонолу активували за допомогою карбонілдіїмідазолу (CDI). Після введення у реакцію аміно-компоненти з реакційної суміші було виділено цільовий амід **28**. Реакція легко проходила навіть за кімнатної температури.



Складність проведення даної реакції полягала у контролі за її ходом, оскільки цільові продукти мали порівняно високу молекулярну масу, низьку розчинність і містили багато донорів водневого зв'язку. Тому за утворенням цільових сполук ми були вимушені слідкувати за допомогою хроматомас-спектрометрії.

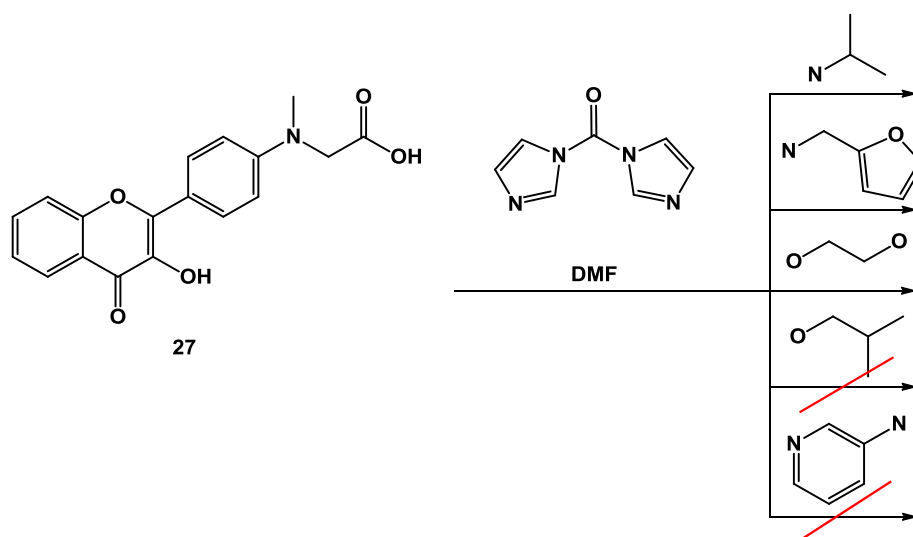
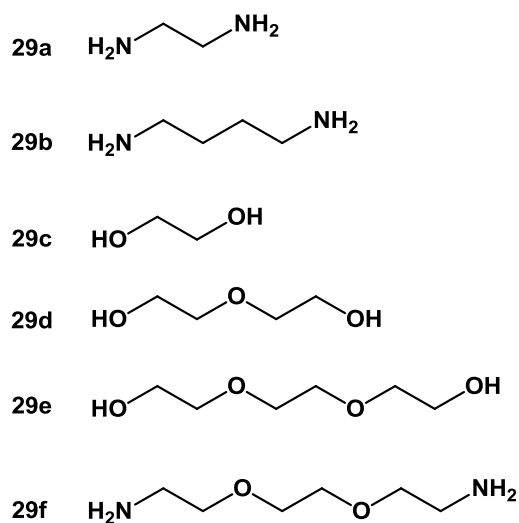
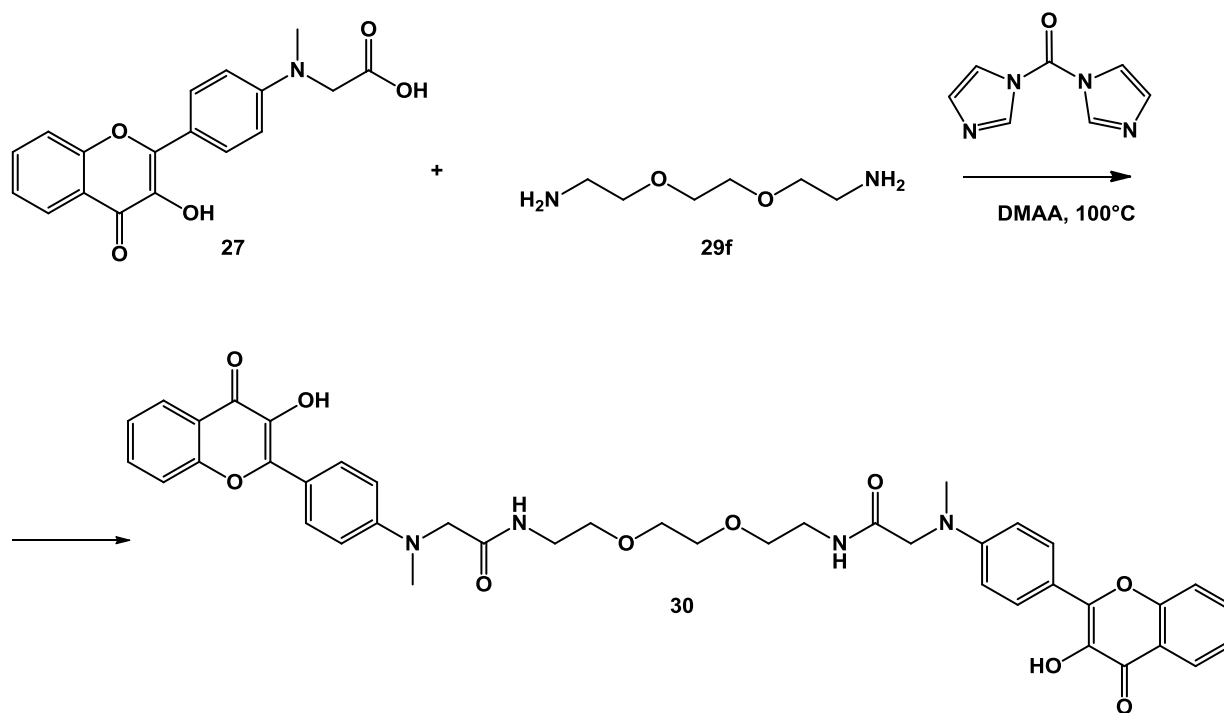


Рис. 3.3. Перевірка реакційної здатності вихідної кислоти **27**.

Було встановлено, що утворення амідів з високими виходами відбувається лише у випадку висококонуклеофільних стерично неутруднених амінів та діолів. На цій основі було здійснено вибір спейсерів, які можна використати для створення пінцету.



Було прийнято рішення зосередити увагу на діамінах (**29a**, **29b**) та етиленгліколях (**29c-e**). Проте, результати виявились менш успішними, ніж у випадку монофункціональних амінів та діолів. Зазвичай утворювалась суміш речовин, з незначним вмістом цільового продукту. Лише гідрофільний лінкер на основі діамінодіюксоктану **29f** вдалося з задовільним виходом ввести в молекулу пінценту.



При використанні CDI, диметилацетаміду (DMAA) та у реакції при 100°C протягом 3-х днів було зафіксовано утворення необхідного пінцету. Після виділення чистота продукту склала 40%, тому зразок було очищено за допомогою колонкового варіанту високоефективної рідинної хроматографії. Сполука демонструє жовто-зелену флуоресценцію у розчинах. Будова підтверджена даними ЯМР спектроскопії та хроматомас-спектрометричного аналізу. У ^1H -ЯМР спектрі сполуки **30** спостерігається подвійна інтенсивність сигналів ароматичних і аліфатичних протонів флавонолу у порівнянні з інтенсивністю сигналів відповідних протонів спейсера, що підтверджує наявність двох залишків флавонолу в молекулі. Молекулярний іон в хроматомас спектрі при 763 m/z в позитивному та 761 m/z в негативному режимі Відповідає розрахованій молекулярній масі сполуки **30**.

Ми змоделювали просторову будову комплексу молекулярного пінцету та АТФ методом ММ⁺, де врахували, що зв'язування має забезпечити: π - π стекінг.

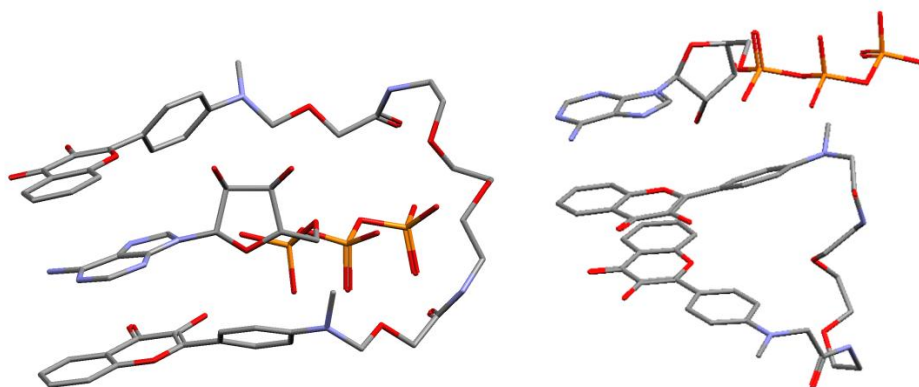
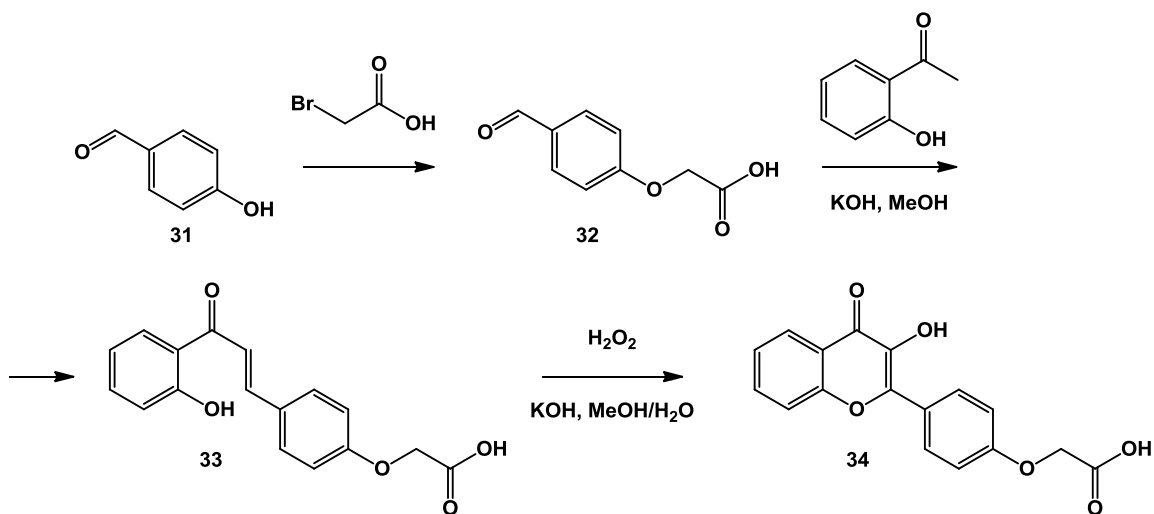


Рис. 3.4. ММ⁺ модель просторової будови комплексу **30** - АТФ (атоми Гідрогену не вказані).

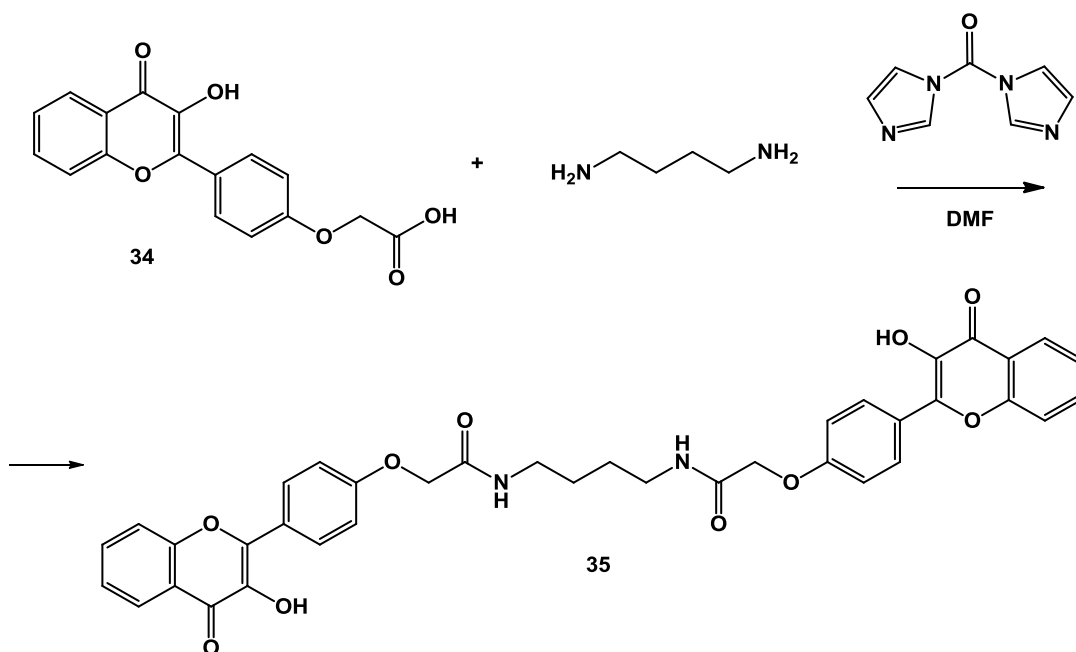
Синтез молекулярного пінцету **35** складався з чотирьох послідовних стадій. На першій стадії 4-гідроксибензальдегід **31** алкілювали бромцтовою кислотою. Друга стадія, конденсація альдегіду з 2-гідроксиацетофеноном, була проведена у 40%-ному спиртовому розчині КОН. Проміжний халкон **33** було виділено у чистому вигляді з метою ідентифікації, а в процесі масштабування синтезу пінцету **33** халкон не виділяли.



Третю стадію, реакцію Алгара-Флінна-Оямади, проводили у 30% метанольному розчині КОН. Флавонол **34** одержали з виходом 40%.

Завершальна четверта стадія, синтез пінцету **35**, була найбільш складною у виконанні, тому ми дослідили ряд умов для проведення синтезу. Спочатку була спроба встановити у пінцет **34** діамінобутановий спейсер за допомогою сучасних активаторів карбоксильної групи – НВТУ і

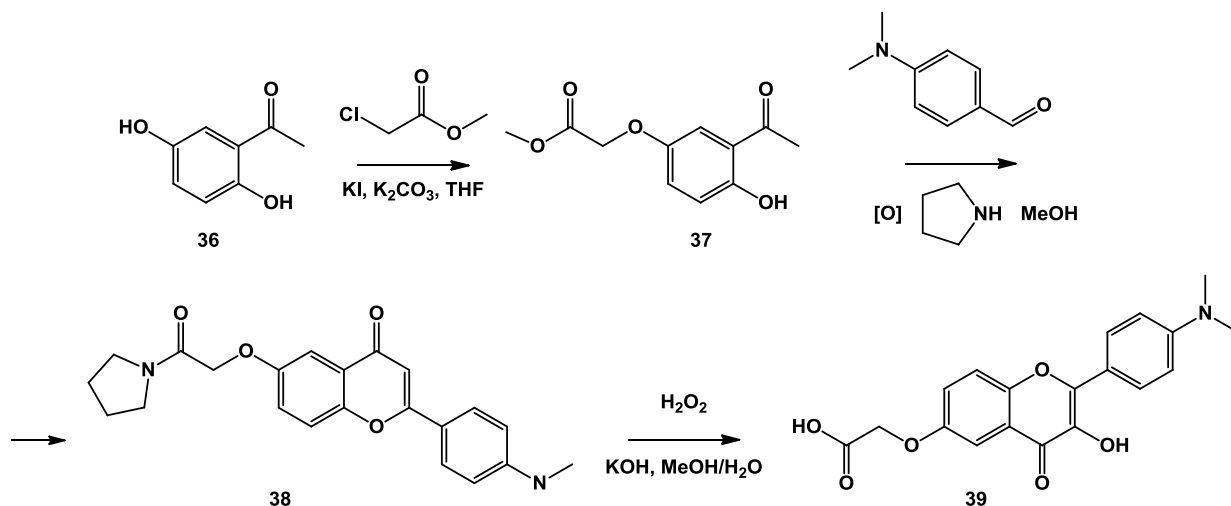
гідроксибензотриазолу (HOBT). Було проведено декілька проб з використанням різних методик, проте всі вони виявилися малоефективними. Тому застосували зовсім інший підхід до проведення фінальної стадії синтезу пінцету. Кислотний залишок **34** активували для конденсації з аміном за допомогою CDI. Через погану розчинність 3-гідроксифлавонолу **34** дану реакцію проводили в диметилформаміді.



Таким чином, були підібрані оптимальні умови для проведення реакції. В результаті реакції одержали суміш пінцету і моно-продукту конденсації флавонолу **34** з аміном. При перекристалізації з етанолу виявилось, що монопродукт добре розчиняється в спирті при нагріванні, на відміну від пінцету. Це і було використано для попередньої очистки сполуки. Перекристалізацію пінцету проводили з використанням DMF. Випадав осад світло-коричневого кольору. Будова підтверджена даними ЯМР спектроскопії та хроматомас-спектрометричного аналізу. У ¹H-ЯМР спектрі сполуки **35** спостерігається подвійна інтенсивність сигналів ароматичних і аліфатичних протонів флавонолу у порівнянні з інтенсивністю сигналів відповідних протонів спейсера, що підтверджує наявність двох залишків флавонолу в молекулі. Молекулярний іон в хроматомас спектрі – 677 m/z в позитивному режимі відповідає

розрахованій молекулярній масі. Нажаль, через погану розчинність продукту та наявність в молекулі чотирьох груп-донорів водневого зв'язку нам не вдалося очистити зразок вище, ніж 64% вмісту продукту. Повністю позбутися домішки продукту конденсації по одній аміногрупі не вдалося.

Синтез молекулярного пінцету **40** проводили з використанням тієї ж чотирьохстадійної схеми.

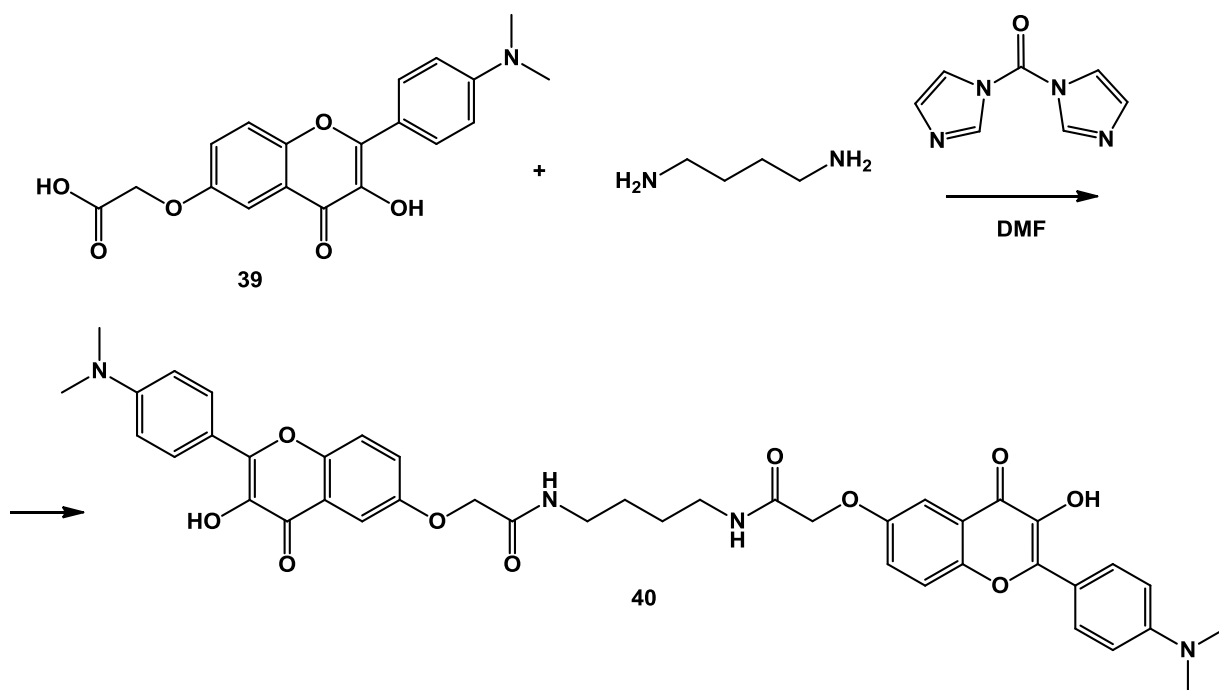


На першій стадії 2,5-дигідроацетофенон **36** алкілювали метилхлороацетатом, таким чином встановлюючи карбоксигрупу, необхідну у подальшому формуванні спейсера. Хлоропохідна естеру оцтової кислоти, а не сама хлороцтова, була використана для полегшення виділення і очистки продукту в умовах першої стадії. Найзручнішим розчинником для проведення даної взаємодії виявився сухий тетрагідрофуран. В результаті алкілювання такого дигідроацетофенону окрім бажаного продукту, похідної по положенню 5 у реакційній суміші були виявлені значні кількості вихідного ацетофенону та продукту подвійного алкілювання. Тому була проведена очистка продукту реакції колонковою хроматографією у системі дихлорометан:етилацетат 95:5.

Другу стадію, конденсацію отриманого ацетофенону з 4-диметиламінобензальдегідом намагались провести за класичною методикою

синтезу халконів, конденсацією у 30%-ному спиртовому розчині КОН. Проте за даними ¹H-ЯМР-спектроскопії, одержували суміш двох вихідних речовин (сполуки **37** у вигляді карбонової кислоти та 4-диметиламінобензальдегіду). Тому була застосована методика, в якій замість неорганічної основи застосовували органічну, а саме – піролідін. Така проста заміна дала подвійний позитивний результат: відбулася конденсація альдегіду і кетону з утворенням відповідного халкону і його подальше перетворення у флавонол **38**. Це вдалося встановити за відсутністю сигналів протонів алкенової системи халкону у його ¹H-ЯМР спектрі та за зеленою флуоресценцією сполуки **38** в розчині спирту та спиртовому розчині КОН, та її жовтою флуоресценцією у розчині толуену. Така зміна кольорів флуоресценції є характерною лише для флавонолів, тоді як халкони та інші флавоноїди, утворення яких можливе в даних умовах, мають червону або голубу флуоресценцію, або ж не флуоресціюють взагалі, як це характерно для 2-гідроксихалконів у лужних умовах. Третьою приємною особливістю знайдених умов була та, що утворення флавонолу відбулося з досить високим виходом (84%) у порівнянні з класичними умовами, і до того ж, всі численні перетворення двох реакцій, конденсації і окисної циклізації проходили в одній колбі. Єдиним, проте серйозним недоліком знайдених умов був той, що карбоксильна функція ацетофенону **37** перетворилася в амідну у флавонолі **38**.

Тому на наступній стадії виникла необхідність у проведенні гідролізу амідного зв'язку. Для цього сполуку **38** витримували в 30%-ному спиртовому розчині КОН, що містить еквівалентну кількість перекису водню протягом ночі. Після підкислення була виділена цільова кислота **39**, яка була використана у подальшому для зв'язування зі спейсером.



Четверта стадія, ацилювання діамінобутану, проводилося в умовах, що були підібрані для пінцету **35**. Характерною особливістю проведення цієї взаємодії є значний (5:1) надлишок більшого за молекулярною масою реагенту (флавонолу **39**) у порівнянні з низькомолекулярним діаміном. Сполука **40** була отримана з виходом 64%. Будова сполук була підтверджена даними ЯМР спектроскопії та хроматомас-спектрометричного аналізу. У ^1H -ЯМР спектрі сполуки **40** спостерігається подвійна інтенсивність сигналів ароматичних і аліфатичних протонів флавонолу у порівнянні з інтенсивністю сигналів відповідних протонів спейсера, що підтверджує наявність двох залишків флавонолу в молекулі. Молекулярний іон в хроматомас спектрі – 763 m/z відповідає розрахованій молекулярній масі. Чистота зразка: 90%.

3.3.2. Синтез молекулярних пінцетів з коротким лінкером

Оскільки відомо, що пінцети з довгим та гнучким лінкером перебувають переважно у закритій конформації, яка часто не дозволяє аналіту зв'язатись у положенні між двома рецепторами, нами були проведені дизайн, синтез та дослідження молекулярних пінцетів з коротким лінкером. Для порівняння флуоресцентної відповіді рецепторів,

синтезованих вище, було розроблено ряд модельних сполук з коротким лінкером, який буде однозначно забезпечувати відкритий стан пінцету (Рис. 3.5).

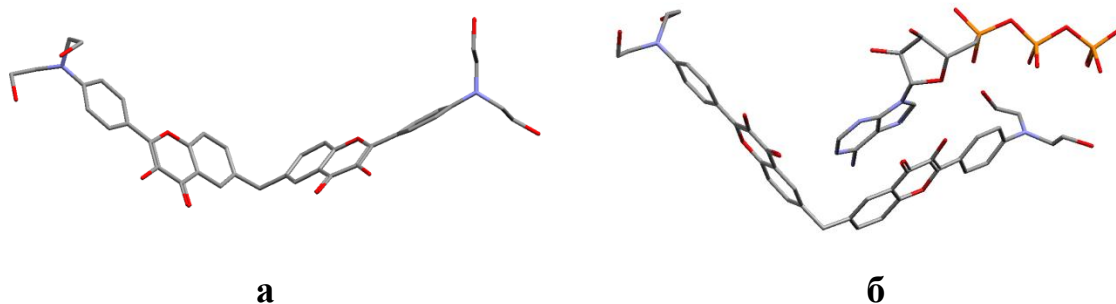
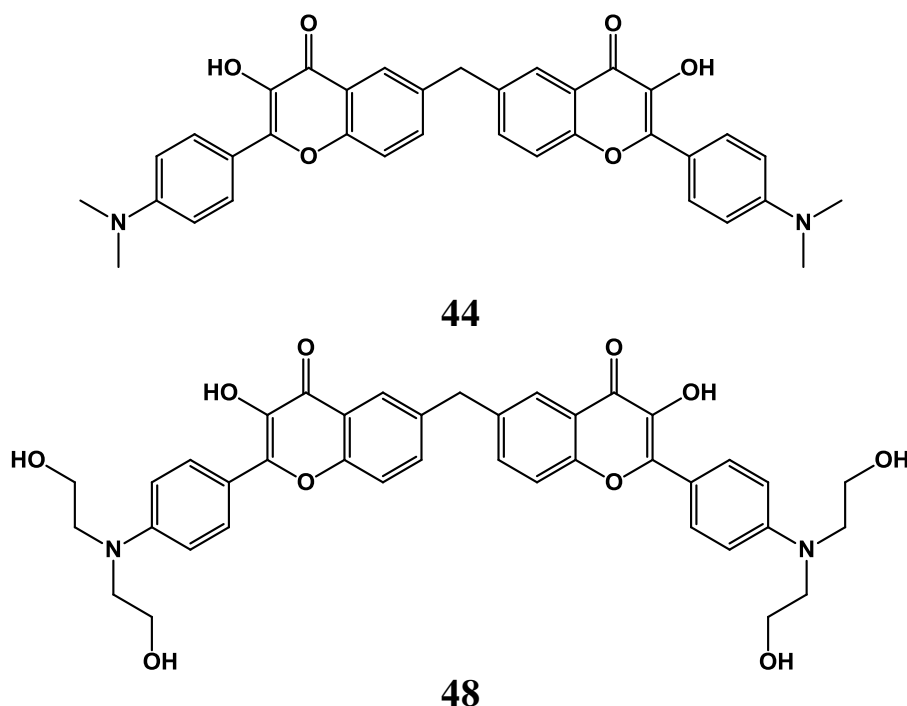
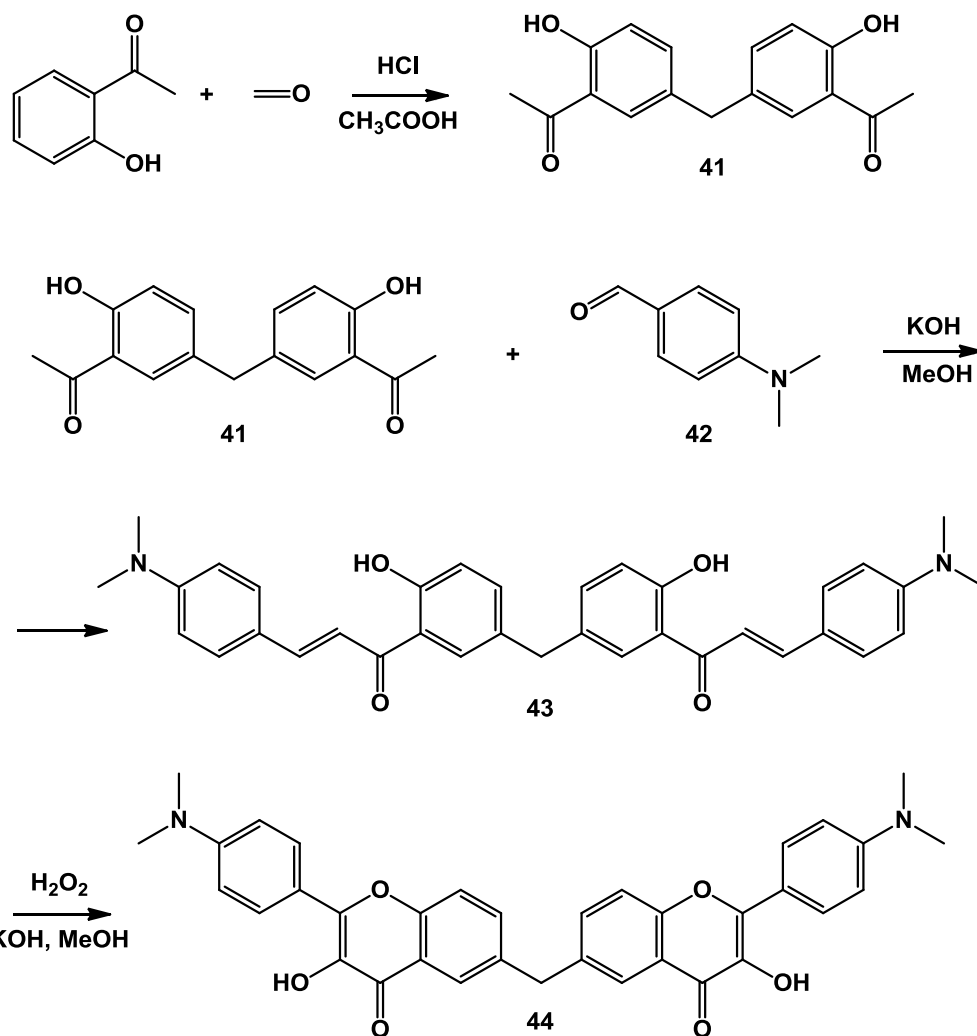


Рис. 3.5. MM+ моделі просторової будови пінцету **44** (а) та його комплексу з АТФ (б) (атоми Гідрогену не вказані).

Були розроблені ретросинтетичні схеми синтезу наступних молекулярних пінцетів на основі 3-гідроксифлавону:

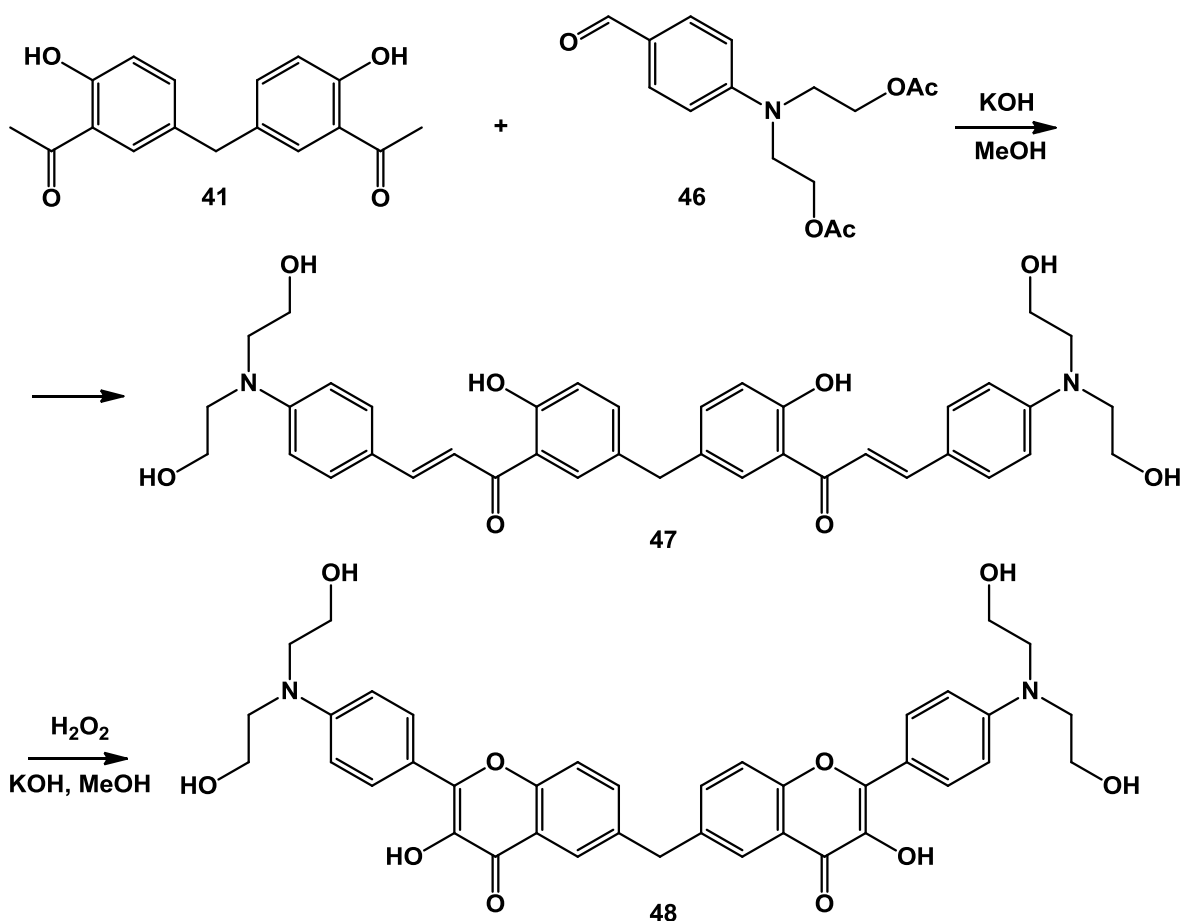


Ключовою стадією у синтезі подібних сполук є одержання біс-(3-ацетил-4-гідроксифеніл)метану [137] (**41**). Ми виконували цей синтез у розроблених раніше умовах [137] – шляхом пропускання газоподібного Гідроген хлориду крізь розчин гідроксиацетофенону та формаліну в оцтовій кислоті.



Наступною стадією була конденсація ацетофенону **41** з 4-(диметиламіно)бензальдегідом у лужному метанольному розчині, з подальшою окисною гетероциклізацією за Алгаром – Флінном – Оямадою.

Пінцет **48** було одержано за аналогічною синтетичною схемою.



Важливим етапом у синтезі сполук **44** та **48** є очистка, адже реакція конденсації відбувалася за двома центрами, що гарантувало наявність домішок продуктів конденсації та окисної гетероциклізації лише по одному реакційному центру. Після проведення всіх стадій синтезу ми мали суміші, які містили лише 64% та 78% пінцетів **44** та **48** відповідно, інше – домішки. Внаслідок поганої розчинності **44** та **48** стандартні методи очистки, такі як перекристалізація або колонкова хроматографія, не давали необхідного результату. Варто також зазначити, що дані пінцети є чутливими до впливу сильних органічних кислот внаслідок наявності алкоксильного замісника у положенні 5 хромону, що ускладнювало ідентифікацію стандартними методами хромато-мас аналізу. Отримані зразки було очищено за допомогою методу ВЕРХ. Виходи цільових сполук **44** та **48** склали 26% та 62% відповідно. Будова синтезованих сполук підтверджена даними ЯМР спектроскопії та хроматомас-спектрометричного аналізу. Зокрема, в ¹H-ЯМР спектрі сполуки **44** спостерігається подвійна інтенсивність сигналів

ароматичних і аліфатичних протонів флавонолу у порівнянні з інтенсивністю сигналів відповідних протонів спейсера, що підтверджує наявність двох залишків флавонолу в молекулі. Молекулярний іон в хроматомас спектрі – 575 m/z відповідає розрахованій молекулярній масі $M+H^+$ (ацетонітрил). Чистота зразка: 90%. Для сполуки **48** 1H -ЯМР спектрі теж спостерігається подвійна інтенсивність сигналів ароматичних і аліфатичних протонів флавонолу у порівнянні з інтенсивністю сигналів відповідних протонів спейсера, що підтверджує наявність двох залишків флавонолу в молекулі. Молекулярний іон в хроматомас спектрі – 694 m/z відповідає розрахованій молекулярній масі $M+H^+$ (ацетонітрил).

3.4. Експериментальна частина

Під час проведення експериментальних робіт були використані органічні розчинники кваліфікації «ЧДА»: метанол, етанол, ацетонітрил, тетрагідрофуран, хлористий метилен, диметилформамід. При необхідності розчинники було зневоднено за стандартними методиками та додатково очищено перегонкою.

Вихідними сполуками, що використовувались в органічному синтезі були комерційно доступні реагенти кваліфікації «ЧДА»: 2-гідроксиацетофенон, 2,5-дигідроксиацетофенон, *n*-гідроксибензальдегід, бромоцтовакислота, метиловий естер хлороцтової кислоти.

Хроматографічна очистка проводилась на приладі Agilent Technologies 1260 Infinity з препаративною колонкою Interchim US5HIA-100/212, 5 μ m.

ІЧ-спектроскопічне дослідження синтезованих сполук проводилося на приладі “Spektrum BX Perkin Elmer” у спектральному діапазоні 400 – 4000 cm^{-1} з використанням таблеток KBr.

Спектри ^1H -ЯМР та ^{13}C -ЯМР були записані на приладі Varian Mercury-400 і Bruker Avance DRX 500 спектрометрах з TMS (тетраметилсилан) як внутрішній стандарт і DMSO-d6 або CDCl_3 як розчинник.

Використані скорочення для опису спектрів:

с – синглет

д – дублет

т – триплет

кв – кuartет

м – мультиплет (мультиплетність розмита)

ушир. – уширений пік

XI – хімічна іонізація

Етил(4-формілфенокси)ацетат [139] **3**. *n*-Гідроксибензальдегід (20 г, 164 ммоль) змішують з етиловим естером бромцтової кислоти (27.3 г, 172 ммоль) в 150 мл сухого ДМФА, додають поташ (46 г, 333 ммоль), суміш лишають перемішуватись на ніч. Далі реакційну суміш виливають у воду (1 л), продукт екстрагують етилацетатом (3 рази по 200 мл), сушать над сульфатом натрію, після чого від сульфату позбавляються фільтруванням, етилацетат упарюють, отримують 25 г (120 ммоль) продукту **3**. Вихід становить 73%.

{4-[(1E)-3-(2-гідроксифеніл)-3-оксопроп-1-ен-1-іл]фенокси}оцтова кислота **4**. Етил(4-формілфенокси)ацетат (10 г, 48 ммоль) та 2-гідроксиацетофенон (6.5 г, 48 ммоль) додають в 250 мл етанолу, потім додають 250 мл 50% водного розчину КОН та ще 100 мл води для розчинення осаду. Суміш лишають перемішуватись добу. Після проходження реакції додають хлоридну кислоту до рН 1-2, а осад, що випав,

відфільтровують та сушать. Маса продукту 12 г (40 ммоль), вихід складає 83.3%.

[4-(3-гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-іл)фенокси]оцтова кислота [140]

5. Сполуку **4** (2 г, 6.7 ммоль) розчиняють в суміші 30 мл етанолу та 30 мл 10% водного розчину NaOH, після чого додають 1.6 мл 40% водного пероксиду водню. Суміш лишають перемішуватись годину, після чого додають хлоридну кислоту до рН 1-2. Продукт, що випав, відфільтровують, промивають етанолом та сушать. Отримують 800 мг (2.6 ммоль) сполуки **5**. Вихід 38%.

N-[2-(диметиламіно)етил]-2-[4-(3-гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-іл)фенокси]ацетамід 6. Кислоту **5** (100 мг, 0.3 ммоль) розчиняють в 30 мл ДМФА, додають 74 мг (0.46 ммоль) CDI, лишають перемішувати на ніч. На наступний день додають (2-аміноетил)диметиламін (40 мг, 0.45 ммоль), лишають на добу для повного проходження реакції. Максимально досуха упарюють ДМФА під вакуумом при 90°C, залишок перекристалізують з етанолу. Отримують 80 мг (0.21 ммоль) продукту. Вихід 70%. ¹H ЯМР (DMSO-d₆): δ 8,22 (м, 2H); 8,11 (с, 1H); 8,08 (м, 1H); 7,79 (м, 1H); 7,76 (м, 1H); 7,47 (м, 1H); 7,16 (м, 2H); 4,60 (с, 2H); 3,27 (м, 2H); 2,39 (м, 2H); 2,20 (с, 6H). ¹³C ЯМР (CDCl₃): 173,4; 167,9; 158,6; 155,2; 144,9; 138,2; 133,4; 129,6; 125,4; 124,4; 120,9; 118,1; 114,8; 107,4; 67,5; 57,8; 45,1; 36,5. (M⁺H) (XI): очікуваний 383, виявлений 383. C₂₁H₂₂N₂O₅ (382,15): розраховано С 65.96, Н 5.80, N 7.33, О 20.92; знайдено С 65.76, Н 5.85, N 7.38, О 21.01.

(2-{2-[4-(3-Гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-іл)-фенокси]-ацетиламіно}-етил)-триметиламоній йодид 7. Сполуку **6** (500 мг, 1.3 ммоль) розчиняють в 50 мл сухого ДМФА, додають метилйодид (222 мг, 1.56 ммоль), залишають перемішуватись на 2 дні за кімнатної температури (контроль ТШХ). Виливають реакційну суміш в десятикратний надлишок хлористого метилену, продукт відфільтровують, промивають, висушують. Одержують 654 мг (1.25 ммоль) продукту **7**. Вихід 96%. ¹H ЯМР (DMSO-

d6): δ 9,56 (с, 1H); 8,63 (с, 1H); 8,23 (д, $J = 8.4$ Гц, 2H); 8,12 (д, $J = 8.0$ Гц, 1H); 7,81 (с, 1H); 7,76 (д, $J = 8,2$ Гц, 1H); 7,48 (с, 1H); 7,19 (д, $J = 8,3$ Гц, 2H); 4,67 (с, 2H); 3,60 (д, $J = 4,1$ Гц, 2H); 2,55 (с, 9H). ^{13}C ЯМР (DMSO-d6): 173,2; 168,6; 159,1; 154,9; 145,8; 138,8; 134,1; 129,9; 125,3; 125,0; 124,9; 121,8; 118,8; 115,3; 67,4; 64,2; 53,1; 33,5. (M^+) (XI): очікуваний 397, виявлений 397. $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_5$ (397,44): розраховано С 66.48, Н 6.34, N 7.05, О 20.13; знайдено С 66.53, Н 6.32, N 7.10, О 20.05.

(2-{2-[4-(3-Гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-іл)-фенокси]-ацетиламіно}-етил)-диметил-(3-сульфо-пропіл)-амоній 8. Сполуку **6** (500 мг, 1.3 ммоль) розчиняють в 50 мл сухого ДМФА, додають пропансультон (250 мг, 2 ммоль), лишають перемішуватись протягом 5 годин при 80°C. Потім суміш охолоджують, упарюють ДМФА на 80%, відфільтровують осад, що випав, промивають, сушать. Отримують 603 мг (1.12 ммоль) продукту **8**. Вихід 92%. ^1H ЯМР (DMSO-d6): δ 9,51 (с, 1H); 8,52 (м, 2H); 8,22 (с, 1H); 8,11 (м, 2H); 7,77 (м, 1H); 7,47 (м, 1H); 7,18 (м, 2H); 4,67 (с, 2H); 3,59 (т, 2H); 3,48 (т, 2H); 3,42 (м, 2H); 3,01 (м, 2H); 2,50 (закритий розчинником); 2,02 (м, 2H). ^{13}C ЯМР (DMSO-d6): 173,2; 168,6; 159,2; 154,9; 145,9; 138,8; 134,0; 129,9; 125,2; 125,0; 124,9; 121,8; 118,8; 115,3; 95,9; 67,4; 63,2; 61,6; 51,1; 48,1; 19,4. (M^+) (XI): очікуваний 505, виявлений 505. $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}$ (504,55): розраховано С 57.13, Н 5.59, N 5.55, О 25.37, S 6.36; знайдено С 56.98, Н 5.64, N 5.55, О 25.42, S 6.41.

Діацетил-N-фенілдіетаноламін [141] 10. N-фенілдіетаноламін (18.1 г, 0.1 моль) розчиняють при нагріванні в 50 мл оцтового ангідриду. Через 2 години кип'ятіння реакційну суміш упарюють в вакуумі. Отримують 26.395 г продукту у вигляді темно-коричневого масла. Вихід 99.6%. ^1H ЯМР (CDCl₃): δ 7,20-7,24 (т, 2H, $J = 16$ Гц); 6,70-6,76 (м, 3H); 4,21-4,24 (т, 4H, $J = 12,5$ Гц); 3,59-3,63 (т, 4H, $J = 12,6$ Гц); 2,04 (с, 6H).

4-Формілдіацетил-N-фенілдіетаноламін [142] 11. У трьохгорлу колбу, обладнану крапельною лійкою, наливають діацетил-N-

фенілдіетаноламін (26.395 г, 0.1 моль), який розчиняють в 50 мл диметилформаміду при перемішуванні та підігрівують до 30°C. Після цього починають додавати PCl₅ (22.935 г, 0.11 моль). Розчин набуває темно-червоного забарвлення. Після того, як весь PCl₅ додано, ще 0.5 години витримують реакційну суміш при 60-70°C. В кінці розчин стає темно-зеленим. Дають охолонути та виливають на лід. Нейтралізують отриманий розчин лугом при охолодженні. Після цього залишають на ніч. Продукт утворюється у вигляді масла, яке екстрагують 3 порціями хлороформу або хлористого етилену по 100 мл. Розчинник упарюють у вакуумі. Отримують 20.5 г темно-коричневого масла. Вихід 70%. ¹H ЯМР (CDCl₃): δ 9,74 (с, Н); 6,82 (д, 2Н, J = 8,6 Гц); 7,74 (д, 2Н, J = 8,7 Гц); 4,26-4,29 (т, 4Н, J = 12,2 Гц); 3,71-3,74 (т, 4Н, J = 12,3 Гц); 2,04 (с, 6Н).

2-[4-[біс(2-гідроксиетил)аміно]феніл]-3-гідрокси-4Н-1-бензопіран-4-он 13 [143]. У колбу вносять альдегід **11** (5.385 г, 0.018 моль) та о-гідроксиацетофенон (2.5 г, 0.018 моль). Розчиняють їх у 25 мл метанолу при перемішуванні. Додають розчин лугу у воді (10 г NaOH в 15 мл води). Через 1.5-2 год. інтенсивного перемішування реакційна суміш перетворюється на пасту, яку залишають на ніч. Наступного дня утворену пасту розчиняють в 150 мл етанолу та додають до утвореного розчину 7 мл розчину лугу (1 г NaOH в 5 мл води). Реакційну суміш охолоджують до 15°C та додають при енергійному перемішуванні 7 мл H₂O₂. Суміш розігрівується до 50-60°C. Перемішування продовжують до повного охолодження реакційної суміші. Після цього розчин нейтралізують розбавленою сульфатною кислотою. Додають 100-150 мл води та залишають на ніч. Відфільтровують отриманий осад, промивають водою, висушують та перекристалізують з етанолу. Отримують 2.1 г чистого продукту у вигляді жовтих голочок. Вихід становить 29.8%. T_{пл} 184-186°C. ¹H ЯМР (DMSO-d₆): δ 8,78 (с, 1Н); 8,09 (д, J = 8,6 Гц, 3Н); 7,73 – 7,64 (м, 1Н); 7,61 (д, J = 8,2 Гц, 1Н); 7,38 (т, J = 7,3 Гц, 1Н); 6,81 (д, J = 8,9 Гц, 2Н); 3,62 (д, J = 5,6 Гц, 4Н); 3,54 (д, J = 5,3 Гц, 4Н).

^{13}C ЯМР (DMSO-d6): δ 172,5; 154,9; 149,9; 147,6; 137,8; 133,6; 129,5; 125,2; 124,6; 122,1; 118,7; 117,7; 111,4; 58,9; 53,8; 40,9; 40,3; 40,3; 39,3; (M^+H) (XI): очікуваний 342, виявлений 342. $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ (341,36): розраховано С 66.85, Н 5.61, N 4.10, O 23.43; знайдено 66.81, Н 5.65, N 4.16, O 23.38.

((4-(4-оксо-3-(тозилокси)-4Н-хромен-2-іл)феніл)азанеділ)біс(етан-2,1-діл) біс(4-метилбензенсульфонат) 14. Реакція проходить в двофазному середовищі – вода:дихлорометан. У 2 мл води додають КОН (600 мг), тетрабутиламоній хлорид (30 мг) та тозилхлорид (400 мг) у дихлорометані (2 мл). До цієї суміші поступово додають 4'-N,N-ди-(2-гідроксиетил)-3-гідроксифлавоон (200 мг). Через добу додають тозилхлорид (200 мг). Реакція проходить 2 доби. Після чого відділяють та упарюють органічний шар (попередньо додають дихлорометан і воду в реакційну суміш). Отримують 430 мг суміші продукту і залишків *n*-толуолсульфоїкислоти. Очищують продукт хроматографією на колонці в системі гексан:етилацетат 8:2 доки не вийде домішка, а потім вимивають продукт етилацетатом. Отримують 350 мг чистого продукту. Вихід 74.5%. $T_{\text{пл}} = 78^\circ\text{C}$. ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 8,00 (д, $J = 7,8$ Гц, 1H); 7,69 (д, $J = 6,3$ Гц, 4H); 7,59 – 7,44 (м, $J = 10,3$ Гц, 5H); 7,34 (д, $J = 8,2$ Гц, 1H); 7,21 (т, $J = 7,4$ Гц, 1H); 7,11 (д, $J = 7,7$ Гц, 6H); 6,29 (д, $J = 8,6$ Гц, 2H); 3,97 (с, 4H); 3,45 (с, 4H); 2,24 (с, 3H); 2,21 (с, 6H). ^{13}C ЯМР (DMSO-d6): δ 171,9; 159,3; 155,2; 149,4; 145,7; 135,2; 134,0; 132,6; 131,9; 130,7; 130,1; 128,5; 128,2; 126,9; 126,3; 125,8; 123,9; 119,0; 111,6; 67,9; 60,4; 49,3; 40,5; 40,4 – 40,4; 40,2; 40,0; 39,8; 39,6 – 39,4; 21,7; 21,4; (M^+H) (XI): очікуваний 804, виявлений 804. $\text{C}_{40}\text{H}_{37}\text{NO}_{11}\text{S}_3$ (803,92): розраховано С 59.76, Н 4.64, N 1.74, O 21.89, S 11.97; знайдено С 59.69, Н 4.66, N 1.75, O 21.91, S 11.99.

2-(4-(біс(2-азидоетил)аміно)феніл)-4-оксо-4Н-хромен-3-іл-4-метилбензенсульфонат 15. Сполуку **14** (500 мг) розчиняють у мінімальній кількості ДМФА та поступово, при перемішуванні додають азид натрію (81 мг). Витримують при 80°C протягом 5 годин. Екстрагують за допомогою

МТБЕ, упарюють і отримують 300 мг чистого продукту. Вихід 81% (варто зазначити, що вихід в даному випадку залежить від якості екстрагування, адже теоретично втрат не має бути). $T_{\text{пл}} = 87^{\circ}\text{C}$. ^1H ЯМР (DMSO-d_6): δ 8,08 (д, $J = 6,6$ Гц, 1H); 7,76 (д, $J = 8,8$ Гц, 3H); 7,70 (д, $J = 8,2$ Гц, 2H); 7,60 (д, $J = 8,1$ Гц, 1H); 7,45 (т, $J = 7,1$ Гц, 1H); 7,25 (д, $J = 7,9$ Гц, 2H); 6,76 (д, $J = 9,1$ Гц, 2H); 3,67 (д, $J = 5,5$ Гц, 4H); 3,58 (с, 4H); 2,43 (с, 3H). ^{13}C ЯМР (DMSO-d_6): δ 158,9; 149,7; 145,2; 142,2; 141,8; 134,7; 133,6; 132,1; 131,0; 130,3 – 129,1; 128,1; 126,6; 125,8; 125,4; 123,5; 122,9; 118,6; 113,5; 112,9 – 112,6; 111,6; 66,1; 53,4; 49,3; 48,3; 47,1; 40,9 – 39,9; 39,8; 39,5; 39,2; 30,0; 21,2. (M^+H) (XI): очікуваний 546, виявлений 546. $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{O}_5\text{S}$ (545,57): розраховано С 57.24, Н 4.25, N 17.97, О 14.66, S 5.88; знайдено С 57.31, Н 4.24, N 17.94, О 14.65, S 5.86.

2-(4-(біс(2-азидоетил)аміно)феніл)-3-гідрокси-4H-хромен-4-он 16.

Сполуку **15** (226 мг) розчиняють в 30 мл метанолу і додають поташ (635 мг). Кип'ятять впродовж 1.5 годин, дають охолонути та нейтралізують розведеною хлоридною кислотою. Отримують 160 мг продукту. Вихід 99%. $T_{\text{пл}} = 126^{\circ}\text{C}$. ^1H ЯМР (DMSO-d_6): δ 9,28 (с, 1H); 8,14 – 8,08 (м, 3H); 7,77 – 7,67 (м, 2H); 7,44 (с, 1H); 6,96 (д, $J = 8,3$ Гц, 2H); 3,64 (с, 4H); 3,56 (с, 4H). ^{13}C ЯМР (DMSO-d_6): δ 172,7; 154,9; 148,7; 147,2; 138,1; 133,8; 129,9; 125,3; 124,9; 122,1; 119,6; 118,8; 112,3; 49,7; 48,8; 40,5; 40,2; 40,1 – 40,1; 39,9; 39,6 – 39,4. (M^+H) (XI): очікуваний 392, виявлений 392. $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_7\text{O}_3$ (391,38): розраховано С 58.31, Н 4.38, N 25.05, О 12.26; знайдено С 58.34, Н 4.41, N 25.02, О 12.23.

(E)-3-(4-(біс(2-гідроксиетил)аміно)феніл)-1-(2-гідроксинафтален-1-іл)проп-2-ен-1-он 17. У 30% розчин КОН в метанолі додають 2-гідрокси-1-ацетонафтон (1 г, 5.1 ммоль) та витримують 20 хв. при 40°C . Після охолодження до кімнатної температури додають 2,2'-(4-формілфенілазанедііл)біс(етан-2,1-дііл)діацетат (1.5 г, 5.1 ммоль) та залишають на ніч. Підкислюють оцтовою кислотою до $\text{pH}=7$ та додають

воду. Оранжевий осад, що випав, перекристалізують з метанолу. Отримують 1.65 г продукту у вигляді оранжевих голок. Вихід 86%. $T_{\text{пл}} = 213\text{ }^{\circ}\text{C}$. ^1H ЯМР (DMSO- d_6): δ 10,02 (д, $J = 8,1$ Гц, 1H); 9,15 (с, 1H); 8,24 (д, $J = 7,4$ Гц, 1H); 8,13 (д, $J = 7,9$ Гц, 2H); 8,06 (д, $J = 7,4$ Гц, 1H); 7,78 (с, 2H); 7,65 (с, 1H); 6,87 (д, $J = 7,9$ Гц, 2H); 4,85 (с, 2H); 3,62 (с, 4H); 3,54 (с, 4H). ^{13}C ЯМР (DMSO- d_6): δ 173,9; 155,9; 149,8; 145,0; 139,5; 135,2; 130,5; 129,3; 126,9; 126,6; 118,8; 117,7; 114,3; 111,8; 58,9; 53,8; 40,9 – 40,8; 40,8 – 40,7; 40,7 – 40,1; 39,9; 39,9; 40,0 – 39,5; 39,5 – 39,3.

3-(4-(біс(2-гідроксиетил)аміно)феніл)-2-гідрокси-1H-бензо[*f*]хромен-1-он 18. У 50 мл 30% розчину КОН в системі метанол-вода (1:1) додають халкон **17** (1.65 г, 4.38 ммоль). Повільно, при охолодженні додають H_2O_2 (10 мл, 30%). Поступово випадає жовтий осад. Через 30 хв. реакційну суміш нейтралізують оцтовою кислотою до рН 7. Відфільтровують жовтий осад, який перекристалізують з метанолу. Отримують 550 мг продукту у вигляді жовтих голок. Вихід 27.5%. $T_{\text{пл}} = 225\text{ }^{\circ}\text{C}$. ^1H ЯМР (DMSO- d_6): δ 10,01 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H); 8,20 (д, $J = 8,5$ Гц, 1H); 8,11 (д, $J = 8,3$ Гц, 2H); 8,03 (д, $J = 7,9$ Гц, 1H); 7,77 (д, $J = 7,2$ Гц, 2H); 7,62 (т, $J = 7,3$ Гц, 1H); 6,85 (д, $J = 8,5$ Гц, 2H); 3,62 (д, $J = 5,5$ Гц, 4H); 3,53 (с, 4H). ^{13}C ЯМР (DMSO- d_6): δ 173,5; 155,4; 149,3; 144,5; 139,1; 134,7; 130,1; 129,3 – 128,2; 126,3; 120,9; 118,4; 117,2; 113,9; 111,3; 66,1; 58,4; 53,4; 47,4; 40,2; 40,0; 39,8; 39,4; 39,1; 38,9 – 38,5. (M^+H) (ХІ): очікуваний 392, виявлений 392. $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{NO}_5$ (391,42): розраховано С 70.58, Н 5.41, N 3.58, О 20.44; знайдено С 70.62, Н 5.38, N 3.58, О 20.42.

((4-(1-оксо-2-(тозилокси)-1H-бензо[*f*]хромен-3-іл)феніл)азанедііл)біс(етан-2,1-дііл) біс(4-метилбензенсульфонат) 19. Реакція проходить в двофазному середовищі – вода:дихлорометан. У 2 мл води додають КОН (600 мг), тетрабутиламоній хлорид (30 мг) та тозилхлорид (400 мг) у дихлорметані (2 мл). До цієї суміші поступово додають 3-гідроксифлавонон **18** (200 мг). Через добу додають тозилхлорид

(200 мг). Реакція проходить 2 доби. Після чого відділяють та упарюють органічний шар (попередньо додають дихлорметан і воду в реакційну суміш). Отримують 455 мг суміші продукту і залишків *n*-толуолсульфокислоти. Чистять продукт затираючи гексаном, фільтрують. Отримують 250 мг чистого продукту яскраво-жовтого кольору. Вихід 54%. $T_{\text{пл}} = 210\text{ }^{\circ}\text{C}$. ^1H ЯМР (DMSO- d_6): δ 9,85 (д, $J = 8,8$ Гц, 1H); 8,28 (д, $J = 8,7$ Гц, 1H); 8,03 (д, $J = 7,6$ Гц, 1H); 7,63-7,77 (м, 11H); 7,36 (д, $J = 7,6$ Гц, 4H); 7,28 (д, $J = 7,7$ Гц, 2H); 6,48 (д, $J = 8,5$ Гц, 2H); 4,13 (с, 4H); 3,63 (с, 4H); 2,42 (с, 9H). ^{13}C ЯМР (DMSO- d_6): δ 173,2; 156,4; 156,2; 148,8; 146,0 – 145,8; 145,3; 138,1; 136,4; 133,7; 133,1; 132,1; 130,5; 130,5 – 129,8; 129,6; 129,0; 128,4; 128,0; 127,1; 126,1; 125,8; 118,1; 116,2; 113,6; 111,7; 111,3; 67,6; 66,1; 48,9; 47,1; 40,4; 40,1; 39,6; 39,5; 39,5 – 39,1; 21,3; 21,1. (M⁺H) (XI): не інформативний. C₄₄H₃₉N₁₁S₃ (853,98): розраховано С 61.88, Н 4.60, N 1.64, О 20.61, S 11.26; знайдено С 61.83, Н 4.61, N 1.65, О 20.63, S 11.28.

3-(4-(біс(2-азидоетил)аміно)феніл)-1-оксо-1H-бензо[*f*]хромен-2-іл 4-метилбензенсульфонат 20. Сполуку **19** (590 мг, 0.65 ммоль) розчиняють в мінімальній кількості ДМФА та поступово, при перемішуванні додають азид натрію (85 мг, 1.3 ммоль). Витримують при 80 °С протягом 10 годин. Додають воду та відфільтровують, промивають невеликою кількістю спирту. Отримують 300 мг чистого продукту. Вихід 71%. $T_{\text{пл}} = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$. ^1H ЯМР (DMSO- d_6): δ 9,85 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H); 8,25 (д, $J = 9,0$ Гц, 1H); 8,01 (д, $J = 8,1$ Гц, 1H); 7,85 – 7,76 (м, 2H); 7,73 (д, $J = 7,9$ Гц, 4H); 7,64 (с, 1H); 7,28 (д, $J = 8,1$ Гц, 2H); 6,76 (д, $J = 8,6$ Гц, 2H); 3,67 (с, 4H); 3,58 (с, 4H); 2,44 (с, 3H). (M⁺H) (XI): очікуваний 596, виявлений 596. C₃₀H₂₅N₇O₅S (595,63): розраховано С 60.49, Н 4.23, N 16.46, О 13.43, S 5.38; знайдено С 60.50, Н 4.28, N 16.41, О 13.44, S 5.37.

3-(4-(біс(2-азидоетил)аміно)феніл)-2-гідрокси-1H-бензо[*f*]хромен-1-он 21. Сполуку **20** (200 мг) розчиняють в 30 мл метанолу і додають 464 мг поташу. Кип'ятять впродовж 1.5 годин, дають охолонути та нейтралізують

розведеною хлоридною кислотою. Отримують 153 мг продукту. Вихід 95.6%. $T_{\text{пл}} = 174^{\circ}\text{C}$. ^1H ЯМР (DMSO- d_6): δ 10,00 (д, $J = 8,8$ Гц, 1H); 9,20 (с, 1H); 8,26 (д, $J = 8,8$ Гц, 1H); 8,16 (д, $J = 8,1$ Гц, 2H); 8,08 (д, $J = 7,5$ Гц, 1H); 7,86 – 7,74 (м, 2H); 7,67 (с, 1H); 6,99 (д, $J = 8,3$ Гц, 2H); 3,68 (с, 4H); 3,57 (с, 4H). (M^+H) (XI): очікуваний 442, виявлений 442. $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_3$ (441,44): розраховано С 62.58, Н 4.34, N 22.21, О 10.87; знайдено С 62.58, Н 4.40, N 22.17, О 10.85.

N-(4-формілфеніл)-*N*-метилгліцин **24b** [144]. До суміші *N*-метилгліцину (16.6 г, 0.186 моль) та поташу (53.6 г, 0.388 моль) в 200 мл сухого ДМФА додають *n*-флуоробензальдегід (19.28 г, 0.155 моль). Суміш залишають перемішуватись при 45°C на ніч. Після проходження реакції суміш розбавляють водою до загального об'єму 1000 мл та підкислюють до рН 3 хлоридною кислотою. Осад відфільтровують, промивають водою та сушать у вакуумі при 50°C . Вихід становить 28.2 г (94%). ^1H ЯМР (DMSO- d_6): 12,66 (с, ушир. 1H); 9,65 (с, 1H); 7,65 (д, $J = 8.6$ Гц, 2H); 6,72 (д, $J = 8.6$ Гц, 2H); 4,17 (с, 2H); 3,11 (с, 4H). (M^+) (XI): очікуваний 194, виявлений 194.

N-{4-[(1*E*-3-(2-гідроксифеніл)-3-оксопроп-1-ен-1-іл]феніл}-*N*-метилгліцин **26**. До суміші отриманого на попередній стадії альдегіду **24b** (23.6 г, 0.122 моль) та ацетофенону (2.5 г, 12.85 ммоль) додають 50 мл 10% водного розчину КОН. Реакційну суміш залишають перемішуватись при кімнатній температурі на ніч. У випадку відсутності вихідних речовин, халкон **26** вводять в наступну стадію без виділення. (M^+) (XI): очікуваний 312, виявлений 312.

N-[4-(3-гідрокси-4-оксо-4*H*-хромен-2-іл)-феніл]-*N*-метилгліцин [145] **27**. До розчину халкону **26** в 50 мл 10% водного розчину КОН додають 2 мл 30% водного пероксиду водню. Суміш лишають перемішуватись годину, після чого підкислюють хлоридною кислотою до рН 1-2. Продукт відфільтровують, промивають водою та сушать. Отримують 1.1 г продукту **27**. Вихід 42%. ^1H ЯМР (DMSO- d_6): δ 3,07 (с, 3H); 4,20 (с, 2H); 6,81 (м, 2H);

7,42 (м, 1H); 7,72 (м, 2H); 8,08 (м, 3H); 9,20 (с, 1H); 12,68 (ушир., 1H). (M⁺) (XI): очікуваний 326, виявлений 326. C₁₈H₁₅NO₅ (325,32): розраховано С 66.46, Н 4.65, N 4.31, О 24.59; знайдено С 66.51, Н 4.64, N 4.30, О 24.55.

*N*²-[4-(3-гідрокси-4-оксо-4H-хромен-2-іл)-феніл]-N²-метил-N-пропан-2-ілгліцинамід **28**. Кислоту **27** (530 мг, 1.64 ммоль) розчиняють в 5 мл сухого ДМФА, додають CDI (290 мг, 1.80 ммоль), витримують 30 хв в ультразвуковій бані при 20-30°C та додають ізопропіламін (195 мг, 3.27 ммоль). Реакційну суміш лишають при перемішуванні на ніч, наступного дня виливають у 50 мл води. Осад відфільтровують, промивають водою та метанолом, сушать на повітрі. Отримують 388 мг продукту. Вихід 64.7%. ¹H ЯМР (DMSO-d₆): 1,06 (д, 6H); 3,07 (с, 3H); 3,87 (м, 1H); 3,98 (с, 2H); 4,05-4,20 (ушир., 1H); 6,77 (д, 2H); 7,43 (т, 1H); 7,72 (м, 2H); 7,84 (д, 1H); 8,09 (т, 3H). (M⁺) (XI): очікуваний 367, виявлений 367. C₂₁H₂₂N₂O₄ (366,41): розраховано С 68.84, Н 6.05, N 7.65, О 17.47; знайдено С 68.89, Н 6.10, N 7.60, О 17.41.

2-{[4-(3-гідрокси-4-оксо-4H-хромен-2-іл)феніл](метил)аміно}-N-{2-[4-(3-гідрокси-4-оксо-4H-хромен-2-іл)феніл]-4-оксо-8,11-діокса-2,5-дiazатридекан-13-іл}ацетамід **30**. Кислоту **27** (530 мг, 1.64 ммоль) розчиняють в 5 мл сухого диметилацетаміду (DMAA), додають CDI (290 мг, 1.80 ммоль), витримують 30 хв в ультразвуковій бані при 30-40°C та додають діамін **29f** (97 мг, 0.66 ммоль). Реакційну суміш лишають при перемішуванні на 3 дні в масляній бані при 100°C. Після чого виливають в 100 мл води. Осад відфільтровують, промивають водою, сушать на повітрі. Очистку продукту виконують за допомогою обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії (розчиняють зразок в 3 мл ДМСО та проводять градієнтне елюювання 40-50% H₂O/MeCN [0-5 хв]). Отримують 100 мг чистого продукту. Вихід 20%. ¹H ЯМР (DMSO-d₆): δ 9,20 (с, 2H); 8,09 (т, *J* = 8,3 Гц, 6H); 8,01 (с, 2H); 7,71 (с, 4H); 7,43 (т, *J* = 7,2 Гц, 2H); 6,77 (д, *J* = 9,0 Гц, 4H); 4,02 (с, 4H); 3,49 (с, 4H); 3,41 (с, 4H); 3,33 (с,

6H); 3,22 (с, 4H). ^{13}C ЯМР (DMSO- d_6): 39,0; 39,6; 55,6; 69,5; 70,0; 111,9; 118,6; 118,9; 121,9; 124,7; 125,1; 129,3; 133,5; 137,8; 147,1; 150,7; 154,7; 169,7; 172,5. (M^+) (XI): очікуваний 763, виявлений 763. $\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_{10}$ (762,80): розраховано С 66.13, Н 5.55, N 7.34, О 20.97; знайдено С 66.13, Н 5.55, N 7.34, О 20.97.

2-(4-формілфенокси)оцтова кислота 32 [146]. До *n*-гідроксибензальдегіду (1 г, 8.2 ммоль) розчиненого в ацетоні (15 мл) додають поташ (2.5 г, 16.4 ммоль) і кип'яють 15 хвилин при температурі 40°C. Потім невеликими порціями додають бромцтову кислоту (1.71 г, 12.3 ммоль). Залишають перемішуватись при температурі кипіння розчинника протягом 18 годин. Виділення продукту проводять в декілька стадій. Спочатку реакційну суміш упарюють на роторі, потім сухий залишок розчиняють у воді та екстрагують етилацетатом, потім підкислюють до рН 2 і знову екстрагують етилацетатом. Вихід 85%. ^1H ЯМР (DMSO- d_6): δ 4,71 (с, 2H); 7,03 (д, $J = 8,8$ Гц, 2H); 7,80 (д, $J = 8,8$ Гц, 2H); 9,83 (с, 1H).

(E)-2-(4-(3-(2-гідроксифеніл)-3-оксопроп-1-еніл)фенокси)оцтова кислота 33. Сполуку **32** (0.5 г, 2.77 ммоль) розчиняють в 40% розчині КОН в метанолі. Після її повного розчинення додають по краплинах 2-гідроксиацетофенон (0.457 г, 3.33 ммоль). Халкон виділено з реакційної суміші для ідентифікації. $T_{\text{пл}}=247^\circ\text{C}$. Для виділення реакційну суміш нейтралізують оцтовою кислотою, починає випадати осад жовтого кольору. Осад, що утворився, відфільтровують, перекристалізують з метанолу. Вихід 33.5%. ^1H ЯМР (DMSO- d_6): δ 12,79 (с, 2H); 8,27 (д, $J = 8,3$ Гц, 1H); 7,92 – 7,80 (м, 4H); 7,59 – 7,52 (м, 1H); 7,02 – 6,94 (м, 4H); 4,57 (с, 2H). ІЧ-спектр (табл. КВr), cm^{-1} : 3428 (OH); 3085 (C-H, аром.); 2923 (C-H, sp^3); 1692, 1640 (C=O); 1600-1422 (C=C, sp^2 і аром.); 1204-1022, 847-717 (деф. колив. аром.); 1272-1244 (C-O).

2-(4-(3-гідрокси-4-оксо-4H-хромен-2-іл)фенокси)оцтова кислота 34. Халкон **33** (5 г, 16.78 ммоль) розчиняють у суміші метанол-вода (20:20 мл),

що містить 40% КОН (16 г, 285.7 ммоль). Після остаточного розчинення реакційну суміш охолоджують в водяній бані з льодом і додають по краплинах пероксид водню (35%, 5 мл). Реакційну суміш залишають на 30 хвилин за кімнатної температури. Для виділення 3-гідроксифлавону реакційну суміш підкислюють до рН=4 концентрованою хлоридною кислотою при охолодженні так, щоб температура не піднімалась вище 60°C. Випадає осад світло-коричневого кольору. Вихід 40%. ¹Н ЯМР (DMSO-d₆): δ 8,18 (д, J = 7,5 Гц, 2H); 8,12 (д, J = 7,6 Гц, 1H); 7,80 – 7,76 (м, 1H); 7,74 – 7,72 (м, 1H); 7,48 – 7,44 (м, 1H); 7,11 (д, J = 8,4 Гц, 2H); 4,72 (с, 2H). ІЧ-спектр (табл. KBr), см⁻¹: 3449 (ОН); 3030 (С-Н, аром.); 2985-2800 (С-Н, sp³); 1736-1677 (С=О); 1606-1427 (С=С sp², аром.); 1176-1015, 901-696 (деф. колив. аром.); 1300-1248 (С-О).

1,4-біс[2-(4-(3-гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-іл))фенокси-ацетиламідо]бутан 35. Сполуку **34** (1 г, 3.2 ммоль) розчиняють в ДМФА (100 мл) та кип'яють із СДІ (0.779 г, 48.39 ммоль) протягом 1 години зі зворотним холодильником. Після цього додають 1,4-діамінобутан (0.071 г, 0.8 ммоль) і нагрівають протягом 6 годин. Упарюють ДМФА, розчиняють сухий залишок в дихлорометані і промивають його кілька разів розчином лимонної кислоти. Органічний шар сушать над сульфатом натрію і упарюють. Отримують 110 мг продукту. Вихід 21%. ¹Н ЯМР (DMSO-d₆): δ 9,17 (с, 2H); 8,20 (д, J = 7,2 Гц, 4H); 8,10 (д, J = 7,6 Гц, 2H); 8,00 (с, 2H); 7,66 (д, J = 26,9 Гц, 4H); 7,42 – 7,34 (м, 2H); 7,08 (д, J = 7,4 Гц, 4H); 4,50 (с, 2H); 3,19 (с, 3H); 1,50 (с, 3H). ІЧ-спектр (табл. KBr), см⁻¹: 3429 (ОН); 3372 (NH); 3109-3070 (С-Н аром.); 2930-2860 (СН sp³); 1655-1650 (С=О); 1606-1410 (С=С sp², аром.); 1119-1013 (С-Н); 1288-1013, 992-606 (деф. аром.). (M⁺) (ХІ): очікуваний 677, виявлений 677. С₃₈Н₃₂Н₂О₁₀ (676,67): розраховано С 67.45, Н 4.77, N 4.14, О 23.64; знайдено С 67.38, Н 4.81, N 4.19, О 23.62.

Метил-2-(3-ацетил-4-гідроксифенокси)ацетат 37 [147]. 2,5-Дигідроксиацетофон (1 г, 6.58 ммоль) розчиняють в тетрагідрофурані (30

мл), додають KI (0.11 г, 0.66 ммоль) та поташ (1 г, 6.58 ммоль). До даної суміші додають по краплинам метиловий естер хлороцтової кислоти (0.857 г, 7.9 ммоль) і залишають на ніч при температурі кипіння розчинника. Потім реакційну суміш упарюють, сухий залишок розчиняють у воді і екстрагують етилацетатом. Органічний шар сушать над сульфатом натрію і знову упарюють. Вихід 88%. Проводять очистку застосовуючи колонкову хроматографію в системі дихлорометан:етилацетат 95:5. ¹H ЯМР (DMSO-d₆): δ 2,62 (с, 3H); 3,73 (с, 3H); 4,70 (с, 2H); 6,85 (д, J = 9,2 Гц, 1H); 7,17 – 7.11 (м, 1H); 7,33 (с, 1H); 11,58 (с, 1H).

2-(4-(диметиламіно)феніл)-3-гідрокси-6-(2-оксо-2-(піролідин -1-іл)етокси)-4H-хромен-4-он 38. Ацетофенон **37** (0.2 г, 0.89 ммоль) розчиняють в етанолі (20 мл). В цю суміш додають піролідин (0.19 г, 2.68 ммоль), а потім при постійному перемішуванні додають *n*-диметиламінобензальдегід (0.133 г, 0.89 ммоль). Реакцію залишають перемішуватись на ніч без нагрівання. Осад відфільтровують і промивають водою. Проводять перекристалізацію з етанолу. Вихід 84%. ¹H ЯМР (DMSO-d₆): δ 9,10 (с, 1H); 8,15 (д, J = 8,7 Гц, 2H); 7,72 (д, J = 8,7 Гц, 1H); 7,42 (д, J = 8,9 Гц, 2H); 6,88 (д, J = 8,9 Гц, 2H); 4,90 (с, 2H); 3.55 (т, J = 6.6 Гц, 2H); 3.42 – 3.30 (м, 6H); 3.21 (с, 2H); 2.00 – 1.89 (м, 2H); 1.87 – 1.78 (м, 2H). ¹³C ЯМР (DMSO) δ: 26,4; 45,5; 46,3; 67,4; 106,3; 112,6; 118,7; 120,2; 122,5; 123,5; 128,5; 137,5; 150,0; 151,6; 155,4; 166,0; 172,2. ІЧ-спектр (табл. KBr), см⁻¹: 3399 (OH); 3214-3075 (C-H аром.); 2951-2815 (C-H, sp³); 1764-1650 (C=O); 1603-1413 (C=C sp², аром.); 1109-1038 (C-N); 1204-1038, 943-744 (деф. колив. аром.); 1278-1223 (C-O).

2-(2-(4-(диметиламіно)феніл)-3-гідрокси-4-оксо-4H-хромен-6-ілокси)оцтова кислота 39. До сполуки **38** (1 г, 2.45 ммоль) в спиртово-водному розчині (30 мл етанолу і 15 мл води, що містить 30% KOH) при охолодженні додають по краплинам перекис водню (35%, 5 мл). Реакційну суміш залишають перемішуватись на ніч. Продукт виділяють, підкислюючи

реакційну суміш хлоридною кислотою. Осад відфільтровують. Вихід 35.5%. ^1H ЯМР (DMSO-d_6): δ 2,96 (с, 6H); 4,78 (с, 2H); 6,77 (д, $J = 7,2$ Гц, 2H); 7,34 (д, $J = 10$ Гц, 2H); 7,68 (д, $J = 7,6$ Гц, 1H); 8,06 (д, $J = 7,6$ Гц, 2H); 9,10 (с, 1H). ^{13}C ЯМР (DMSO-d_6): δ 65,7; 105,6; 112,0; 118,6; 120,4; 122,5; 123,5; 129,6; 137,6; 147,4; 149,9; 151,6; 154,9; 170,7; 172,1. ІЧ-спектр (табл. KBr), cm^{-1} : 3417-3337 (OH); 3040-3020 (C-H аром.); 2921-2517 (C-H sp^3); 1760-1712 (C=O); 1613-1413 (C=C sp^2 , аром.); 1267-1204 (C-O); 1109-1029 (C-N); 1333-1029, 944-626 (деф. колив. аром.).

1,4-біс-[2-(4-(диметиламіно)феніл)-3-гідрокси-4-оксо-4H-хромен-6-ілокси)ацетиламідобутан 40 [148]. 3-гідроксифлавоон **39** (0.35 г, 1 ммоль) розчиняють в ДМФА (30 мл) та кип'яють із CDI (0.25 г, 1.5 ммоль) протягом 1 години зі зворотним холодильником. Після цього додають 1,4-діамінобутан (0.03 г, 0.25 ммоль) і нагрівають протягом 12 годин. Потім упарюють ДМФА, розчиняють сухий залишок в дихлорометані і промивають його кілька разів розчином лимонної кислоти. Органічний шар сушать над сульфатом натрію і упарюють. Очищують від домішок відмиваючи етанолом. Отримують 120 мг продукту. Вихід 64%. ^1H ЯМР (DMSO-d_6): δ 1,44 – 1,35 (м, 8H); 3,01 (с, 16H); 3,14 (с, 6H); 4,59 (с, 4H); 6,74 (д, $J = 8$ Гц, 4H); 7,37 (д, $J = 8$ Гц, 2H); 7,45 (с, 3H); 7,55 (д, $J = 8$ Гц, 2H); 8,00 (с, 2H); 8,08 (д, $J = 8$ Гц, 5H); 8,68 (с, 1H). (M^+) (XI): очікуваний 763, виявлений 763. $\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_{10}$ (762,80): розраховано С 66.13, Н 5.55, N 7.34, О 20.97; знайдено С 66.20, Н 5.55, N 7.30, О 20.94.

Біс(3-ацетил-4-гідроксифеніл)метан [138] **41**. Крізь суміш о-гідроксиацетофенону (5 г, 36.7 ммоль) з формальдегідом (0.55 г, 18.3 ммоль) у 15 мл оцтової кислоти пропускають хлороводень, одержаний шляхом додавання концентрованої сульфатної кислоти до хлориду натрію. По закінченню реакції, реакційну суміш виливають на лід. Утворений осад відфільтровують та промивають водою. Отримують 1.3 г продукту світло-бежевого кольору. Вихід 25%. $T_{\text{пл}} = 143^\circ\text{C}$. ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 12,20 (с, 2H);

7,49 (д, $J = 2,2$ Гц, 2H); 7,27 (дд, $J = 8,6$ Гц, 2H); 6,92 (д, $J = 8,6$ Гц, 2H); 3,90 (с, 2H); 2,60 (с, 6H) [149].

6,6'-Метиленбіс(2-(4-(диметиламіно)феніл)-3-гідрокси-4H-хромен-4-он) 44. До **41** (0.2 г, 0.7 ммоль) у 30% розчині КОН в метанолі додають 4-(диметиламіно)бензальдегід (0.21 г, 1.4 ммоль) та залишають перемішуватись за кімнатної температури протягом 48 годин. Утворення халкону фіксують за допомогою ТШХ у системі етилацетат:метанол 8:2. Реакційну суміш охолоджують льодом, додають по краплинам перексид водню (2 мл) та лишають перемішуватись протягом 30 хв. Для виділення продукту, при охолодженні додають хлоридну кислоту до рН 1-2, відфільтровують неорганічний осад, що утворився. З фільтрату випадає осад **44**. Отримують 0.12 г продукту з чистотою 64% за хромас-аналізом. Очистку виконують за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії на прямій фазі (розчиняють зразок у хлороформі та проводять градієнтне елювання 0-50% $H_2O/MeCN$ [1.3-8.3 хв]). Отримують 104 мг чистого продукту. Вихід 26%. 1H ЯМР ($CDCl_3$): δ 8,19 (д, $J = 8,5$ Гц, 4H); 8,10 (с, 2H); 7,49 (с, 4H); 6,81 (д, $J = 8,0$ Гц, 4H); 4,22 (с, 2H); 3,08 (с, 12H). (M^+) (XI): очікуваний 574, виявлений 574. $C_{35}H_{30}N_2O_6$ (574,62): розраховано С 73.16, Н 5.26, N 4.88, О 16.71; знайдено С 73.23, Н 5.25, N 4.84, О 16.67.

6,6'-метиленбіс(2-(4-(біс(2-гідроксиетил)аміно)феніл)-3-гідрокси-4H-хромен-4-он) 48. До розчину **41** (1 г, 3.5 ммоль) у 30%-ому лужному (КОН) метанольному розчині (30мл) додають 4-формілдіацетил-N-фенілдіетаноламін **11** (2.1 г, 7.1 ммоль) та залишають перемішуватись за кімнатної температури протягом 48 годин. Утворення халкону фіксують за допомогою ТШХ у системі етилацетат:метанол 8:2. Реакційну суміш охолоджують льодом, поступово додають по краплинам перексид водню (3 мл) та лишають перемішуватись протягом 30 хв. Для виділення продукту, при охолодженні додають хлоридну кислоту до рН 1-2, відфільтровують

неорганічний осад, що утворився. З фільтрату поступово випадає осад **48**. Отримують 1.5 г продукту з чистотою 78%. Очистку виконують за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії на прямій фазі (розчиняють зразок в хлороформі та проводять градієнтне елюювання 0-50% H₂O/MeCN [1.3-8.3 хв]). Отримують 1.5 г чистого продукту. Вихід 62%.
¹H ЯМР (DMSO-d₆): δ 9,10 (с, 2H); 8,06 (д, *J* = 8,8 Гц, 4H); 7,96 (с, 2H); 7,65 (с, 4H); 6,83 (д, *J* = 8,9 Гц, 4H); 4,83 (с, 4H); 4,25 (с, 2H); 3,58 (с, 8H); 3,51 (с, 8H). ¹³C ЯМР (DMSO-d₆): δ 172,2; 153,4; 149,7; 147,3; 137,7; 121,8; 117,8; 58,6; 53,6. (M⁺) (X): очікуваний 694, виявлений 694. C₃₉H₃₈N₂O₁₀ (694,73): розраховано С 67.42, Н 5.51, N 4.03, О 23.03; знайдено С 67.40, Н 5.53, N 4.05, О 23.01.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ДО РОЗДІЛУ 3

128. Williams R. J., Spencer J. P. E., Rice-Evans C. Flavonoids: Antioxidants or Signalling Molecules? *Free Radical Biology and Medicine*. **2004**, 36, 7, 838–49.
129. Quideau S. Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications. *Angewandte Chemie International Edition*. **2006**, 45, 41, 6786–87.
130. Oyamada T. A New General Method for the Synthesis of Derivatives of Flavonol. *Journal of the Chemical Society Japan*, **1935**, 10, 1904, 182–86.
131. Algar J., Flynn J. P. A New Method for the Synthesis of Flavonols. *Proceedings of the Royal Irish Academy. Section B: Biological, Geological and Chemical Science*. **1934**, 42, 1–8.
132. Meth-cohn O., Stanforth S. P. The Vilsmeier-Haack Reaction. *Comprehensive Organic Synthesis*. **1991**, 2, 1, 777–94.
133. Vilsmeier A., Haack A. Uber Die Einwirkung von Halogenphosphor Auf Alkyl-Formanilide. Eine Neue Methode Zur Darstellung Sekundarer Und Tertiärer P-Alkylamino-Benzaldehyde. *Chemische Berichte*. **1927**, 60, 119–22.
134. Chen C. W., Whitlock H. W. Molecular Tweezers: A Simple Model of Bifunctional Intercalation. *Journal of the American Chemical Society*. **1978**, 100, 15, 4921–22.
135. Xu Z., Singh N. J., Lim J., Pan J., Kim H. N., Park S., Kim K. S., Yoon J. Unique Sandwich Stacking of Pyrene-Adenine-Pyrene for Selective and Ratiometric Fluorescent Sensing of ATP at Physiological pH. *Journal of the American Chemical Society*. **2009**, 131, 42, 15528–33.
136. Tang J.-L., Li C.-Y., Li Y.-F., Zou C.-X. A Ratiometric Fluorescent Probe with Unexpected High Selectivity for ATP and Its Application in Cell Imaging. *Chemical Communications*. **2014**, 50, 97, 15411–14.
137. Zimmerman S. C., Wu W. A Rigid Molecular Tweezer with an Active Site Carboxylic Acid: An Exceptionally Efficient Receptor for Adenine in an

- Organic Solvent. *Journal of the American Chemical Society*. **1989**, 111, 20, 8054–55.
138. Cairns H., Fitzmaurice C., Hunter D., Johnson P. B., King J., Lee T. B., Lord G. H., Minshull R., Cox J. S. G. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Disodium Cromoglycate and Some Related Compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1972**, 15, 6, 583–89.
139. Robertson D. N. Ethyl 4-Formylphenoxyacetate. *Journal of Organic Chemistry*. **1956**, 21, 5, 4702.
140. Zamotaiev O. M., Postupalenko V. Y., Shvadchak V. V., Pivovarenko V. G., Klymchenko A. S., Mély Y. Improved Hydration-Sensitive Dual-Fluorescence Labels for Monitoring Peptide-Nucleic Acid Interactions. *Bioconjugate Chemistry*. **2011**, 22, 1, 101–7.
141. Petrov K. D., Tal'kovskii G. B. *Zhurnal Prikladnoi Khimii (Sankt-Peterburg, Russian Federation)*. **1952**, 25, 1225-7.
142. Hickmott P. W. Reactive Dyes - Preparation of Substituted Styrylpyrimidines and Styryl-S-Triazines. *Journal of Applied Chemistry*. **1966**, 16, 8, 227–29.
143. M'Baye G., Martyloga O. V., Duportail G., Pivovarenko V. G. 3-Hydroxy-4'-[Di-(2-Hydroxyethyl)amino]flavone as a New Step in Search of an Ideal Membrane Ratiometric Fluorescent Probe. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. **2006**, 184, 1–2, 113–24.
144. GB 790023. Agfa A.-G. fur Photofabrikation. **1958**.
145. Pivovarenko V. G., Tuganova A. V., Klimchenko A. S., Demchenko A. P. Flavonols as models for fluorescent membrane probes. I. The response to the charge of micelles. *Cellular & Molecular Biology Letters*. **1997**, 2, 4, 355-364.
146. Cavallini G., Ravenna F. Thiosemicarbazones. II. *Farmaco (1946-1952)*. **1951**, 6, 145-9.
147. Wencai H., Gang L., Lingling W. Synthesis of benzopyran-4-one derivatives and their bone affinity. *Zhongguo Yaowu Huaxue Zazhi*. **2003**, 13, 1, 8-11.

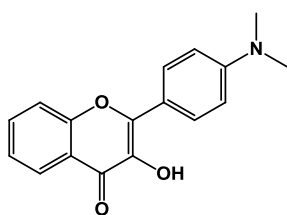
148. Бугера О. І., Нетребчук А. П., Пивоваренко В. Г. Дизайн та синтез молекулярного пінцету для детекції АТФ на основі 3-гідроксифлавону. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка*. **2017**, 2, 54, 67.
149. Barba V., Betanzos I. Direct Synthesis of Polymacrocyclic Boron Compounds. A Convenient Method for the Synthesis of Hemicarcerands, *Journal of Organometallic Chemistry*. **2007**, 692, 22, 4903–8.

РОЗДІЛ 4

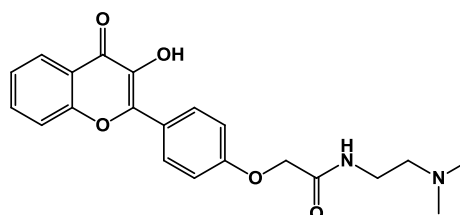
ЕЛЕКТРОФЛУОРОХРОМНИЙ ВПЛИВ АНІОНА АТФ НА ФЛУОРЕСЦЕНЦІЮ КАТІОННИХ ТА ЦВІТТЕР-ІОННИХ ФЛАВОНОЛІВ

В експериментах з барвником FME [55, 101] (**1**) було виявлено значну різницю між формами спектрів поглинання та збудження в присутності АТФ. Таке спостереження вказує на відмінності у квантовому виході флуоресценції для популяцій молекул барвника, збуджених на максимумі та на червоному краї смуги поглинання.

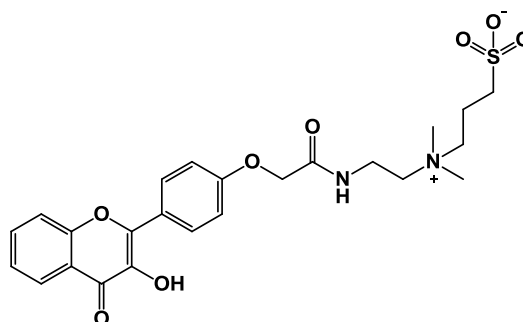
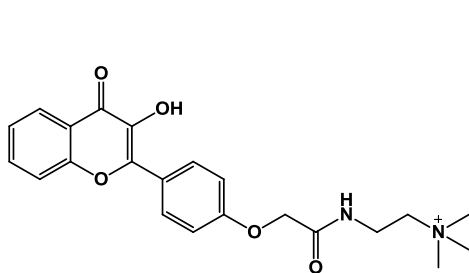
З метою встановлення природи цього ефекту, та беручи до уваги позитивний вплив електростатичних взаємодій на міцність комплексу флавонол-АТФ, нами було синтезовано три катіонні та цвіттер-іонні похідні 3-гідроксифлавону **6–8**. Обговорення синтезу та доведення будови одержаних сполук представлено у розділі 3.



1



6



4.1. Спектри поглинання

Збільшення концентрації АТФ у розчині барвника **1** веде до зниження оптичної густини на 40% та до невеликого (6 нм) червоного зсуву максимуму смуги і утворення нової смуги низької інтенсивності при 480 нм (Рис. 4.1 А). Ці ефекти раніше були пов'язані з послідовним утворенням двох комплексів барвник-АТФ стехіометрії 1:1 та 1:2 [101]. У поточних умовах дослідження ізобестична точка, зафіксована при 452 нм, може свідчити про утворення єдиного комплексу, що має стехіометрію 1:1.

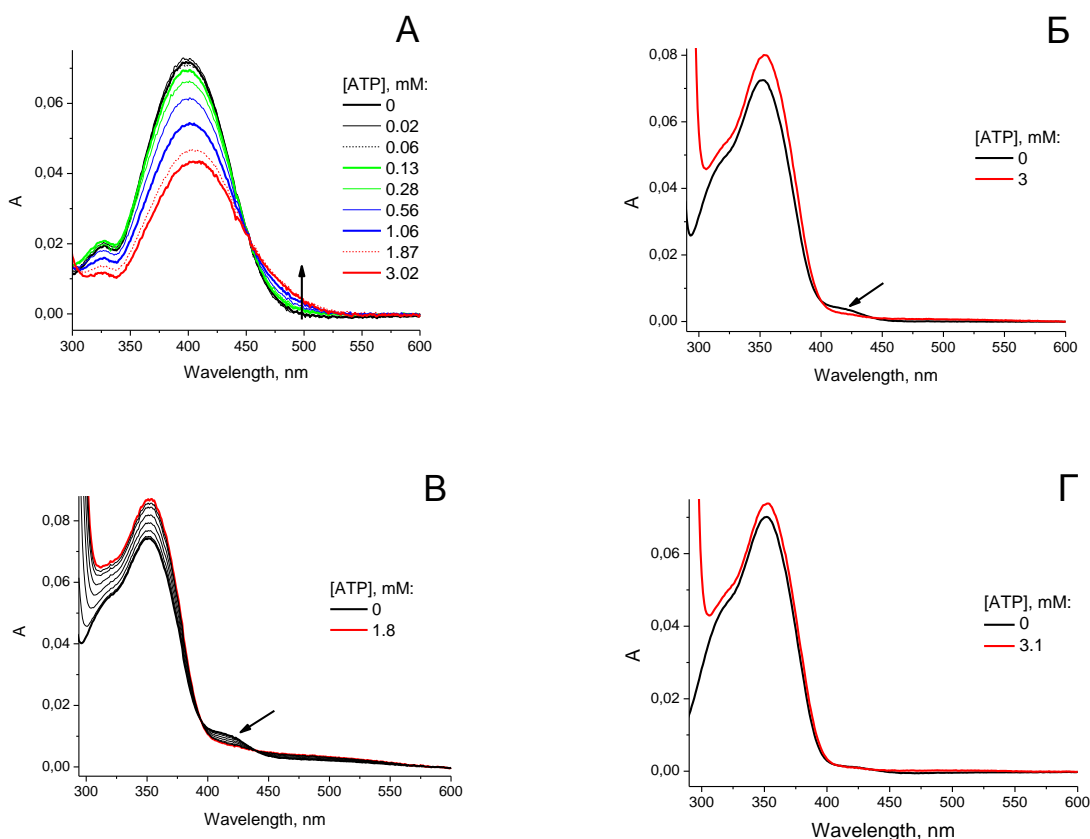


Рис. 4.1. Зміни у спектрах поглинання барвника **1** при збільшенні концентрації АТФ (А), $\lambda_{em} = 558$ нм. Спектри поглинання барвників **6** (Б), **7** (В) та **8** (Г) у відсутності та присутності АТФ.

На відміну від барвника **1**, заряджені похідні **6–8** у присутності АТФ демонструють незначне (5-10%) збільшення поглинання замість

гіпохромного ефекту (Рис. 4.1 Б-Г). Плече при 420 нм, присутнє в спектрах вільних барвників **6** та **7**, яке раніше пов'язували з аніонною формою флавонолів [150, 151], зникає в присутності АТФ, що свідчить про зменшення основності середовища барвника в комплексі. На відміну від цього ефекту, у випадку барвника **1** інтенсивність смуги при 480 нм у присутності АТФ збільшується. Раніше це пояснювали утворенням аніонної форми барвника [101]. За цими ознаками ми можемо припустити, що компоненти в комплексах з АТФ барвників **6–8** мають критично різні орієнтації, якщо порівнювати їх з комплексами барвника **1**. Зменшення інтенсивності смуги поглинання аніонної форми вказує на віддалення у просторі 3-ОН груп барвників та основних груп АТФ. Відсутність гіпохромного ефекту може бути результатом відсутності стекінг-взаємодій між залишком аденіну та планарними ароматичними частинами барвників **6–8**. Виходячи з таких спостережень можна припустити, що хромофор барвника та аденінова частина АТФ мають віддалені положення у комплексі барвник-АТФ.

4.2. Спектри флуоресценції

Флавоноли належать до барвників, що демонструють двосмугову флуоресценцію у розчинах за рахунок внутрішньомолекулярного перенесення протону в збудженому стані (*англ.* excited state intramolecular proton transfer, ESIPT) [152]. Проте вода сильно інгібує ESIPT [151, 153], що дозволяє спостерігати флуоресценцію лише однієї форми. У випадку барвника **1** його максимум флуоресценції знаходиться при 549 нм, а для барвників **6–8** – при 430 нм (Рис. 4.2). Залишкова флуоресценція другої емісійної форми може бути зафіксована для барвників **6–8** як плече при 510 нм. Цікаво, що спектри випромінювання барвників **6–8** добре співпадають за формою та положенням у спектрі як за відсутності, так і в присутності АТФ. У присутності АТФ ефекти у спектрах емісії флуоресценції є однаковими для всіх барвників. Смуга комплексу барвника з АТФ

зміщується у червону ділянку на 9 нм для барвника **1** і на 35 нм для сполук **6–8**. Поява АТФ у розчині супроводжується збільшенням інтенсивності флуоресценції, що свідчить про утворення комплексу. Селективне збудження на червоному краї спектра поглинання дозволяє отримати індивідуальну смугу флуоресценції комплексу з максимумом, розташованим при 558 нм (барвник **1**) або при 465 нм (барвники **6–8**), тоді як збудження на максимумі поглинання комплексу АТФ дає додаткову смугу, що за положенням співпадає зі смугою емісії вільного барвника. Така сильна залежність спектра емісії від довжини хвилі збудження свідчить про утворення декількох комплексів, імовірно, однакової стехіометрії, але з різною орієнтацією компонентів, де відстань флуорофорної частини зонда до зарядженої частини АТФ змінюється в широкому діапазоні. Ця особливість показує, що сильний електрофлуорохромний ефект [154] має місце для барвників **1**, **6–8** у комплексі з аніоном АТФ лише тоді, коли флуорофор перебуває в електричному полі АТФ, що відтворюється в спектрах як зменшення енергії переходу S_1-S_0 .

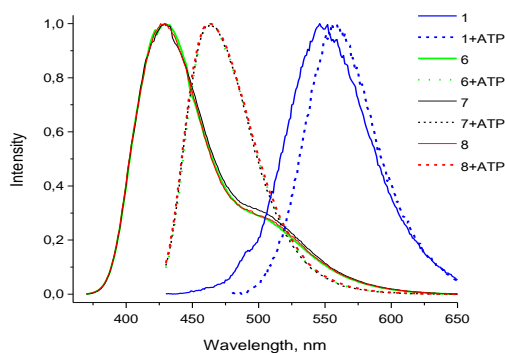


Рис. 4.2. Нормалізовані спектри емісії вивчених барвників у відсутності (суцільні лінії) і у присутності АТФ (пунктирні лінії). Спектри вільних барвників: $\lambda_{ex} = 420$ нм (**1**) та 355 нм (інші барвники). Для комплексів АТФ: $\lambda_{ex} = 462$ нм (**1**) 400 нм (**6, 7**) і 405 нм (**8**). $C_{ATP} = 3$ мМ.

Для вивчення виявленого спектрального ефекту було отримано спектри збудження флуоресценції барвників. Їх реєстрацію проводили на максимумі смуги емісії комплексу АТФ (Рис. 4.3 А-Г). При збільшенні

концентрації АТФ у всіх спектрах збудження було зареєстровано утворення нової смуги, зміщеної у червону ділянку на 50 нм, тоді як у спектрах поглинання спостерігалася лише незначна зміна положення максимуму (Рис. 4.1 і 4.4). Така різниця є додатковим доказом структурної неоднорідності утворених АТФ-комплексів та показує, що окрема їх популяція має набагато вищий квантовий вихід флуоресценції, ніж інші.

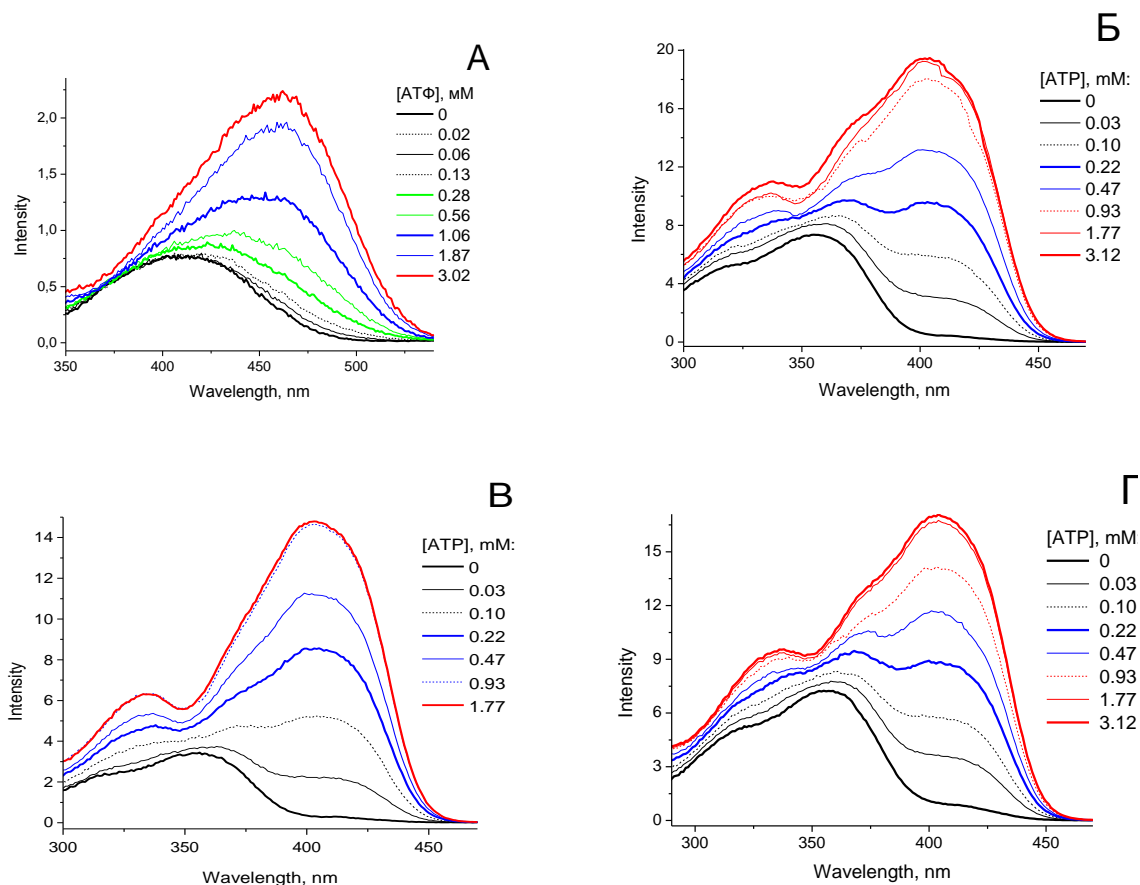


Рис. 4.3. Зміни у спектрах збудження барвників **1** (А), **6** (Б), **7** (В) та **8** (Г) при збільшенні концентрації АТФ (А). $\lambda_{em} = 558$ нм (А) і 465 нм (Б–Г).

Оскільки квантовий вихід флуоресценції можна обчислити як співвідношення випромінених фотонів до поглинутих $\phi = n_F/n_A$, то співвідношення інтенсивностей у спектрах збудження та поглинання (в шкалі коефіцієнта поглинання α) відображає відносну зміну квантового виходу флуоресценції $\phi_R = I_F/\alpha$ при зміні довжини хвилі збудження λ_{ex} .

На основі даних спектрів збудження та поглинання барвників у присутності АТФ ми розрахували для них функцію $\varphi_R = f(\lambda_{ex})$. Нормований вигляд розрахованих кривих наведено червоним кольором на Рис. 4.4 А–Г.

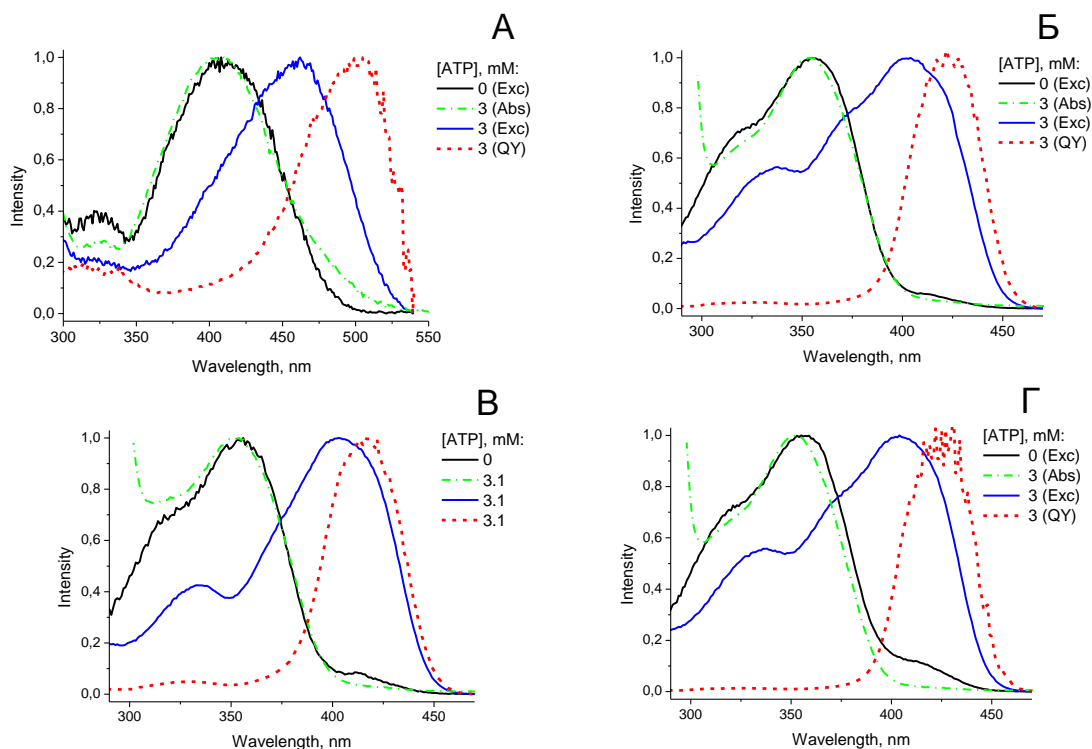


Рис. 4.4. Нормалізовані спектри збудження досліджуваних барвників у відсутності (чорні суцільні лінії) і у присутності АТФ (сині суцільні лінії): барвник **1** (А), **6** (Б), **7** (В) і **8** (Г). Для порівняння представлені спектри поглинання в присутності АТФ (зелений штрих-пунктир). Червоний штрих: нормовані криві залежності відносного квантового виходу від довжини хвилі збудження $\varphi_R = f(\lambda_{ex})$.

Отримані залежності демонструють значне збільшення квантового виходу φ_R при переході від точки максимуму поглинання комплексу барвник-АТФ до червоного краю його спектра збудження. Це збільшення амплітуди квантового виходу становить 8 разів у випадку незарядженого барвника **1** ($\varphi_R(406) = 0,125$; $\varphi_R(505) = 1$). Усі заряджені барвники демонструють набагато більше зростання параметра φ_R : у 50, 50 та 100 разів для барвників **6**, **7** та **8** відповідно (Табл. 4.1).

Таким чином, електростатичний вплив аніона АТФ породжує унікальне явище, коли квантовий вихід флуоресценції збільшується у 8-100 разів для окремої популяції барвників, що є зближеною з чотиризарядною

аніонною частиною АТФ. Враховуючи, що цей ефект набагато краще проявляється у випадку барвників **6–8**, які несуть позитивний заряд, можна стверджувати, що в них взаєморозташування флуорофора і фосфатів АТФ є більш наближеним. Внаслідок електростатичної стабілізації флуорофора в усіх випадках максимальні значення квантового виходу флуоресценції φ_R досягаються для популяції молекул барвника, яка збуджується на червоному краї спектра поглинання: при 450–530 нм для барвника **1** і при 400–430 нм для барвників **6–8**.

Таблиця 4.1.

Спектроскопічні характеристики барвників **1** та **6–8**.

	1	6	7	8
Максимум поглинання (вільний барвник) [*] , нм	399	352	352	352
Максимум поглинання комплексу з АТФ, нм	406	354	352	352
Максимум збудження (вільний барвник), нм	412	356	355	356
Максимум збудження комплексу з АТФ, нм	462	402	403	404
Максимум емісії (вільний барвник), нм	548	429	430	430
Максимум емісії комплексу з АТФ, нм	558	463	463	463
Максимальне співвідношення квантового виходу флуоресценції збудження/поглинання $\varphi_R(\lambda_{exc})/\varphi_R(\lambda_{abs})$	8	50	50	100
Частка популяції, стабілізована електричним полем	0.16	0.08	0.08	0.05
Видима константа стабільності, $\times 10^{-3}$ л·моль ⁻¹	0.19 \pm 0.03	6.3 \pm 0.8	6.2 \pm 0.6	3.1 \pm 0.4

* Молярний коефіцієнт екстинкції: 43000 \pm 500 л моль⁻¹ см⁻¹ для барвника **1** та 22000 \pm 500 для інших барвників.

Площа смуги поглинання, що розташована в зоні найвищого квантового виходу, пропорційна тій частині популяції барвника, яка є максимально стабілізованою в електростатичному полі аніона АТФ. Це твердження є справедливим у наближенні, що коефіцієнт молярної

екстинкції є однаковим для всіх популяцій комплексу барвник-АТФ. Зі спектрів барвників (Рис. 4.4) ми розраховали площу спектра поглинання в ділянці найвищого квантового виходу флуоресценції та площу іншої частини смуги поглинання S_0-S_1 (Таб 4.1 та 4.2). За цими результатами 16% популяції барвника **1** перебуває під впливом електростатичного поля. Для барвників **6–8** ця доля менша і становить близько 3-5%. Така різниця також вказує на різну орієнтацію компонентів у комплексі з АТФ для барвника **1** та його заряджених аналогів **6–8**.

Таблиця 4.2.

Частки ділянки спектра поглинання у зоні найвищого квантового виходу флуоресценції, розраховані для барвників 1, 6–8.

Барвник	Інтегр. площа- нм	Значення-	Інтегр. площі 2 нм	Значення-	Значення-2 Значення-
1	324–454	87.7	454–600	13.6	0.16
2	324*–392	41.8	392–600	3.3	0.08
3	324*–392	43.0	392–600	3.6	0.08
4	324*–392	41.3	392–600	2.0	0.05

* Перетин смуг переходів S_0-S_1 .

На основі отриманих змін інтенсивності флуоресценції від концентрації АТФ ми обчислили ефективні константи стійкості комплексів барвник-АТФ у наближенні, що утворені комплекси мають стехіометрію 1:1 (Рис. 4.5, А). Згідно з отриманими результатами для заряджених барвників **6–8** константи стійкості лежать в діапазоні $3,1 - 6,3 \cdot 10^3$ л·моль⁻¹, тоді як константа стійкості для нейтрального флавонолу **1** має на один порядок нижче значення $1,9 \cdot 10^2$ л·моль⁻¹ (Табл. 4.1, Рис. 4.5 Б). Найбільш стійкі комплекси утворюють катіонні барвники **6** і **7**. Цвіттер-іонний барвник **8** демонструє удвічі нижчий афінітет до АТФ, імовірно тому, що позитивний заряд у положенні 4' флавонолу значно підвищує стійкість комплексу

барвник-АТФ. Енергія зв'язку, розрахована з відповідних констант стійкості за рівнянням Гіббса, лежить в діапазоні 3–5 ккал моль⁻¹ (Рис. 4.5 Б).

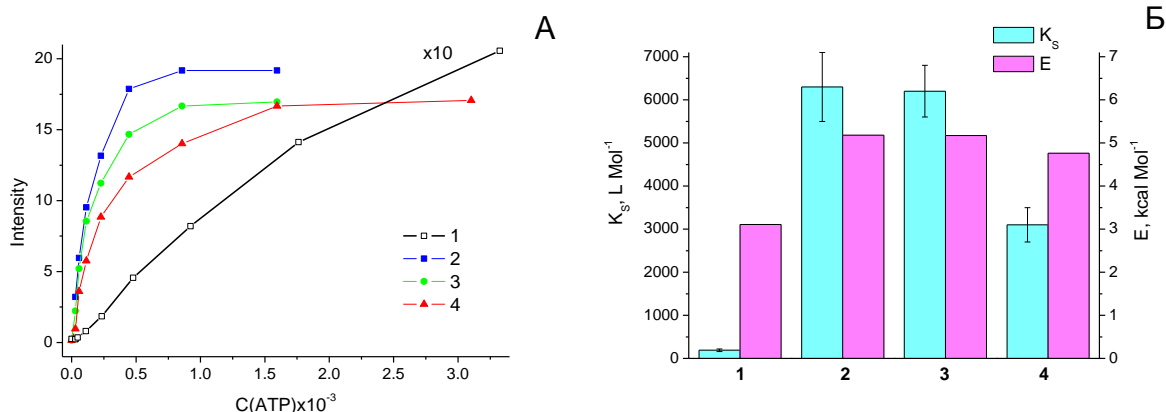


Рисунок 4.5. Залежність інтенсивності флуоресценції барвників **1** та **6–8** від концентрації АТФ (А). Ефективні константи стійкості та енергії зв'язку, розраховані для їх комплексів з АТФ (Б). $\lambda_{\text{ex}} = 462$ нм (барвник **1**), 400 нм (барвники **6** і **7**) і 405 нм (барвник **8**). $\lambda_{\text{em}} = 558$ нм для барвника **1** і 465 нм в інших випадках. Концентрація барвників: 1,5 (**1**); 3,4 (**6**); 3,5 (**7**) і 3,3 (**8**) · 10⁶ моль·л⁻¹.

4.3. Висновки

Незаряджений флавонол **1** при зв'язуванні з аніоном АТФ демонструє виражений гіпохромний ефект. На відміну від нього, синтезовані флавоноли **6–8** демонструють гіперхромізм. Ця особливість вказує на відсутність стекінг-взаємодій з аденіновим залишком АТФ, а також на інше розташування та орієнтацію хромофорної частини барвника відносно аніона АТФ, порівняно з барвником **1**. У спектрах флуоресценції всіх барвників у присутності АТФ була зареєстрована нова смуга емісії комплексу барвник-АТФ. Ця смуга була отримана в індивідуальному стані при збудженні на червоному краї спектра поглинання комплексу барвник-АТФ. Форма та положення спектра збудження, отриманого на емісії комплексу, значно відрізняються від форми та положення спектра поглинання, вказуючи на значні відмінності квантового виходу флуоресценції для різних популяцій комплексу барвник-АТФ. Залежності квантового виходу від λ_{exc} , отримані шляхом порівняння спектрів збудження та поглинання, показали суттєву різницю у значеннях цього параметра для популяції, що поглинає на

червоному краю смуги збудження та популяції максимуму поглинання. Для першої популяції квантовий вихід є у 50–100 разів вищим. Ми вважаємо, що таку унікальну різницю можуть викликати дві причини. По-перше, вона може бути результатом сильного електростатичного впливу заряджених фосфатів АТФ на флуорофор барвника. У такому випадку високий квантовий вихід флуоресценції є результатом значно швидшої кінетики флуоресценції. Друга причина – це вплив орієнтованого електричного поля. У цьому випадку високий квантовий вихід флуоресценції є результатом сильної поляризації молекул води, підвищеної внаслідок зростання в'язкості водних кластерів і, таким чином, втрати здатності води до гасіння флуоресценції. Оскільки такий електростатичний вплив діє на коротких відстанях і потребує тісного розташування флуорофора барвника до заряджених центрів, лише навелика частка популяції комплексу барвник-АТФ демонструє збільшені квантові виходи, що свідчить про різну орієнтацію компонентів у комплексі. Відповідно до цього були оцінені частки популяцій барвників, що перебувають під електростатичним впливом. Обчислено, що близько 16% популяції барвника **1** зазнає електрохромного впливу АТФ, тоді як у випадку барвників **6–8** ця частка значно менша і становить близько 5–8%. Ефективна константа стійкості, розрахована для комплексу незарядженого барвника **1** з АТФ, перебуває біля 10^3 л·моль⁻¹. Для катіонних барвників **6–8** значення констант стійкості є у 30 разів вищим. Таким чином, катіонний заряд в положенні 4' флавонолу значно підвищує стійкість комплексу. Ми вважаємо, що отримані результати будуть корисними в подальших розробках флуоресцентних зондів для селективного визначення нуклеозидфосфатів.

4.4. Експериментальна частина

Трис(гідроксиметиламіно)метан (ТРИС), аденозин 5'-трифосфат (АТФ) та інші реагенти були придбані у Sigma-Aldrich.

Спектри поглинання реєстрували на спектрофотометрі Cary 4000 (Varian) та спектри флуоресценції – на спектрофлуориметрі FluoroMax 3.0 (Jobin Yvon, Horiba) при 25 °С. Спектри емісії були скореговані щодо зміни інтенсивності джерела світла та залежності чутливості детектора від довжини хвилі. Спектри збудження флуоресценції реєструвались на довжині хвилі максимуму емісії комплексу барвник-АТФ. Спектри випромінювання флуоресценції реєструвались на довжині хвилі максимуму збудження вільного барвника при нульовій концентрації АТФ та комплексу барвник-АТФ, при концентрації АТФ = 1–3 мМ, коли інтенсивність флуоресценції мала максимальне значення.

Всі пристрої обладнані термостатами. рН розчинів вимірювали безпосередньо у кварцевій кюветі (1 × 1 см) на рН-метрі 713 від Metrohm. Температура розчинів встановлювалась на рівні 25 °С для всіх експериментів.

Розчин натрієвої солі АТФ одержували шляхом розчинення наважки динатрієвої солі АТФ (від 20,0 до 40,0 мг) у 5 мл буферного розчину з наступним додаванням розрахункових кількостей 30% гідроксиду натрію (2–5 мкл). Титрування з АТФ здійснювали шляхом додавання до вихідного розчину барвника (концентрація 3 мкМ) в 1,5 мл 16 мМ ТРИС буфера рН 7.4, розчину, що містить барвник у тій самій концентрації та АТФ. Для отримання необхідних концентрацій АТФ, аліквоти (1, 2, 4, 8, 16, 30, 60, 120 та 250 мкл) додавали до вихідного розчину послідовно, при постійному перемішуванні. Реєстрували проміжні спектри. Контроль рН додатково проводили після останнього додавання АТФ.

Значення констант стійкості K визначали апроксимацією кривих титрування у шкалах інтенсивність флуоресценції - концентрація АТФ за наступним рівнянням [155]:

$$I = I_0 + \frac{I_0 - I_t}{[Dye]_{tot}} \times \frac{K + K[Dye]_{tot} + n[ATP]_{tot} - \sqrt{(K + K[Dye]_{tot} + n[ATP]_{tot})^2 - 4nK^2[Dye]_{tot}[ATP]_{tot}}}{2K}$$

де I та I_t – інтенсивність флуоресценції при заданій і насиченій концентрації АТФ, відповідно, I_0 – інтенсивність за відсутності АТФ. $[ATP]_{tot}$ – загальна концентрація АТФ, $[Dye]_{tot}$ – загальна концентрація барвника, K – видима константа стабільності, а n – кількість молекул барвника на молекулу АТФ.

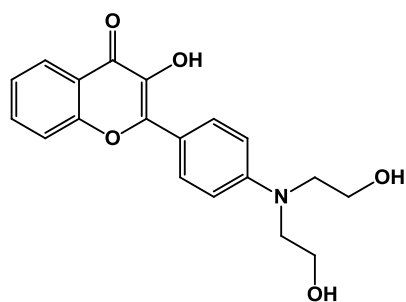
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ДО РОЗДІЛУ 4

150. Lima L. M., Amarante E. G., Miranda A. L. P., Fraga C. A. M., Barreiro E. J. Synthesis and Antinociceptive Profile of Novel Acidic Sulphonylhydrazone Derivatives from Natural Safrole. *Pharmacy and Pharmacology Communications*. **1999**, 5, 12, 673–78.
151. Das R., Duportail G., Richert L., Klymchenko A., Mély Y. Sensing Micelle Hydration by Proton-Transfer Dynamics of a 3-Hydroxychromone Dye: Role of the Surfactant Headgroup and Chain Length. *Langmuir*. **2012**, 28, 18, 7147–59.
152. Klymchenko A. S., Demchenko A. P. 3-Hydroxychromone Dyes Exhibiting Excited-State Intramolecular Proton Transfer in Water with Efficient Two-Band Fluorescence. *New Journal of Chemistry*. **2004**, 28, 6, 687.
153. Tomin V. I., Demchenko A. P., Chou P. T. Thermodynamic vs. Kinetic Control of Excited-State Proton Transfer Reactions. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. **2015**, 22, 1–18.
154. Bondar O. P., Pivovarenko V. G., Rowe E. S. Flavonols - New Fluorescent Membrane Probes for Studying the Interdigitation of Lipid Bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. **1998**, 1369, 1, 119–30.
155. Beltz H., Piémont E., Schaub E., Ficheux D., Roques B., Darlix J.-L., Mély Y. Role of the Structure of the Top Half of HIV-1 cTAR DNA on the Nucleic Acid Destabilizing Activity of the Nucleocapsid Protein NCp7. *Journal of Molecular Biology*. **2004**, 338, 4, 711–23.

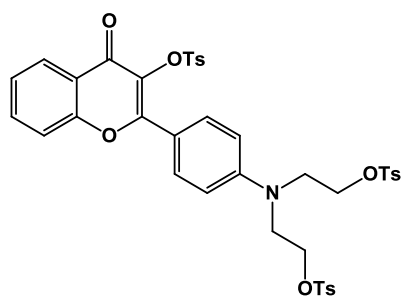
РОЗДІЛ 5

ПІДВИЩЕННЯ АФІНІТЕТУ ТА ЗМІНА СЕЛЕКТИВНОСТІ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ СЕНСОРІВ АТФ ШЛЯХОМ ХІМІЧНОЇ МОДИФІКАЦІЇ ЇХ БУДОВИ

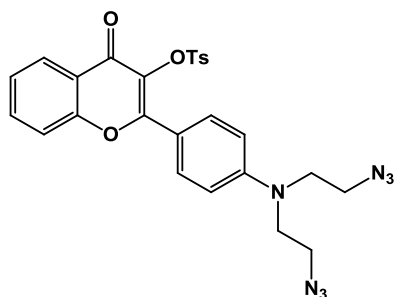
Метою даного розділу роботи було вивчення взаємодії АТФ з новими похідними 3-гідроксифлавонолу у водних розчинах за фізіологічних значень рН і визначення рівня селективності зв'язування цих сполук з аніонами близької до АТФ структури: ГТФ, АДФ та АМФ. За нашими уявленнями, збільшення кількості водневих зв'язків, що утворює зонд з АТФ, посилення диполь-дипольних взаємодій, а також збільшення розмірів планарної частини зонду, яка бере участь у зв'язуванні з АТФ шляхом стекінгу, має привести до підвищення константи зв'язування ($K_{зв}$) і, відповідно, до зниження межі детекції АТФ. Найзручнішою з препаративної точки зору є модифікація молекули флавонолу по 4'-аміногрупі. Крім того, результати, описані в попередніх розділах вказують на те, що саме біля цієї частини флавонолу розташовується аніонна частина АТФ при комплексоутворенні. З цією метою нами було розроблено стратегію та синтезовано ряд сполук, структура яких дозволяє збільшити кількість вказаних міжмолекулярних взаємодій, а саме стекінгу (сполуки **18** та **21**), водневих зв'язків (сполуки **13** та **18**) та іон-дипольних взаємодій (сполуки **16** та **21**) (Рис. 5.1). Синтез, виділення та підтвердження чистоти досліджуваних сполук описано в розділі 3.



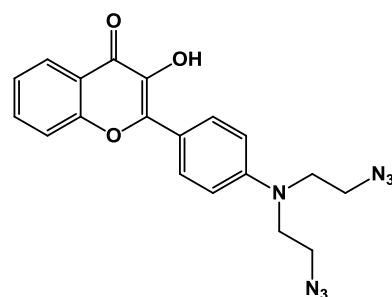
13



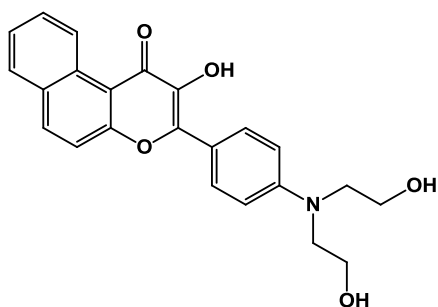
14



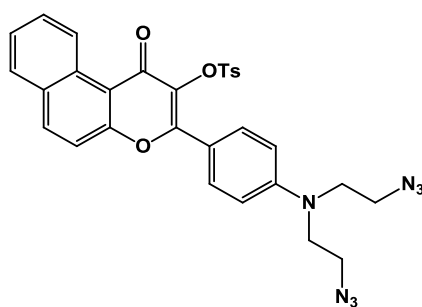
15



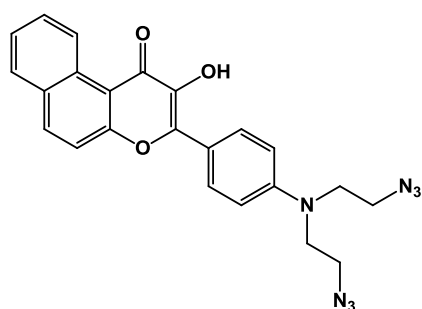
16



18



20



21

Рис. 5.1. Структури досліджених барвників.

5.1. Дослідження агрегації сполук у водних розчинах

Ряд із синтезованих сполук мають порівняно високу молекулярну масу та гідрофобність, внаслідок чого виникла необхідність у дослідженні їх здатності до агрегації при флуориметричних концентраціях у водному

розчині. Відповідно до отриманої динаміки зміни оптичної густини розчину, агрегація в сполук **13** - **16**, **20** та **21** відбувається повільно, оскільки за час проведення флуориметричного титрування (~50 хвилин) оптична густина зменшувалась достатньо мало (Рис. 5.2).

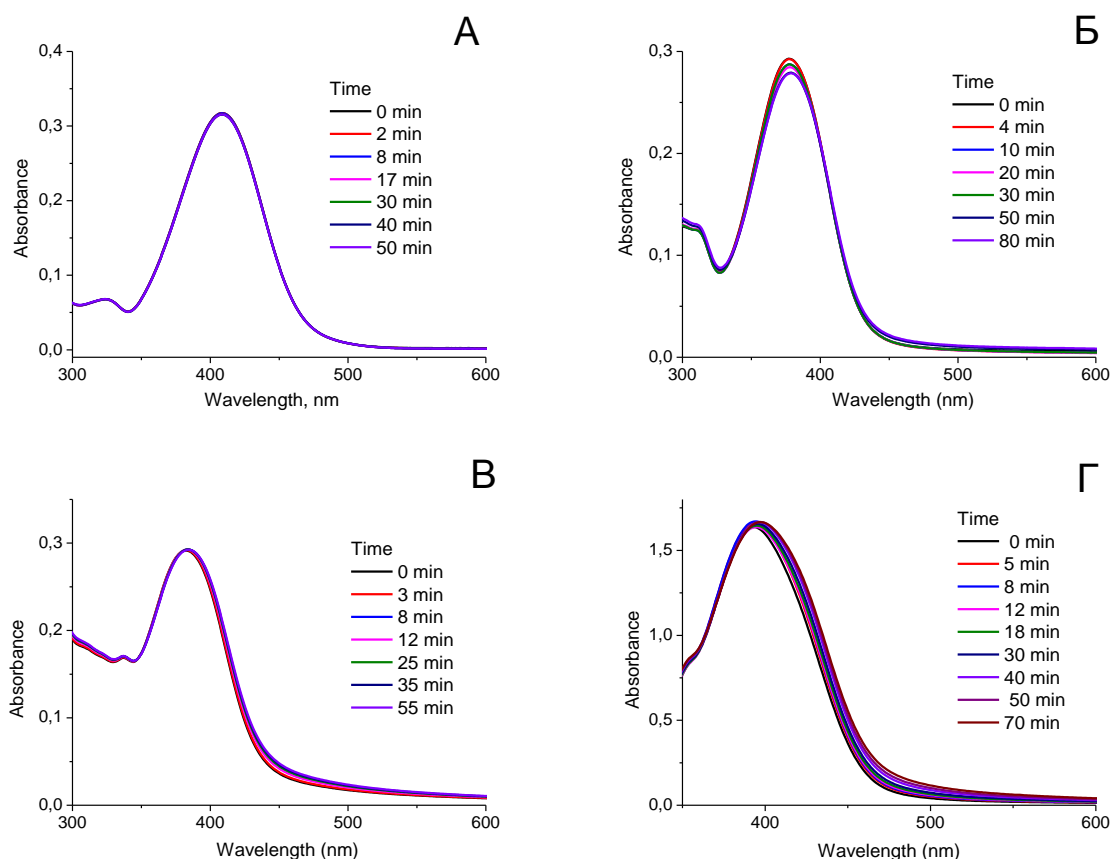


Рис. 5.2. Спектри поглинання сполук **13** (А), **14** (Б), **20** (В) та **21** (Г) у 300мМ ТРИС буфері, рН 7.4.

На відміну від інших сполук, флавонол **18** агрегує досить швидко (Рис. 5.3), що утруднює вивчення його комплексоутворення з АТФ. Тому спектральні дослідження його взаємодії з АТФ не проводились.

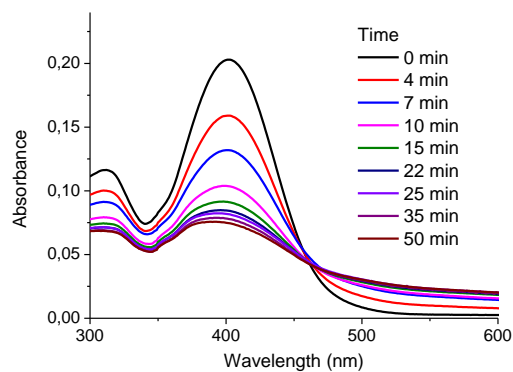


Рис. 5.3. Спектр поглинання сполуки **18** у 300мМ ТРИС буфері, рН 7.4.

5.2. Вивчення взаємодії флавонолів 13-16, 20, 21 з АТФ

5.2.1. Спектри поглинання

При додаванні АТФ до розчинів цих зондів в ТРИС буфері рН 7.4 спостерігається зменшення оптичної густини у максимумі та зсув спектру поглинання у довгохвильову область з появою плеча при 460 нм.

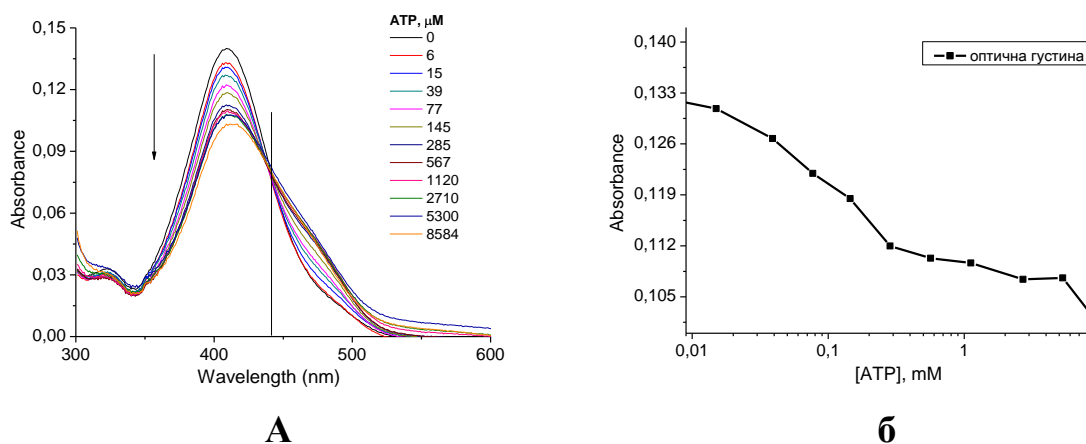


Рис. 5.4. Спектр поглинання сполуки **13** (а) та зміна оптичної густини розчину (б) ($\lambda=410$ нм) при збільшенні концентрації АТФ (300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

Для сполуки **13** (Рис. 5.4 а) наявна ізобестична точка, яка поступово зсувається, що свідчить про утворення кількох комплексів з АТФ різної стехіометрії. Ефективна константа дисоціації, рівна 0.08 мМ, була обрахована з кривої зміни оптичної густини (Рис. 5.4 б). Вона є зваженою

сумою констант дисоціації кількох комплексів, утворення яких зафіксовано спектрально.

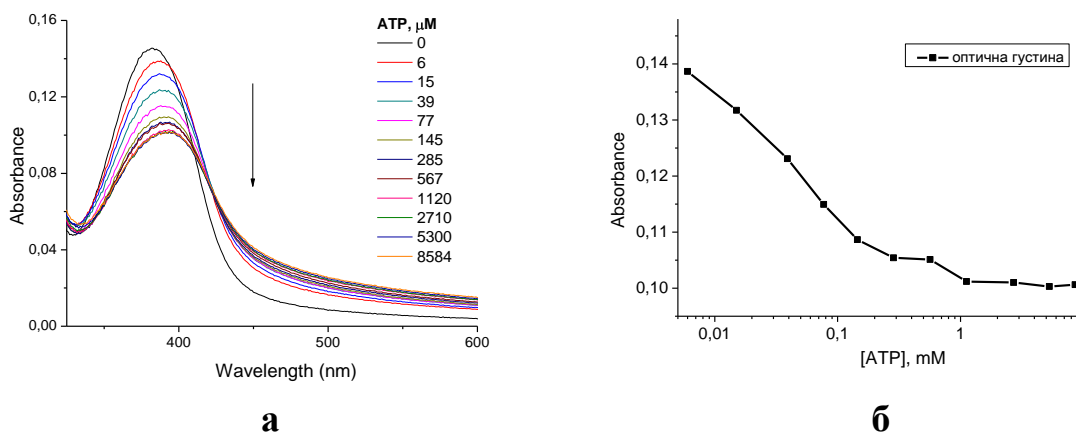


Рис. 5.5. Спектр поглинання сполуки **14** (а) та зміна оптичної густини розчину (б) ($\lambda=386$ нм) при збільшенні концентрації АТФ (300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

Для повністю тозильованої **14** (Рис. 5.5 а,б) та діазиду **15**, де 3-ОН група захищена тозильним залишком (Рис. 5.6 а,б) теж спостерігається падіння оптичної густини зі збільшенням концентрації АТФ. Проте у даному разі спостерігається помітний зсув максимуму при додаванні першої порції АТФ, що свідчить про утворення комплексу зі стехіометрією 1:1 при значно нижчих концентраціях АТФ, ніж зафіксована у титруванні. У зв'язку з цим ми вважаємо, що падіння оптичної густини у межах досліджених концентрацій АТФ (Рис. 5.5б, 5.6б) є результатом утворення комплексу барвник:АТФ зі стехіометрією 1:2.

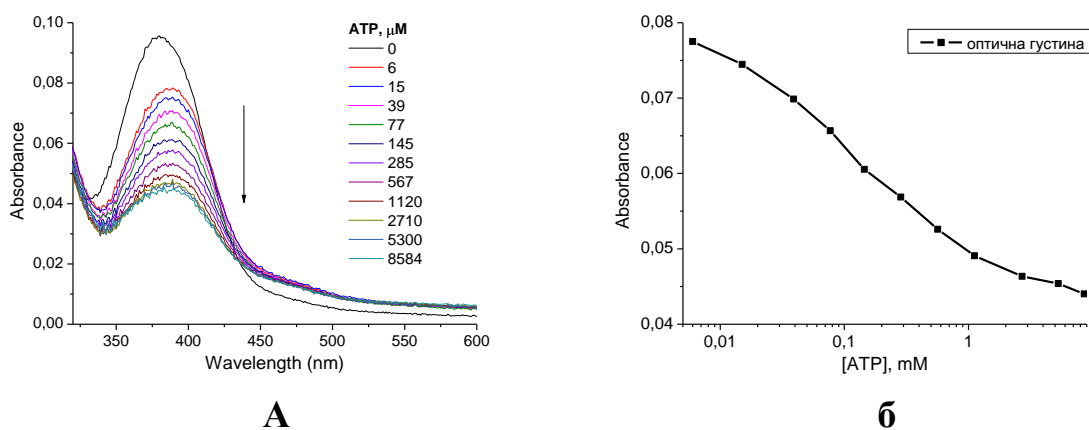


Рис. 5.6. Спектр поглинання сполуки **15** (а) та зміна оптичної густини розчину (б) ($\lambda=385$ нм) при збільшенні концентрації АТФ (300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

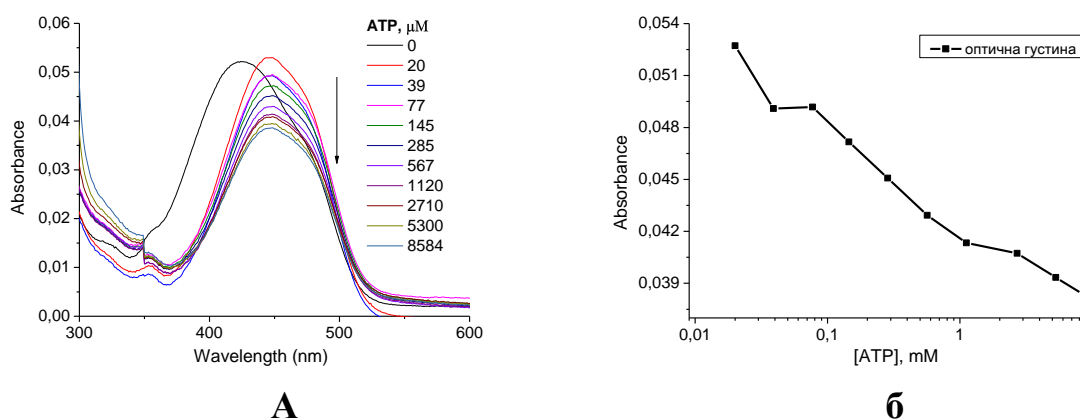


Рис. 5.7. Спектр поглинання сполуки **16** (а) та зміна оптичної густини розчину (б) ($\lambda=450$ нм) при збільшенні концентрації АТФ (300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

У спектрі поглинання сполуки **16**, при першому додаванні АТФ відбувається зростання оптичної густини (Рис. 5.7 а) та значний батохромний зсув. Такі зміни можуть свідчити про утворення комплексу 1:1 зонд-АТФ. А наступне падіння оптичної густини є свідченням утворення наступного комплексу, зі стехіометрією 1:2 зонд-АТФ. Такі спостереження підтверджують наші припущення, зроблені для сполук 14 та 15 за результатами титрування.

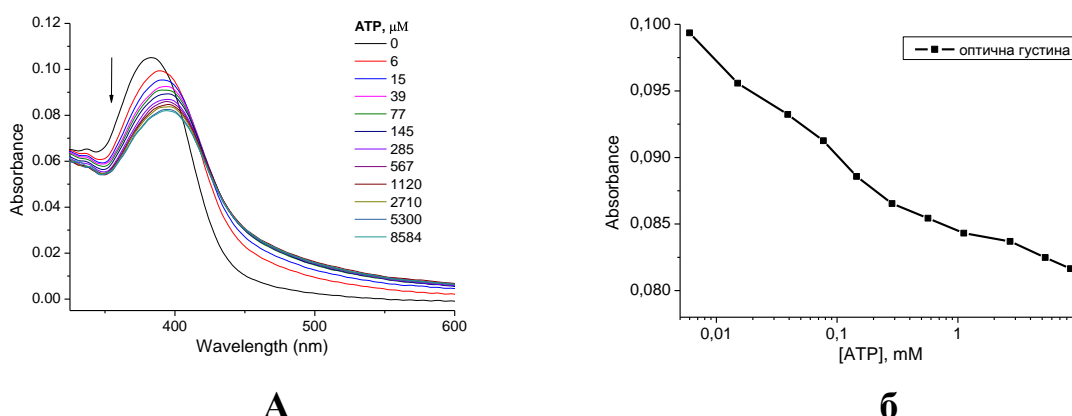


Рис. 5.8. Спектр поглинання сполуки **20** (а) та зміна оптичної густини розчину (б) ($\lambda=390$ нм) при збільшенні концентрації АТФ (300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

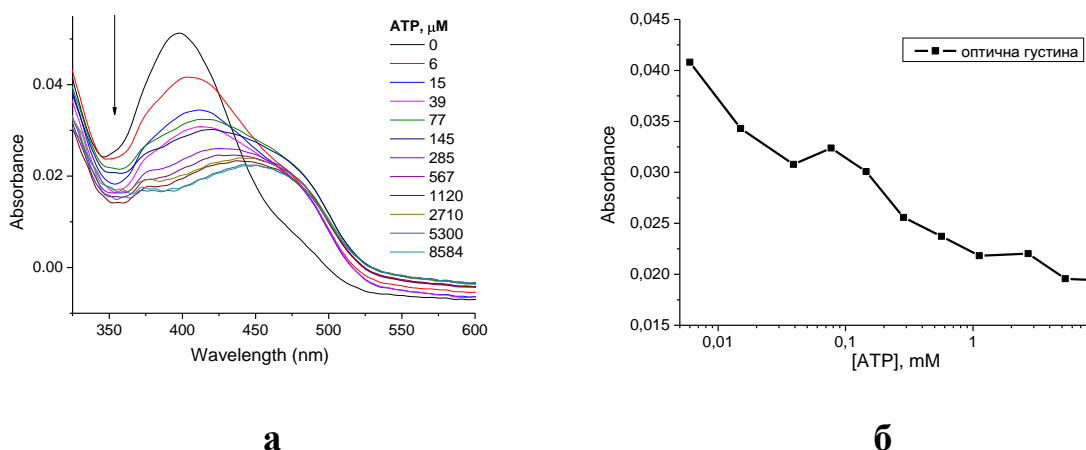


Рис. 5.9. Спектр поглинання сполуки **21** (а) та зміна оптичної густини розчину (б) ($\lambda=415$ нм) при збільшенні концентрації АТФ (300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

Для сполуки **20** (Рис. 5.8) та **21** (Рис. 5.9) спостерігається падіння оптичної густини при збільшенні концентрації АТФ, зміщення максимуму в червону ділянку спектру, а для сполуки **21** – формування нової смуги у довгохвильовій області спектру. Відсутність ізобестичної точки свідчить про утворення одночасно кількох типів комплексів (Рис. 5.9 а). Це також підтверджує форма кривої падіння оптичної густини (Рис. 5.9 б).

Узагальнюючи спостереження у спектрах поглинання, можна стверджувати, що всі досліджені сполуки утворюють з АТФ кілька комплексів різної стехіометрії. Комплекс 1:1 утворюється при мікромолярних концентраціях АТФ. Комплекс зонд-АТФ 1:2 утворюється при концентраціях АТФ близько 100-200 μM .

5.2.2. Спектри флуоресценції

При додаванні АТФ у спектрах флуоресценції сполук **13**, **16** та **21** спостерігається зростання інтенсивності флуоресценції без помітного зміщення максимуму смуги. Зростання флуоресценції для сполук **13** та **16** відбувається до концентрації АТФ 1 мМ (Рис. 5.10 А, Б), а для **21** – до 2 мМ (Рис. 5.10 В), після чого у всіх випадках спостерігається падіння її інтенсивності.

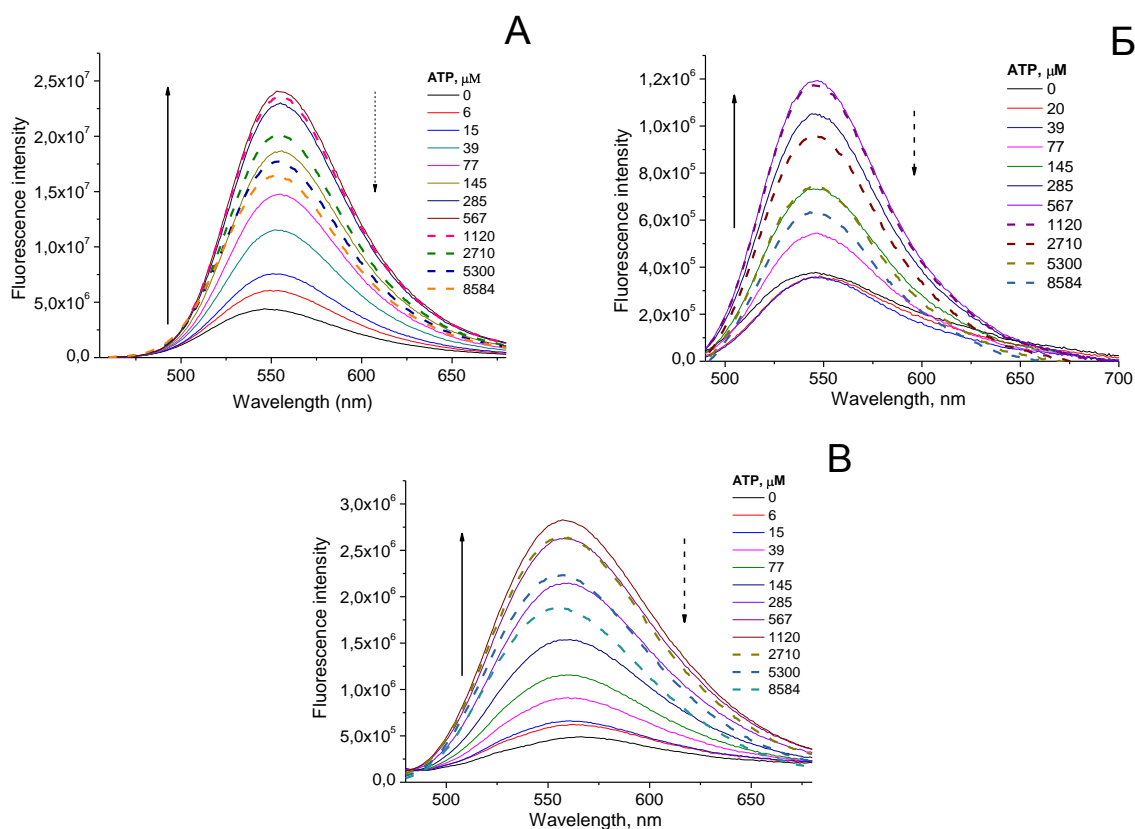


Рис. 5.10. Спектри флуоресценції сполук **13** (λ_{ex} 440 нм) (А), **16** (λ_{ex} 480 нм) (Б) та **21** (λ_{ex} 455 нм) (В) у присутності АТФ у 300 мМ ТРИС буфері, рН 7.4.

Ці зміни свідчать про утворення кількох комплексів між флавонолами та АТФ, оскільки відомо, що збільшення квантового виходу флуоресценції є результатом підвищення в'язкості оточення барвника та зменшення локальної концентрації води у його оточенні. Ми вважаємо, що падіння інтенсивності на останніх стадіях титрування відтворює зв'язування зонду з третьою молекулою АТФ, з утворенням комплексу зонд-АТФ 1:3. Додатковим підтвердженням цієї гіпотези може бути димеризація АТФ [156, 157], яка має місце в таких умовах. Ми вважаємо, що електростатичний вплив АТФ на зонд у комплексі 1:3 значно менший його впливу у комплексі 1:2, оскільки заряджені частини АТФ орієнтуються в протилежних напрямках біля молекули зонду (Рис. 5.11).

На відміну від цього, для сполук **14** і **20** спостерігається спадання інтенсивності флуоресценції на перших кроках титрування (Рис. 5.12). На нашу думку, падінню квантового виходу флуоресценції тут сприяють

безвипромінювальні втрати, які виникають внаслідок π - π взаємодій між електродонорним аденіном та ароматичною системою сполук **14** і **20**, яка внаслідок наявності електроноакцепторних груп є кращим електроноакцептором, ніж інші флавоноли.

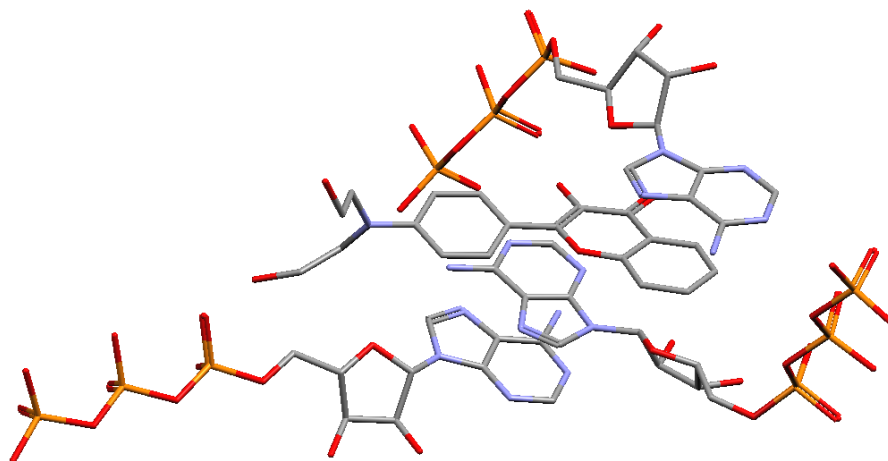


Рис. 5.11. ММ⁺ модель просторової структури комплексу **13** – АТФ стехіометрії 1:3.

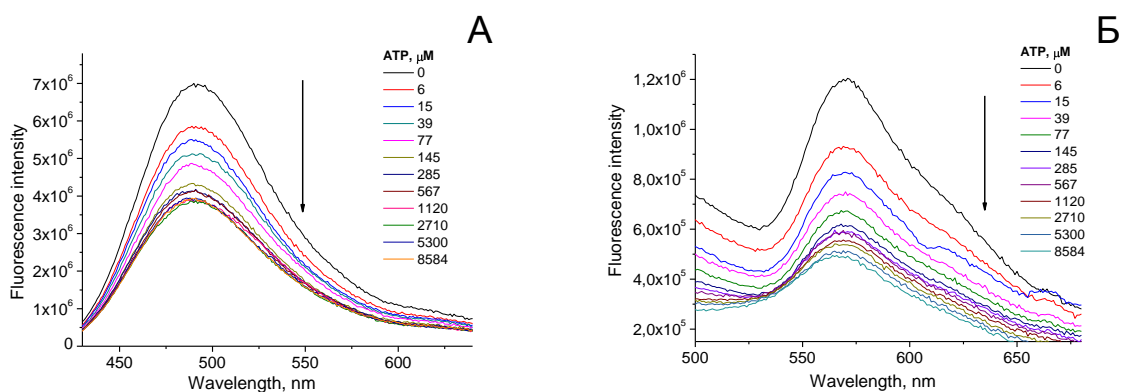


Рис. 5.12. Спектр флуоресценції сполуки **14** (λ_{ex} 420 нм) (А) та **20** (λ_{ex} 425 нм) у присутності АТФ у 300 мМ ТРИС буфері, рН 7.4.

Така точка зору підтверджується спектральною поведінкою сполуки **15** (Рис. 5.13), де при додаванні АТФ спостерігається спочатку зменшення інтенсивності флуоресценції (до [АТФ]=15 μM), що свідчить про взаємодію між ароматичними системами компонентів у комплексі 1:1, потім зростання інтенсивності до концентрації АТФ 1120 μM внаслідок утворення комплексу між АТФ та флавонолом зі стехіометрією 1:2, і знову спадання

флуоресценції – внаслідок взаємодії комплексу 1:2 з вільними молекулами АТФ і утворення комплексу 1:3.

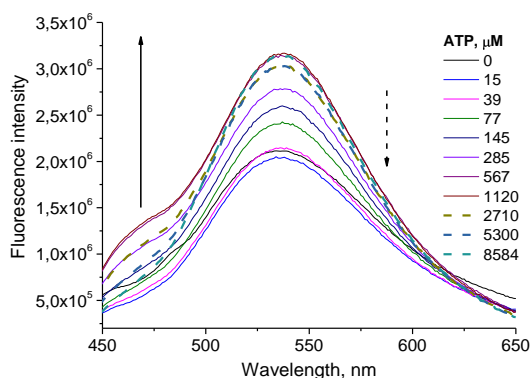


Рис. 5.13. Спектр флуоресценції сполуки **15** у присутності АТФ на λ_{ex} 445 нм у 300 мМ ТРИС буфері, рН 7.4.

Отже, зміни у спектрах флуоресценції досліджених флавонолів при додаванні АТФ узгоджуються зі змінами у спектрах поглинання, де було зафіксовано утворення двох типів комплексів зі стехіометрією 1:1 та 1:2. Додатково було зареєстровано утворення комплексу наступної стехіометрії 1:3. Утворення такого комплексу відтворюється як падіння інтенсивності флуоресценції при концентраціях АТФ вищих за 1 мМ, що відповідає діапазону, у якому була зареєстрована агрегація АТФ [157]. Зміна амплітуди інтенсивності флуоресценції є кращою для сполук з вільною 3-ОН групою, що свідчить про їх перспективність у зондуванні концентрації АТФ у розчинах.

5.2.3. Спектри збудження флуоресценції

Як і очікувалось, для сполук, які демонструють збільшення інтенсивності флуоресценції при додаванні АТФ, з'являється нова смуга у спектрах збудження флуоресценції, зміщена в середньому на 60 нм у червону ділянку спектру.

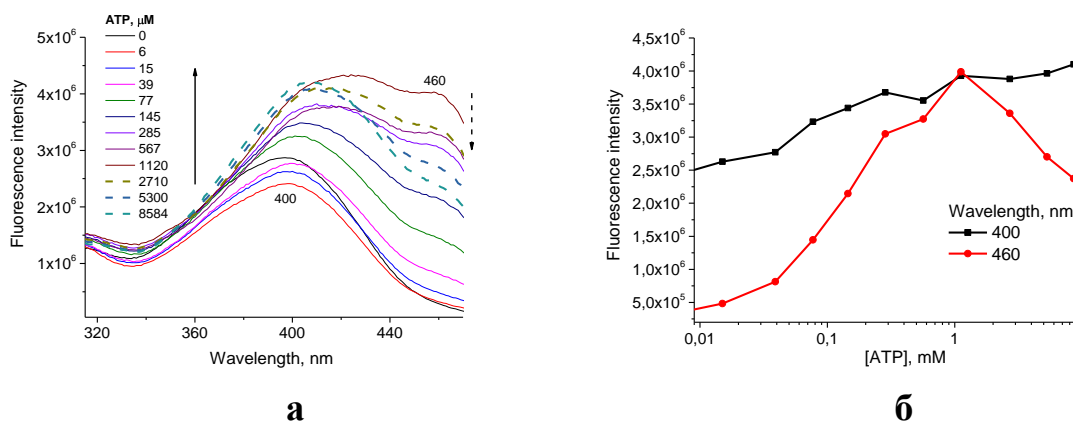


Рис. 5.14. Спектр збудження флуоресценції та залежність інтенсивності флуоресценції (збудження на $\lambda=400$ та 460 нм) від концентрації АТФ для сполуки **15** (λ_{em} 535 нм, 300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

У випадку сполуки **15** до концентрації АТФ 1 мМ спостерігається зростання інтенсивності двох смуг у спектрі збудження (Рис. 5.14 а). При подальшому додаванні АТФ інтенсивність батохромно зміщеної смуги спадає. Такі спостереження свідчать про одночасне утворення як мінімум двох типів комплексів з АТФ.

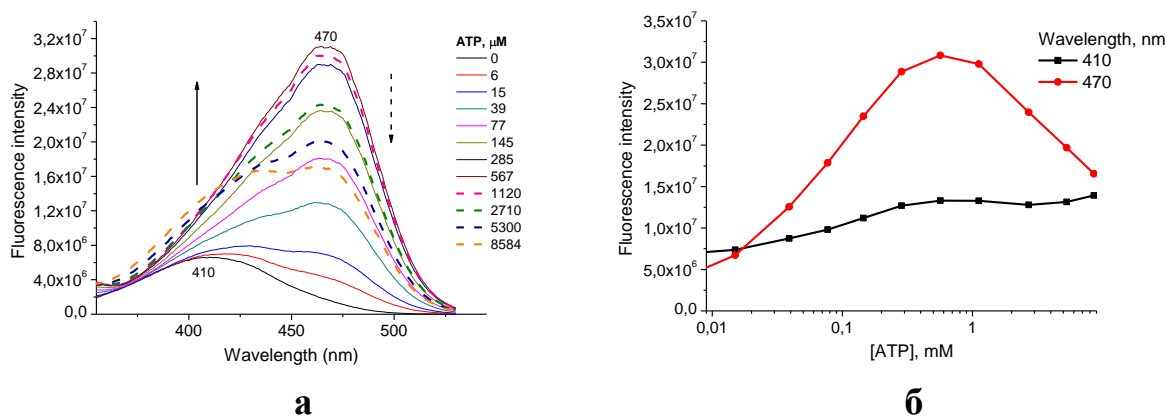


Рис. 5.15. Спектр збудження флуоресценції та залежність інтенсивності флуоресценції (збудження на $\lambda=410$ та 470 нм) від концентрації АТФ для сполуки **13** (λ_{em} 550 нм, 300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

У спектрах сполук **13**, **16** та **21** (Рис. 5.15, 5.16, 5.18 відповідно) спостерігаються аналогічні зміни у спектрах збудження флуоресценції при додаванні АТФ, з деякою різницею у інтенсивності нової смуги комплексів зонд-АТФ різної стехіометрії. Залежність зміни інтенсивності флуоресценції від концентрації АТФ (Рис. 5.15 б) показує, що основний ріст інтенсивності відбувається при концентраціях вищих за 20 мкМ, тоді як у

спектрах поглинання (Рис. 5.4, 5.7 та 5.9) присутнє зміщення максимуму, яке відповідає утворенню комплексу 1:1 при нижчих концентраціях АТФ. Отже, зростання інтенсивності флуоресценції сполуки **13** відповідає утворенню її комплексу зонд - АТФ зі стехіометрією 1:2. Тоді, падіння інтенсивності, що спостерігається при концентраціях АТФ вищих 1 мМ має відповідати утворенню наступного комплексу зі стехіометрією 1:3, як це було запропоновано вище.

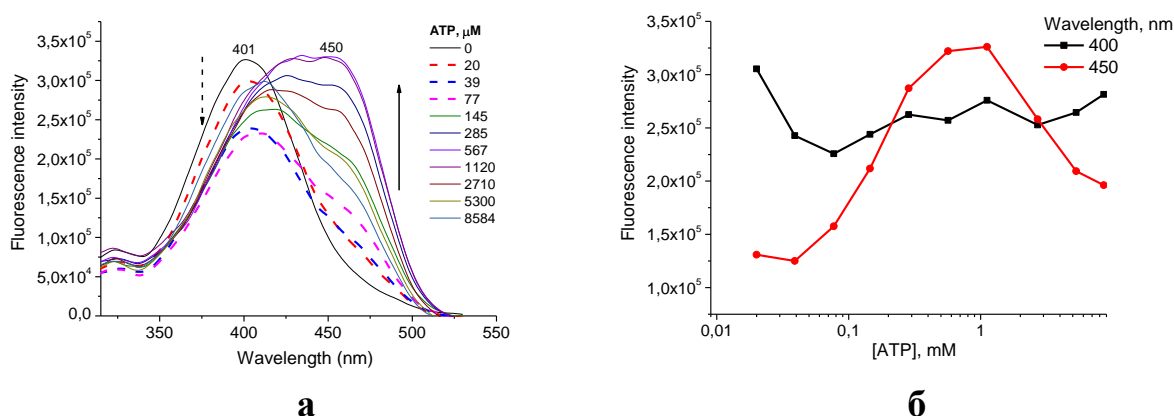


Рис. 5.16. Спектр збудження флуоресценції та залежність інтенсивності флуоресценції (збудження на $\lambda=400$ та 450 нм) від концентрації АТФ для сполуки **16** (λ_{em} 545 нм, 300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

Для сполуки **16** (Рис. 5.16) спостерігається зростання інтенсивності двох смуг одночасно, з батохромним зсувом 12 нм та 60 нм відповідно. Довгохвильова смуга за інтенсивністю на останніх стадіях титрування наздоганяє середню смугу, що свідчить про належність цих двох смуг до різних типів комплексів.

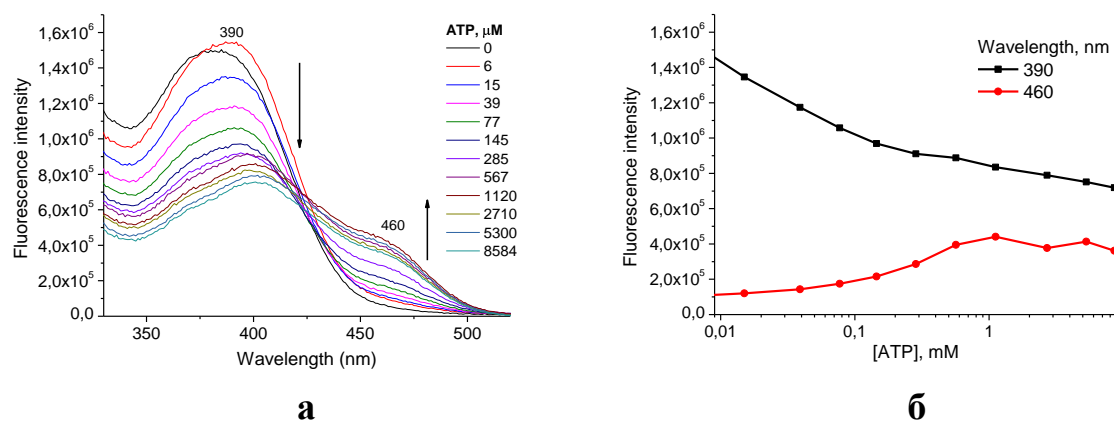


Рис. 5.17. Спектр збудження флуоресценції та залежність інтенсивності флуоресценції (збудження на $\lambda=390$ та 460 нм) від концентрації АТФ для сполуки **20** (λ_{em} 570 нм, 300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

Для барвника **20** (Рис. 5.17) наявність електроноакцепторної 3-тозилоксигрупи замість електронодонорного гідроксилу веде до зростання безвипромінювальних втрат у комплексі за рахунок π - π взаємодій.

Для сполуки **21** при додаванні АТФ у спектрах збудження флуоресценції спостерігається спадання інтенсивності початкової смуги з наступним формуванням нової батохромно зміщеної смуги. Враховуючи батохромне зміщення максимуму поглинання на першому етапі титрування (Рис. 5.9 а), падіння інтенсивності флуоресценції слід приписати утворенню комплексу стехіометрії 1:1, а наступне зростання – утворенню комплексу 1:2 та 1:3. Такі результати повністю підтверджують припущення, зроблені у попередньому параграфі для спектрів флуоресценції цієї сполуки.

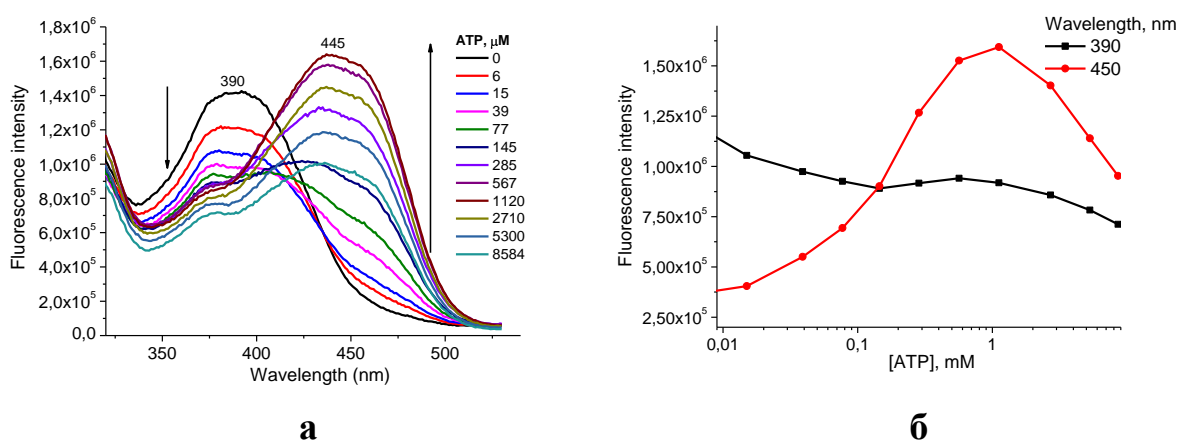


Рис. 5.18. Спектр збудження флуоресценції та залежність інтенсивності флуоресценції (збудження на $\lambda=390$ та 450 нм) від концентрації АТФ для сполуки **21** (λ_{em} 563 нм, 300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

Отже, такі зміни у спектрах поглинання та флуоресценції сполук **13**, **16** та **21** свідчать про те, що при низьких концентраціях АТФ (6 – 66 мкМ) утворюється комплекс зі стехіометрією 1:1. При концентраціях АТФ 60 мкМ – 1 мМ відбувається утворення комплексу 1:2, а при вищих – 1:3. Значне зростання інтенсивності на стадії утворення комплексу 1:2 свідчить про суттєве зменшення локальної концентрації води в оточенні зонду. А

падіння оптичної густини - про стекінг планарної частини зонду з нуклеїною основою. Отже, пуриновий залишок АТФ перебуває у стекінгу в комплексі з флавонолами. Комплекс стехіометрії 1:3 представляє собою стекінговий комплекс, у якому електростатичний вплив фосфатів АТФ на флуорофор зменшується. Про це свідчить падіння інтенсивності флуоресценції при утворенні такого комплексу, яке є результатом компенсації електростатичного ефекту третього залишку АТФ на зонд.

Вичерпно тозильована сполука **14** демонструє зменшення інтенсивності флуоресценції при додаванні АТФ (Рис. 5.19), що повністю узгоджується з тезою гасіння флуоресценції електроноакцепторних флуорофорів аденіновим залишком при безпосередньому контакті з флуорофором.

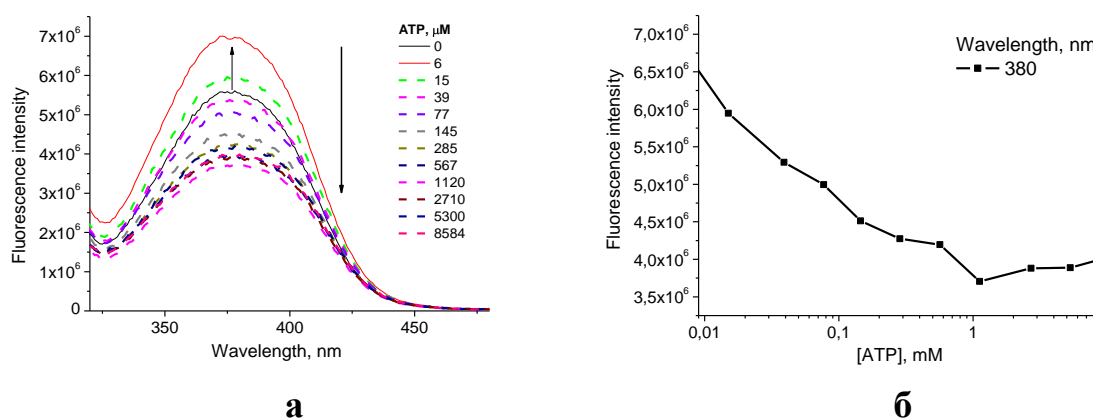


Рис. 5.19. Спектр збудження флуоресценції та залежність інтенсивності флуоресценції (збудження на $\lambda=380$) від концентрації АТФ для сполуки **14** (λ_{em} 493 нм, 300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

5.2.4. Порівняння спектрів збудження флуоресценції зі спектрами поглинання

Для сполуки **14** спектр поглинання і збудження флуоресценції добре співпадають за формою (Рис. 5.20).

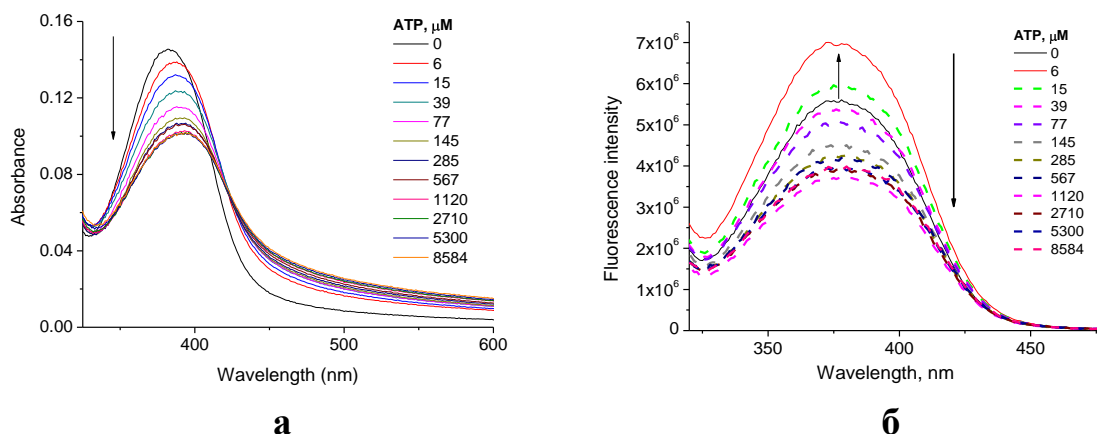


Рис. 5.20. Спектри поглинання ($\lambda=386$ нм) та збудження флуоресценції сполуки **14** ($\lambda_{\text{ex}}=380$ нм, $\lambda_{\text{em}} 493$ нм, 300мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

На нашу думку, це є додатковим доказом двох фактів. Перший: як було зауважено вище, при стекінгу аденінового залишку АТФ з електроноакцепторним хромофором **14** відбувається гасіння флуоресценції. Флуоресціює лише популяція барвника, флуорофор якої у комплексі є дещо віддаленим від аденінової основи. У такому випадку флуорофор є також віддаленим від зарядженої частини АТФ, оскільки смуга у спектрі збудження флуоресценції не є зміщеною у довгохвильову область, як це спостерігається у випадках інших сполук. Отже, спектр збудження флуоресценції сполуки **14** є унікальним випадком емісії тієї популяції зонда у комплексі з АТФ, хромофор якого є віддаленим як від аденінового ядра, так і від зарядженої частини АТФ. Це є аргументом на користь того, що у комплексах флавонолів з АТФ компоненти перебувають у різній орієнтації один відносно одного. Цей дослід свідчить, що існують три популяції комплексу з однією стехіометрією компонентів: популяція що перебуває під впливом електричного поля і в стекінгу з аденіновим ядром, та популяція, що не перебуває під впливом електричного поля і в стекінгу. Третьою є популяція, яка перебуває під впливом електричного поля і не є в стекінгу з аденіновим ядром, як це було показано в розділі 4.

Для сполуки **13** (Рис. 5.21) у спектрі збудження флуоресценції спостерігається батохромний зсув і зростання інтенсивності флуоресценції

нової смуги, що створює максимальну різницю зі спектром поглинання у положенні та формі.

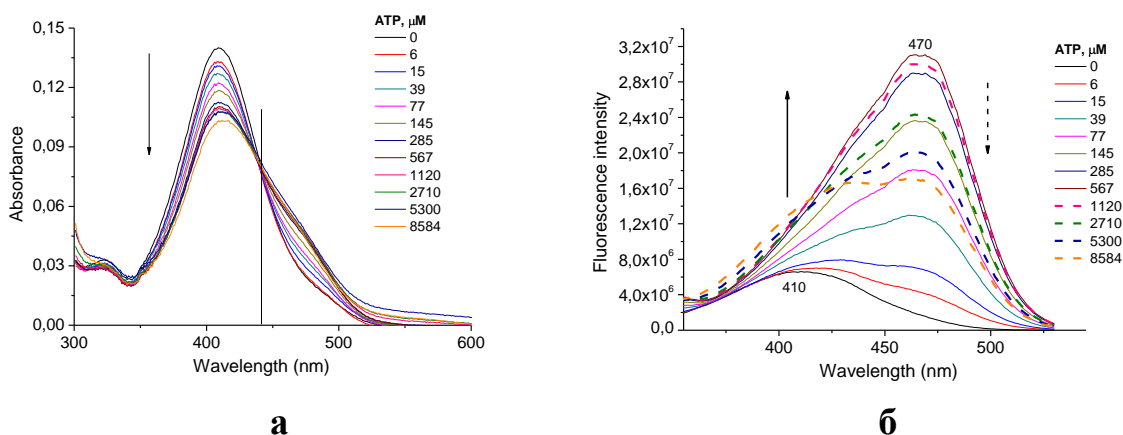


Рис. 5.21. Спектри поглинання ($\lambda=410$ нм) та збудження флуоресценції сполуки **13** ($\lambda_{\text{ex}}=410$ та 470 нм, $\lambda_{\text{em}}=550$ нм, 300мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

Це означає, що як і у випадку більшості флавонолів, квантовий вихід флуоресценції комплексу з АТФ є значно вищим, ніж квантовий вихід флуоресценції вільного зонду. Сполуки **16**, **20** і **21** демонструють дещо меншу різницю у формі та положенні спектрів поглинання та збудження флуоресценції, і отже є варіантами, проміжними між спектрами сполук **13** та **14**.

5.2.5. Розрахунок ефективних констант дисоціації

Константи дисоціації були розраховані у наближенні утворення одного комплексу зі стехіометрією 1:1.



$$K_d = ([F][ATP])/([F*ATP]) \quad (2)$$

При поступовому додаванні АТФ буде збільшуватись кількість молекул 3-гідроксифлавону, які утворили комплекс з АТФ, тому для кожного етапу додавання можна розрахувати ступінь наповненості f_r .

$$f_r = ([F*ATP])/([F]_{\text{total}}) = [ATP]_{\text{free}}/(K_d + [ATP]_{\text{free}}) \quad (3)$$

Зі спектрів емісії з точки максимуму інтенсивності, fr можна розрахувати наступним чином:

$$fr = (I - I_{\min}) / (I_{\max} - I_{\min}) \quad (4)$$

Якщо, $fr = 1/2$, тоді з рівняння (3):

$$[ATP] = K_d \quad (5)$$

$$\log[ATP] = \log K_d \quad (6)$$

Побудувавши графік в координатах частка зв'язаного флавонолу (fr) - $\log(ATP)$. (Рис. 5.22) та використавши рівняння (5), (6) було визначено $\log K_d$.

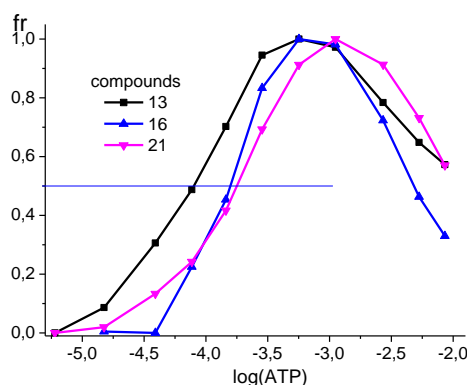


Рис. 5.22. Графік частка зв'язаного флавонолу (fr) - $\log(ATP)$.

Таблиця 5.1.

Константи дисоціації при взаємодії з АТФ.

Сполуки	13	16	21
Log K_d	-4.09	-3.79	-3.73

Отримані дані свідчать, що сполука **13** з двома додатковими гідроксигрупами має у кілька разів кращий афінітет до АТФ, ніж інші сполуки. Це підтверджує ідею щодо утворення водневих зв'язків з АТФ гідроксигрупами замісника у положенні 4' флавонола.

5.3. Дослідження взаємодії похідних 3-гідроксифлавону з ГТФ, АДФ і АМФ

Для дослідження селективності взаємодії флавонолів з АТФ були проведені титрування сполук **13**, **16** і **21** наступними нуклеозидфосфатами: ГТФ, АДФ та АМФ. Умови дослідження були витримані такими, як і у титруванні з АТФ.

5.3.1. Дослідження взаємодії з ГТФ

Як і у випадку з АТФ, у спектрах поглинання досліджуваних сполук при додаванні ГТФ до розчинів зондів у ТРИС буфері рН 7.4 спостерігається зменшення оптичної густини, зсув максимуму поглинання у довгохвильову область і формування там плеча нової смуги.

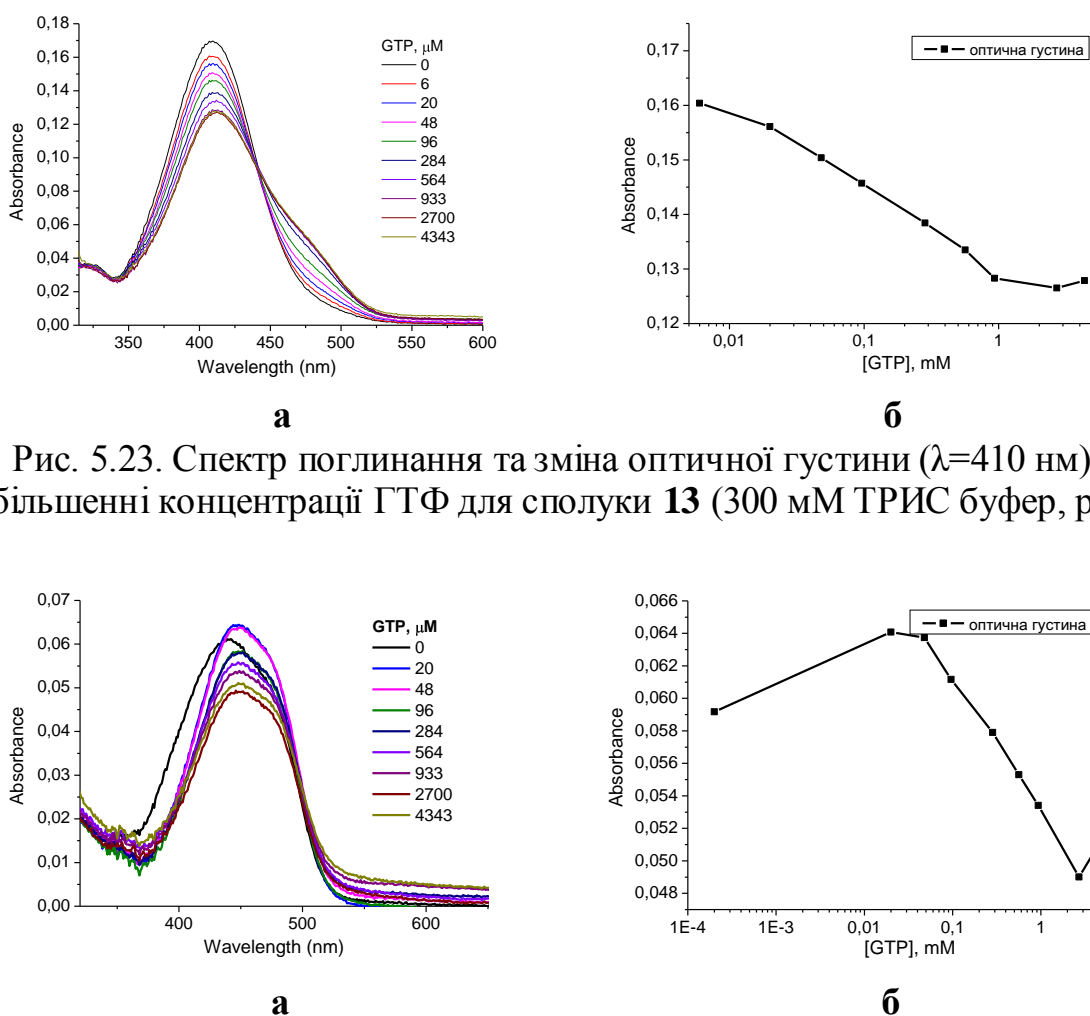


Рис. 5.23. Спектр поглинання та зміна оптичної густини ($\lambda=410$ нм) при збільшенні концентрації ГТФ для сполуки **13** (300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

Рис. 5.24. Спектр поглинання та зміна оптичної густини ($\lambda=410$ нм) при збільшенні концентрації ГТФ для сполуки **16** (300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

У випадку сполуки **13** (Рис. 5.23) хід спектральних кривих формує кількох зближених ізобестичних точок у межах концентрацій 6-4500 μM , що свідчить про утворення як мінімум двох типів комплексів.. Для **16** при першому додаванні АТФ відбувається зростання оптичної густини (Рис. 5.24 б) та значний батохромний зсув (Рис. 5.24 а). Такі зміни можуть свідчити про утворення комплексу 1:1 зонд - ГТФ. У такому разі наступне падіння оптичної густини є свідченням утворення наступного комплексу, який буде мати стехіометрію 1:2. Тут ці сполуки проявляють аналогічну поведінку, як і при взаємодії з АТФ. Залежність зміни оптичної густини від концентрації ГТФ сполук **13** та **16** подано на Рис. 5.23 б та 5.24 б відповідно.

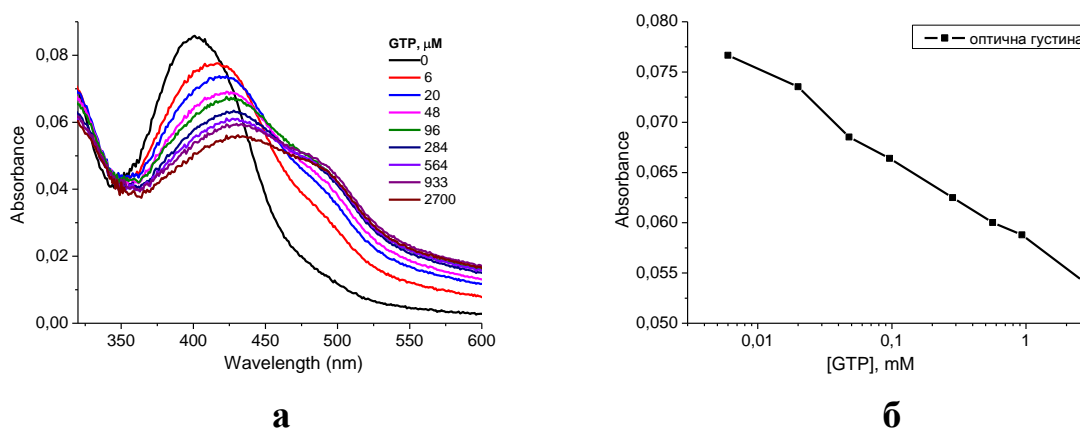


Рис. 5.25. Спектр поглинання та зміна оптичної густини ($\lambda=420$ нм) при збільшенні концентрації ГТФ для сполуки **21** (300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

Для сполуки **21** спостерігається падіння оптичної густини, зміщення максимуму в червону ділянку спектру та формування нової смуги. Відсутність ізобестичної точки свідчить про утворення одночасно кількох типів комплексів (Рис. 5.25 а). Про утворення кількох типів комплексів свідчить також форма кривої падіння оптичної густини (Рис. 5.25 б), яка має вигляд близький до лінійного, замість сигмоїдного.

У спектрах флуоресценції спостерігається зростання інтенсивності флуоресценції для усіх досліджуваних сполук, без помітного зміщення

максимуму смуги - аналогічно до змін, що спостерігалися при взаємодії з АТФ.

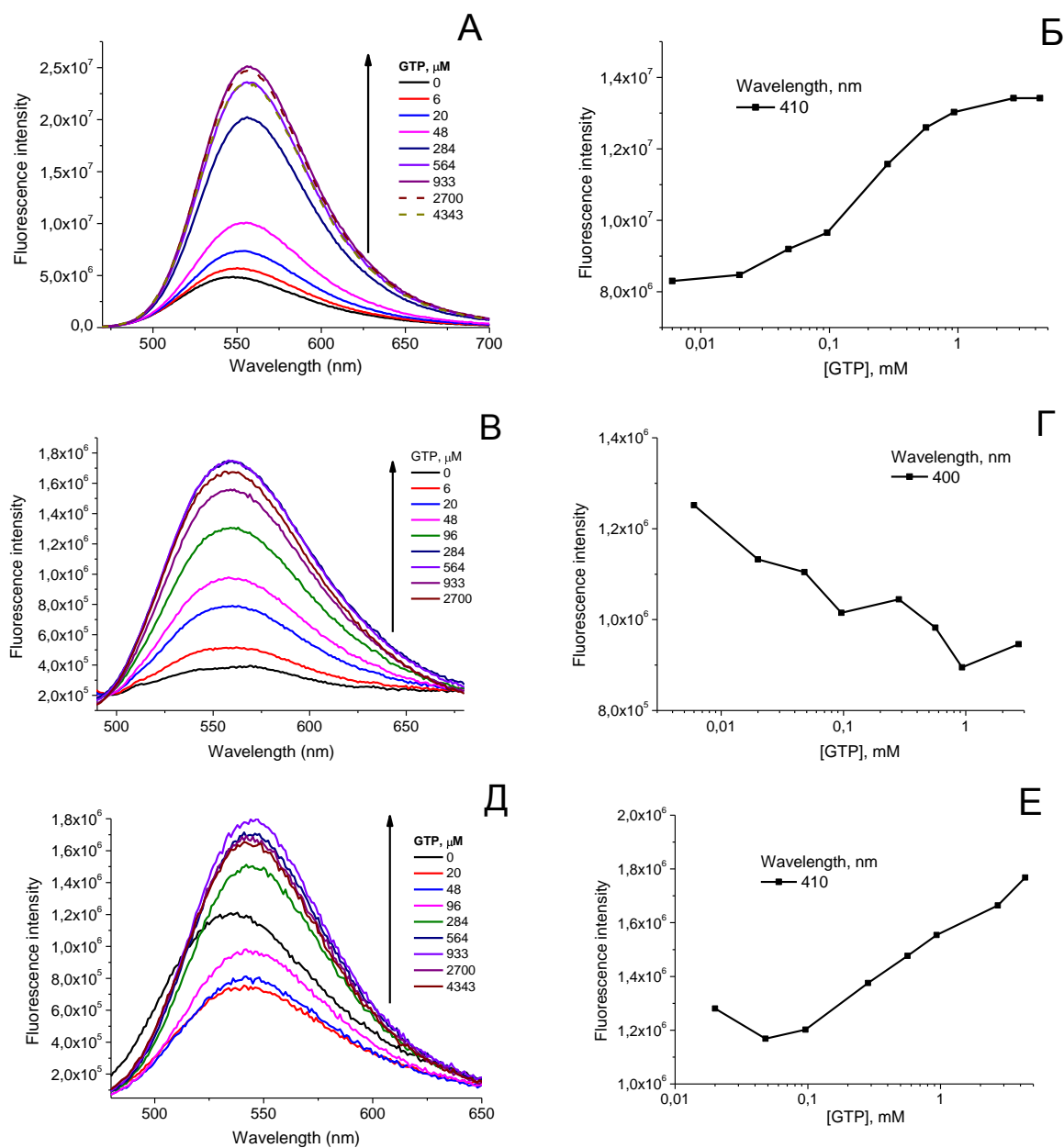


Рис. 5.26. Спектри флуоресценції сполук **13** (λ_{ex} 440 нм) (А), **21** (λ_{ex} 455 нм) (В), **16** (λ_{ex} 480 нм) (Д) та залежність інтенсивності флуоресценції (збудження на $\lambda=410$ нм) від концентрації для сполук **13** (Б), **21** (Г) та **16** (Е) у присутності ГТФ в 300 мМ ТРИС буфері, рН 7.4.

Зростання інтенсивності флуоресценції сполуки **13** (Рис. 5.26 А, Б) відбувається у межах концентрації ГТФ від 6 μM до 1 мМ. Для сполуки **16** (Рис. 5.26 Д, Е) спостерігається спочатку спадання, а потім зростання інтенсивності флуоресценції. Така зміна інтенсивності флуоресценції є прямим підтвердженням точки зору, вираженої вище за змінами у спектрах

поглинання (Рис. 5.24). Падіння інтенсивності флуоресценції при концентрації ГТФ 0-20 мкМ відповідає утворенню першого типу комплексу зі стехіометрією зонд – ГТФ 1:1, а наступне зростання інтенсивності флуоресценції є результатом утворення комплексу зі стехіометрією 1:2. Утворення наступного комплексу зі стехіометрією 1:3 при збудженні на $\lambda = 410$ нм не спостерігається. Утворення цього комплексу буде обговорено нижче на основі змін у спектрах збудження.

У спектрі флуоресценції сполуки **21** (Рис. 5.26 В, Г) спостерігається зростання інтенсивності флуоресценції у межах концентрацій 6-500 μM з наступним падінням. Такі зміни свідчать про послідовне утворення кількох типів комплексів різної стехіометрії що підтверджують описану для спектрів поглинання поведінку.

У спектрах збудження флуоресценції для досліджуваних сполук спостерігається утворення нової смуги високої інтенсивності, зміщеної в середньому на 60 нм у червону ділянку спектру (Рис. 5.27 – 5.29). Як і у випадку з АТФ, такий значний зсув смуги свідчить про електростатичний вплив зарядженої частини ГТФ на хромофор флавонолу.

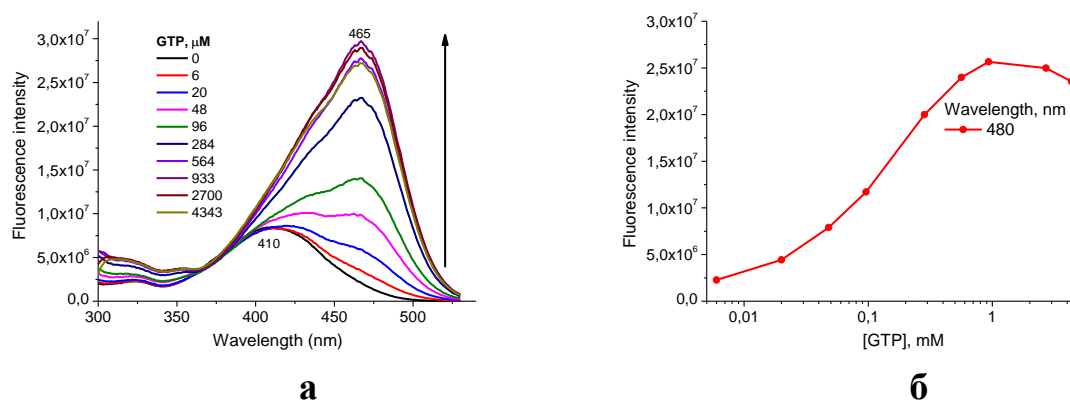


Рис. 5.27. Спектр збудження флуоресценції та залежність інтенсивності флуоресценції (збудження на $\lambda=410$ та 480 нм) від концентрації ГТФ для сполуки **13** (λ_{em} 550 нм, 300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

Залежність зміни інтенсивності флуоресценції сполуки **13** від концентрації (Рис. 5.27 б) показує, що основний її ріст відбувається при

концентраціях ГТФ вищих за 20 мкМ, тоді як у спектрах поглинання присутнє зміщення максимуму що відповідає утворенню комплексу 1:1 при нижчих концентраціях ГТФ. Отже, як і у випадку комплексу зонду FME з АТФ, зростання інтенсивності флуоресценції сполуки **13** відповідає утворенню її комплексу з ГТФ зі стехіометрією 1:2. Тоді, падіння інтенсивності, що спостерігається при концентраціях ГТФ вищих за 1мкМ має відповідати утворенню наступного комплексу зі стехіометрією 1:3.

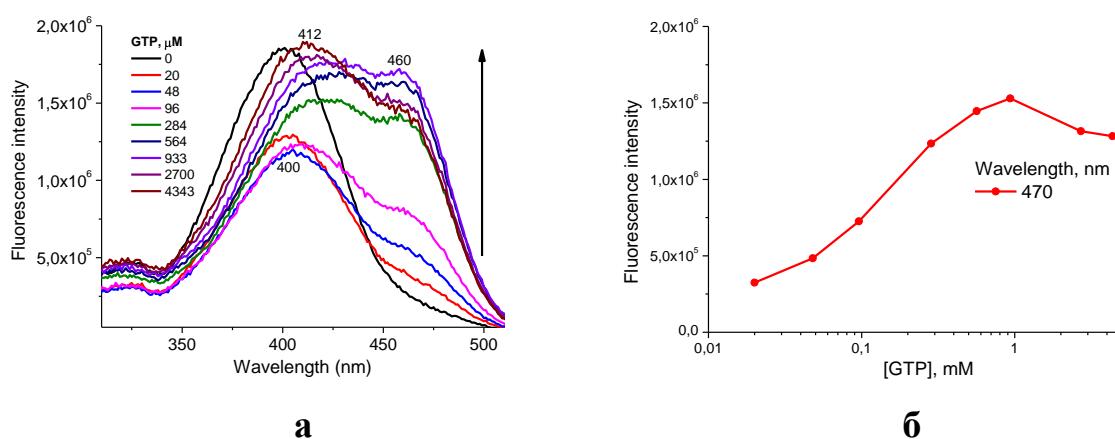


Рис. 5.28. Спектр збудження флуоресценції та залежність інтенсивності флуоресценції (збудження на $\lambda=400$ та 470 нм) від концентрації ГТФ для сполуки **16** (λ_{em} 535 нм, 300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

Для сполуки **16** спостерігається зростання інтенсивності двох смуг одночасно, з батохромним зсувом 12 нм та 60 нм відповідно. Довгохвильова смуга за інтенсивністю на останніх стадіях титрування наздоганяє середню смугу, що свідчить про належність цих двох смуг до різних типів комплексів.

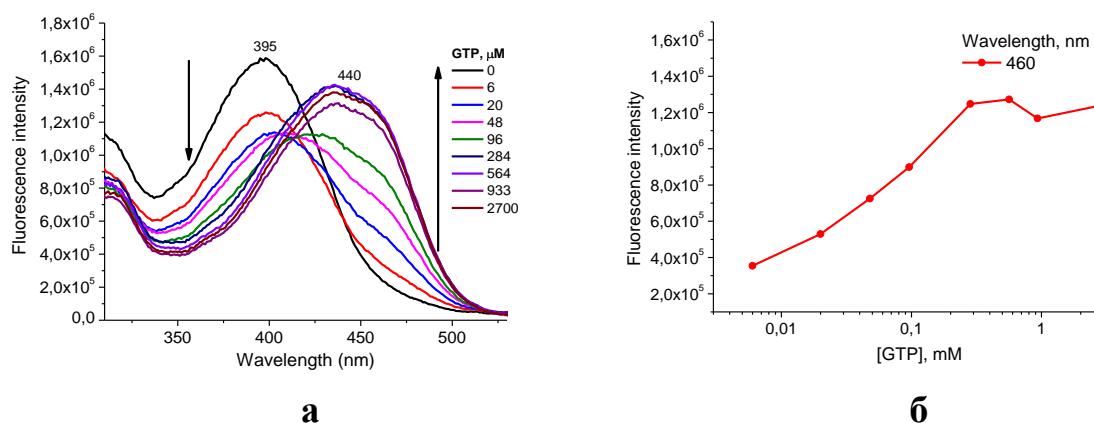


Рис. 5.29. Спектр збудження флуоресценції та залежність інтенсивності флуоресценції (збудження на $\lambda=400$ та 460 нм) від концентрації ГТФ для сполуки **21** (λ_{em} 563 нм, 300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

Для сполуки **21** при додаванні ГТФ у спектрах збудження флуоресценції спостерігається спадання інтенсивності початкової смуги з наступним формуванням нової батохромно зміщеної смуги. Враховуючи батохромне зміщення максимуму поглинання на першому етапі титрування (Рис. 5.25 а), падіння інтенсивності флуоресценції при концентраціях ГТФ 6-20 мкМ слід приписати утворенню комплексу стехіометрії 1:1, а наступне зростання інтенсивності – утворенню комплексу 1:2.

Отже, такі зміни у спектрах поглинання та флуоресценції сполук **13**, **16** та **21** свідчать про те, що при концентраціях ГТФ 6-20 мкМ утворюється комплекс зі стехіометрією 1:1. При концентраціях ГТФ 20 мкМ – 1 мМ відбувається утворення комплексу 1:2, а при вищих – комплексу 1:3. Значне зростання інтенсивності на стадії утворення комплексу 1:2 свідчить про суттєве зменшення локальної концентрації води в оточенні зонду. А падіння оптичної густини - про стекінг планарної частини зонду з нуклеїновою основою. Отже, як і у випадку з АТФ, пуриновий залишок ГТФ перебуває у стекінгу в комплексі з флавонолами. Комплекс стехіометрії 1:3 представляє собою секінговий комплекс, де третя молекула ГТФ частково компенсує електростатичний вплив перших двох на хромофор зонду. Про це свідчить падіння інтенсивності флуоресценції при утворенні такого комплексу.

5.3.2. Дослідження взаємодії синтезованих сполук з АДФ

При додаванні АДФ у спектрах поглинання сполук **13**, **16** та **21** спостерігаються зміни, аналогічні до тих, які були у досліджах з АТФ та ГТФ (Рис. 5.30-5.32). А саме, зменшення оптичної густини, зсув максимуму у довгохвильову частину спектру та поява плеча нової смуги поглинання.

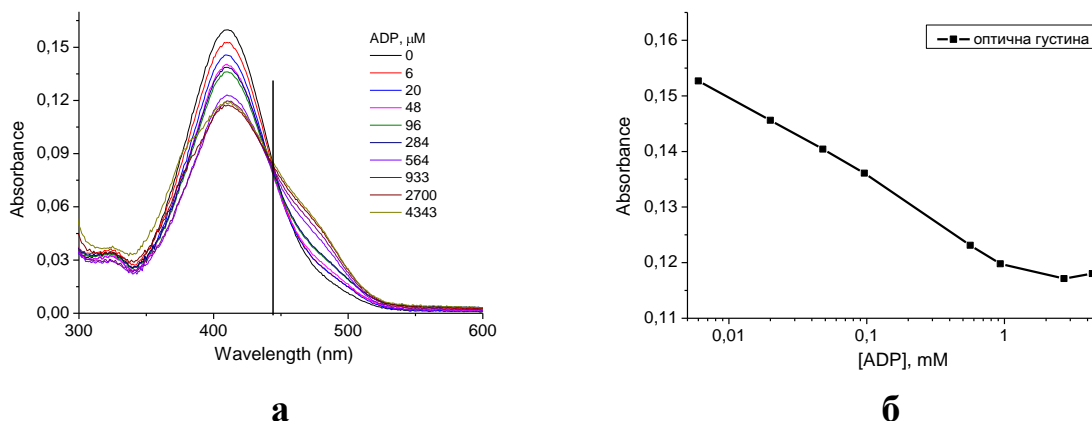


Рис. 5.30. Спектр поглинання сполуки **13** (а) та змін а оптичної густини розчину (б) ($\lambda=410$ нм) при збільшенні концентрації АДФ (300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

У спектрі поглинання сполуки **16** (Рис. 5.31) при першому додаванні АДФ відбувається значний батохромний зсув та зростання оптичної густини (Рис. 5.31 б). Такі зміни можуть свідчити про утворення комплексу зонд-АДФ зі стехіометрією 1:1. Наступне падіння оптичної густини, як і у випадку АТФ (Рис. 5.7) та ГТФ (Рис. 5.24), є свідченням утворення наступного комплексу зі стехіометрією 1:2. Залежність зміни оптичної густини від концентрації АДФ сполук **13** та **16** подано на Рис. 5.30 б та 5.31 б відповідно. Їх форма близька до лінійної замість очікуваної сігмоїдної, що теж свідчить про послідовне утворення кількох комплексів з різною стехіометрією реагентів.

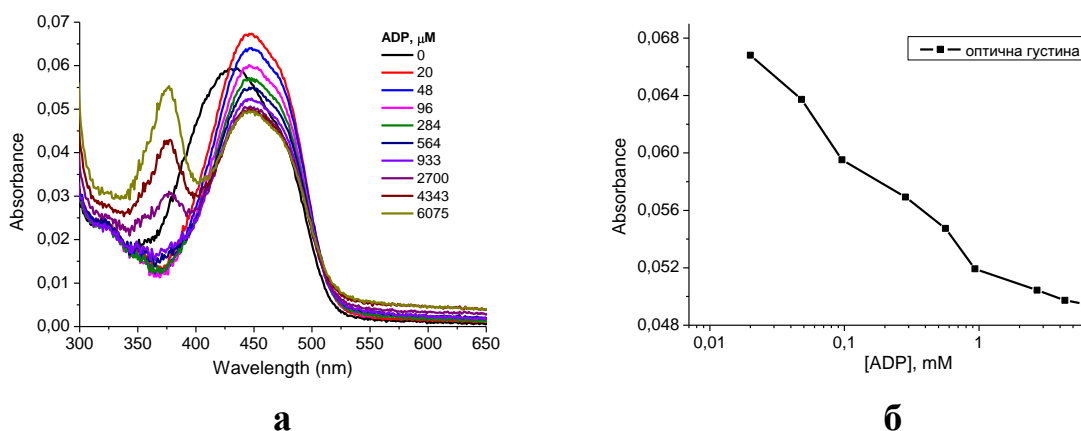


Рис. 5.31. Спектр поглинання сполуки **16** (а) та зміна оптичної густини розчину (б) ($\lambda=450$ нм) при збільшенні концентрації АДФ (300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

Для зонду **21** спостерігається падіння оптичної густини, батохромне зміщення максимуму та формування нової смуги. Відсутність ізобестичної точки свідчить про утворення одночасно кількох типів комплексів (Рис. 5.32 а). Цю тезу підтверджує також форма кривої падіння оптичної густини (Рис. 5.32 б).

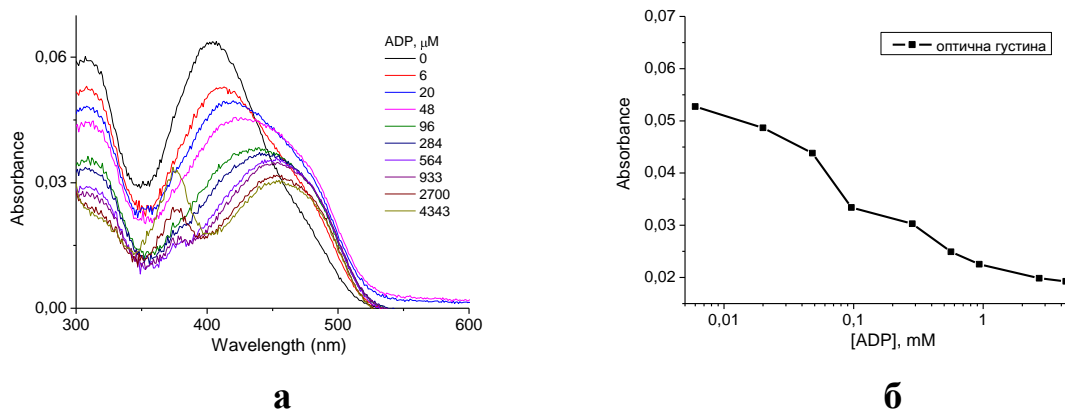
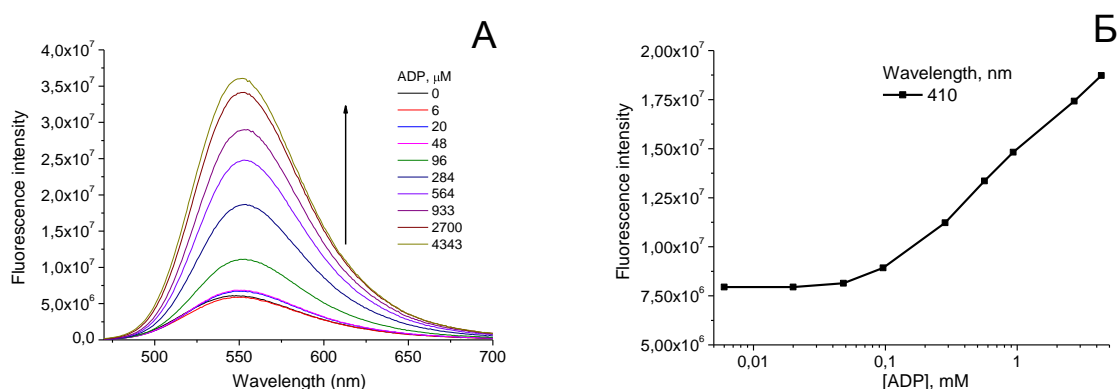


Рис. 5.32. Спектр поглинання сполуки **21** (**а**) та зміна оптичної густини розчину (**б**) ($\lambda=410$ нм) при збільшенні концентрації АДФ (300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

У спектрах флуоресценції сполук **13**, **16** та **21** при додаванні АДФ спостерігається лише зростання інтенсивності флуоресценції, без помітного зміщення максимуму смуги (Рис. 5.33), що аналогічно змінам, які відбувались при взаємодії з АТФ та ГТФ.



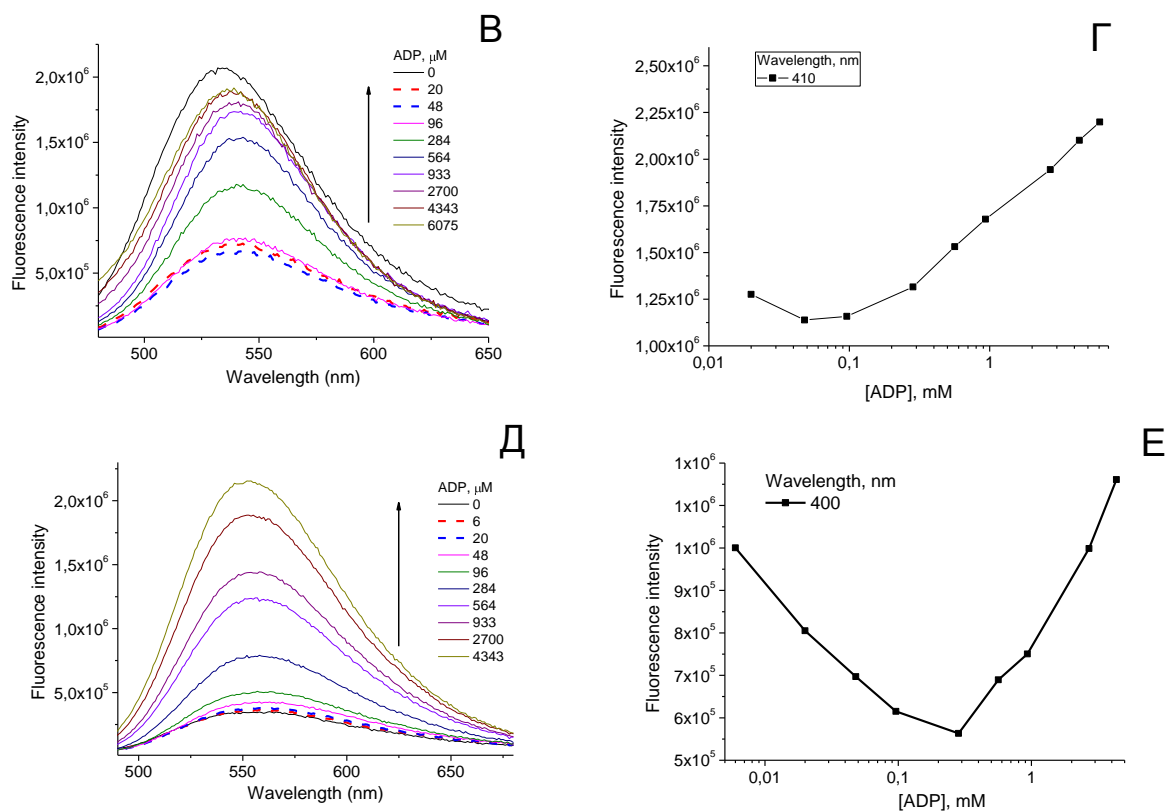


Рис. 5.33. Спектри флуоресценції сполук **13** (λ_{ex} 440 нм) (А), **16** (λ_{ex} 480 нм) (В) та **21** (λ_{ex} 455 нм) (Д) та залежність інтенсивності флуоресценції (збудження на $\lambda=410$ нм) від концентрації для сполук **13** (Б), **21** (Г) та **16** (Е) при збільшенні концентрації АДФ в 300 мМ ТРИС буфері, рН 7.4.

Важливою відмінністю цих спектрів є те, що при концентрації АДФ більше 1 мМ, інтенсивність флуоресценції продовжує зростати (на відміну від АТФ та ГТФ). Ми можемо припустити, що у випадку АДФ утворення комплексу з його димерами не спостерігається. Інтенсивність зростає за рахунок підвищення в'язкості оточення барвника та зменшення локальної концентрації води в його оточенні.

У спектрах збудження флуоресценції барвників **13**, **16** та **21** у присутності АДФ спостерігається утворення нової смуги високої інтенсивності, батохромно зміщеної в середньому на 60 нм, що повторює картини, які спостерігаються при взаємодії з АТФ та ГТФ (Рис. 5.34 – 5.36).

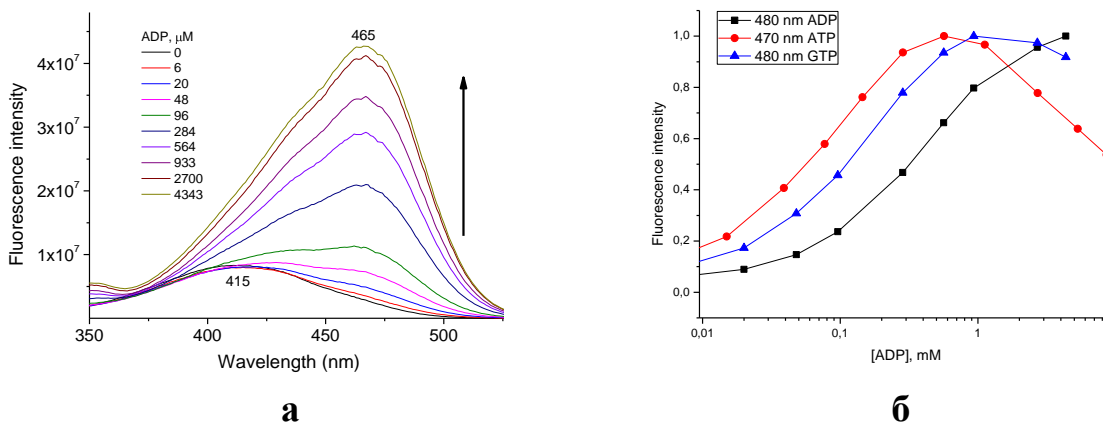


Рис. 5.34. Спектр збудження флуоресценції сполуки **13** (а), зміна інтенсивності флуоресценції (б) ($\lambda=410$ та 480 нм) при збільшенні концентрації АТФ та АДФ (λ_{em} 550 нм, 300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

Залежність зміни інтенсивності флуоресценції сполуки **13** від концентрації (Рис. 5.34 б) показує, що основний її ріст відбувається при концентраціях АДФ вищих за 20 мкМ тоді як у спектрах поглинання присутнє зміщення максимуму, що відповідає утворенню комплексу 1:1 при нижчих концентраціях АДФ. Отже, зростання інтенсивності флуоресценції сполуки **13** відповідає утворенню її комплексу з АДФ зі стехіометрією 1:2. Порівняння ходу кривих титрування для АТФ, АДФ та ГТФ (Рис. 5.34б) свідчить, що комплекс 1:2 з АДФ утворюється при вищих концентраціях, ніж з АТФ та ГТФ, що свідчить про значно нижчий афінитет зонду **13** до АДФ. Оскільки падіння інтенсивності флуоресценції при найвищих концентраціях АДФ не зареєстровано, слід вважати, що у даному випадку комплексу зі стехіометрією 1:3 не утворюється, або ж він має іншу будову, ніж у випадку АТФ та ГТФ.

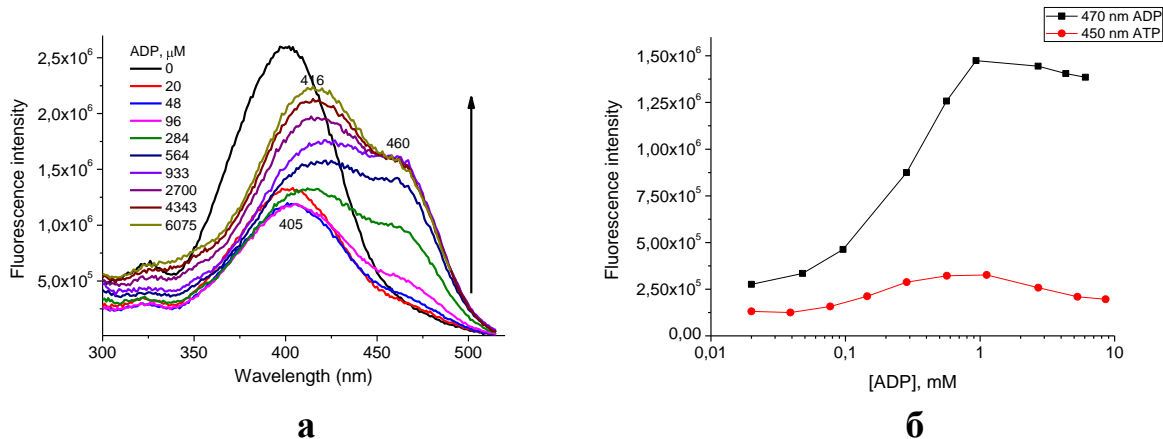


Рис. 5.35. Спектр збудження флуоресценції сполуки **16** (а) та зміна інтенсивності флуоресценції (б) ($\lambda=400$ та 490 нм) при збільшенні концентрації АДФ (λ_{em} 535 нм, 300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

Зміна інтенсивності флуоресценції сполуки **16** від концентрації (Рис. 5.35 б) показує, що основний її ріст відбувається при концентраціях АДФ вищих за 96 мкМ, а у спектрах поглинання (Рис. 5.31) присутнє зміщення максимуму, що відповідає утворенню комплексу 1:1. Зростання інтенсивності флуоресценції сполуки **16** відповідає утворенню її комплексу з АДФ зі стехіометрією 1:2. Порівняння ходу кривих титрування для АТФ та АДФ (Рис. 5.35 б) свідчить, що комплекс 1:2 з АДФ утворюється при вищих концентраціях, ніж з АТФ, що свідчить про значно нижчий афінитет зонду **16** до АДФ.

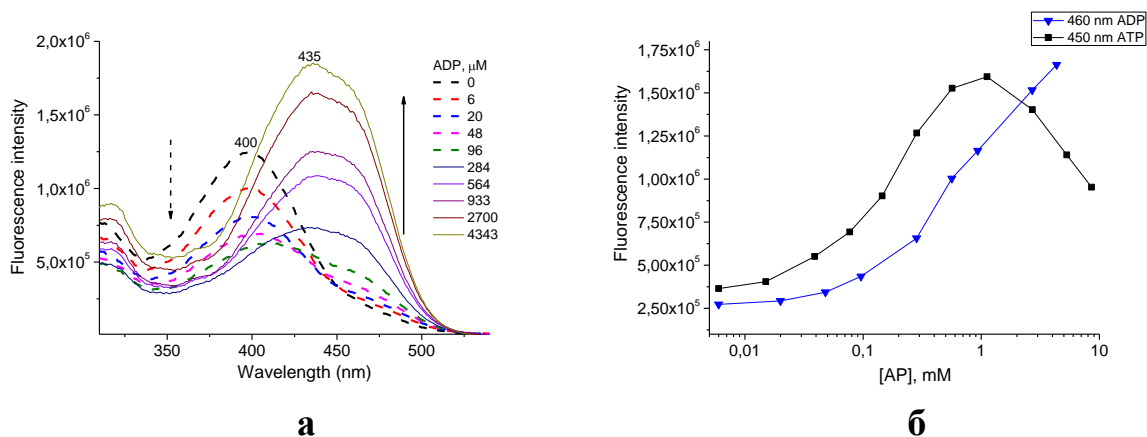


Рис. 5.36. Спектр збудження флуоресценції сполуки **21** (а) та зміна інтенсивності флуоресценції (б) ($\lambda=400$ та 460 нм) при збільшенні концентрації АДФ (λ_{em} 563 нм, 300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

Для сполуки **21** при додаванні АДФ у спектрах збудження флуоресценції спостерігається спадання інтенсивності початкової смуги з наступним формуванням нової батохромно зміщеної смуги. Враховуючи батохромне зміщення максимуму поглинання на першому етапі титрування (Рис. 5.32 а), падіння інтенсивності флуоресценції при концентраціях АДФ 0-20 мкМ слід приписати утворенню комплексу стехіометрії 1:1, а наступне зростання інтенсивності – утворенню комплексу 1:2. Ознак утворення комплексу з АДФ 1:3 у спектрах флуоресценції не проявляється.

Як і у випадку сполуки **16**, утворення комплексу **21**:АТФ зі стехіометрією 1:2 відбувається при значно нижчих концентраціях, ніж комплексу з АДФ (Рис. 5.32 б). Це свідчить про у кілька разів кращий афінітет цих зондів до АТФ у порівнянні з АДФ.

5.3.3. Дослідження взаємодії з АМФ

У спектрах поглинання сполуки **13** спостерігається падіння оптичної густини при додаванні АМФ. Відсутність ізобестичної точки свідчить про одночасне утворення кількох типів комплексів (Рис. 5.37).

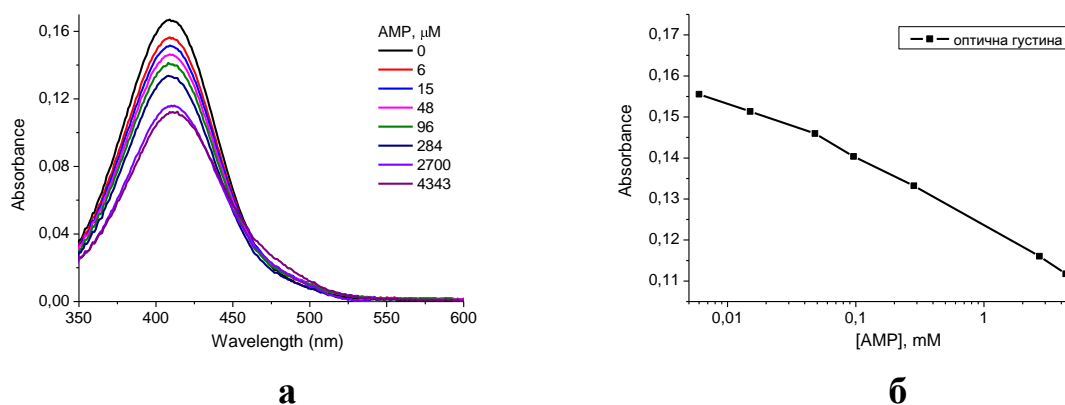


Рис. 5.37. Спектри поглинання сполуки **13** (а) та зміна оптичної густини (б) ($\lambda=410$ нм) при збільшенні концентрації АМФ (300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

У випадку сполуки **21** зміни у спектрі значно виразніші (Рис. 5.38). Додавання АМФ тут викликає суттєве зміщення смуги поглинання у довгохвильовий бік, що є дуже подібним на ефекти з АТФ (Рис. 5.38 б). Такі

зміни спектру поглинання свідчать про вплив аніонної частини АМФ на хромофор сполуки.

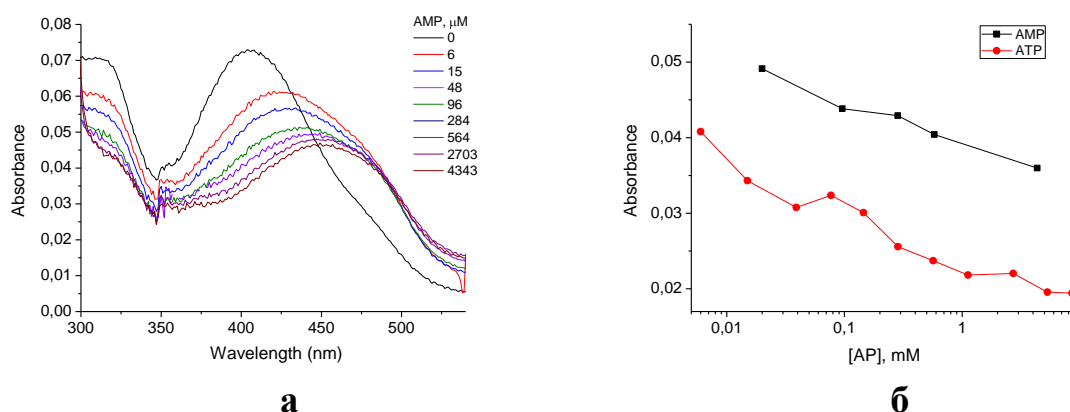


Рис. 5.38. Спектри поглинання сполуки **21** (а) та зміна оптичної густини (б) ($\lambda=430$ нм) при збільшенні концентрації АМФ (300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

У спектрах флуоресценції сполук **13**, **16** та **21** при додаванні АМФ спостерігається двох- і навіть шестикратне падіння інтенсивності флуоресценції при концентраціях нуклеотиду 2 мМ, після чого відбувається незначне зростання емісії, без помітного зміщення максимуму смуги.

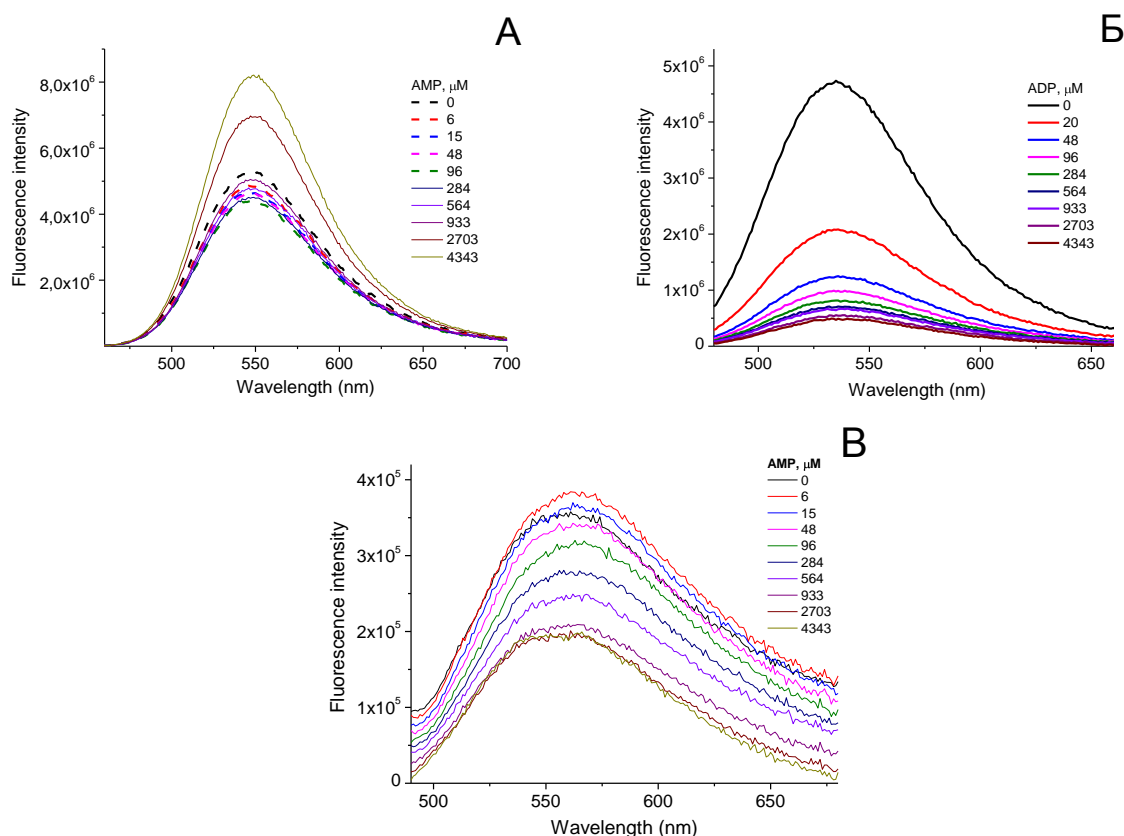


Рис. 5.39. Спектри флуоресценції сполук **13** (λ_{ex} 440 нм) (А), **16** (λ_{ex} 480 нм) (Б) та **21** (λ_{ex} 455 нм) (В) у присутності АМФ в 300 мМ ТРИС буфері, рН 7.4.

Спектри збудження флуоресценції демонструють падіння інтенсивності в широких межах концентрації АМФ. Лише для **13** при концентраціях вище 500 мкМ інтенсивність флуоресценції зростає з незначним батохромним зсувом максимуму (Рис. 5.40 а). Такі незначні зміни у спектрах усіх флавонолів та їх хід при зростанні концентрації АМФ свідчать про незначний вплив аніону АМФ на флавонол у комплексі, а також про значно нижчий афінитет АМФ до флавонолів у порівнянні з іншими нуклеотидами. Падіння інтенсивності флуоресценції на основному сегменті титрування свідчить про утворення комплексу зі стехіометрією 1:1. Зростання інтенсивності, а отже утворення комплексу 1:2 спостерігається лише для флавонолу **13** при концентраціях АДФ вищих 1 мМ.

Отже, як результат специфічності будови аніонів нуклеотидів та флавонолів можна стверджувати, що для більшості з досліджених флавонолів найбільш стійкими є комплекси з трифосфатами АТФ та ГТФ, а найменш стійкими – з монофосфатом АМФ.

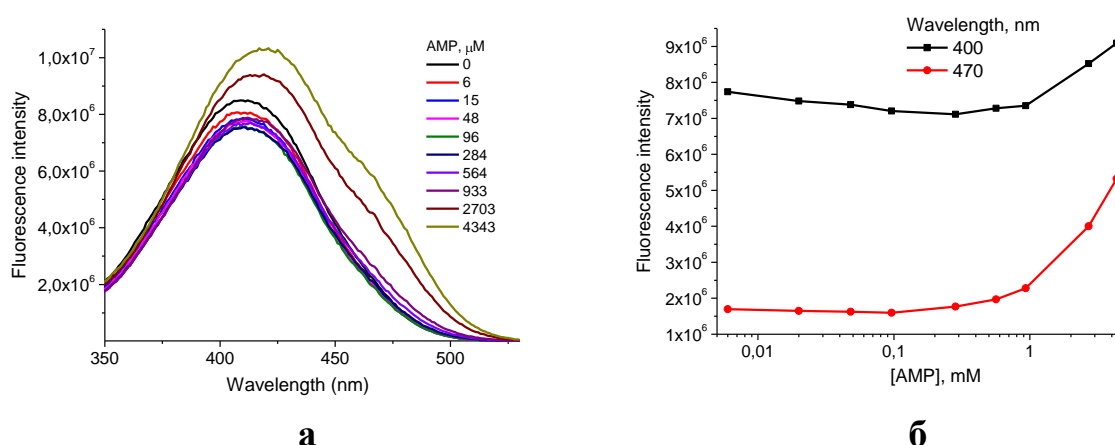
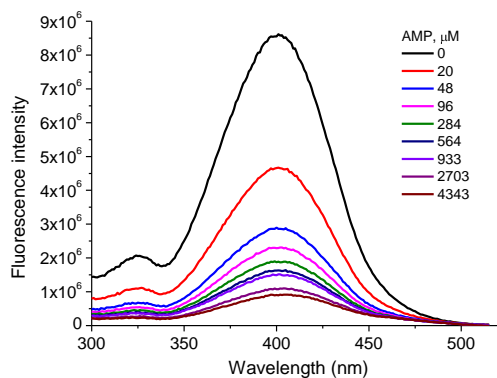
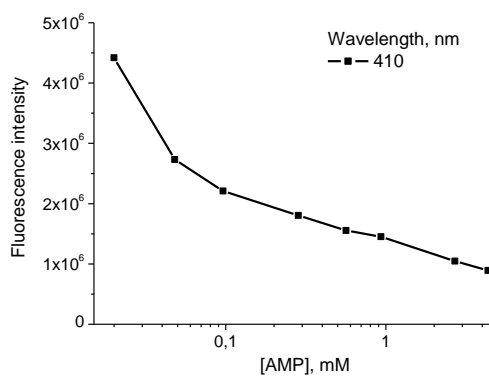


Рис. 5.40. Спектр збудження флуоресценції сполуки **13** (а) та зміна інтенсивності флуоресценції (б) ($\lambda=400$ та 470 нм) при збільшенні концентрації АМФ (λ_{em} 550 нм, 300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).

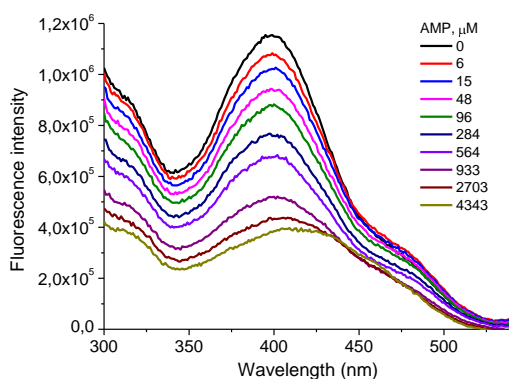


а

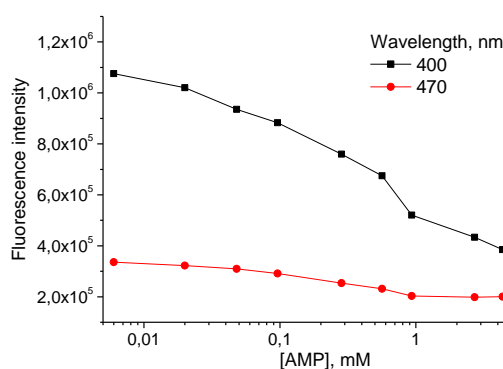


б

Рис. 5.41. Спектр збудження флуоресценції сполуки **16** (а) та зміна інтенсивності флуоресценції (б) ($\lambda=410$ нм) при збільшенні концентрації АМФ (λ_{em} 535 нм, 300 мМ ТРИС буфер, рН 7.4).



а



б

Рис. 5.42. Спектр збудження флуоресценції **а** та зміна інтенсивності флуоресценції **б** (збудження на $\lambda=400$ та 470 нм) при збільшенні концентрації АМФ сполуки **21** λ_{em} 563 нм в 300 мМ ТРИС буфері, рН 7.4.

5.4. Вимірювання анізотропії флуоресценції комплексу сполук з АТФ

З метою встановлення природи комплексів було проведено вимірювання анізотропії флуоресценції флавонолів при збільшенні концентрації АТФ.

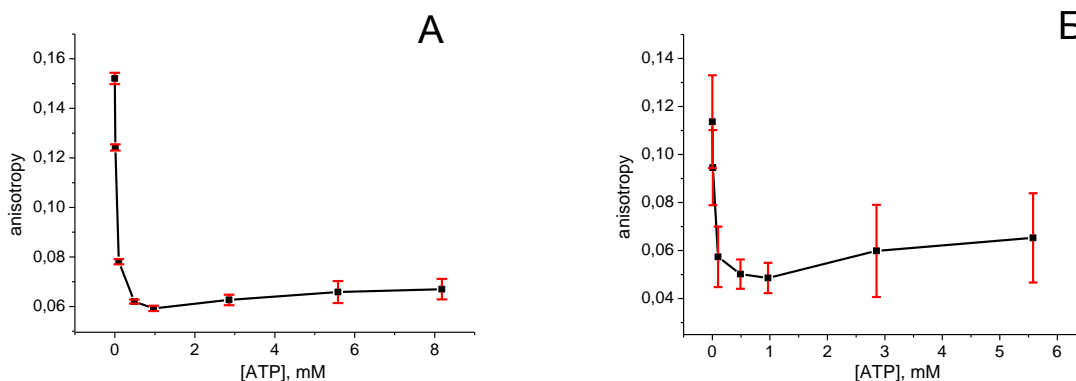


Рис. 5.43. Криві зміни анізотропії флуоресценції сполук **13** (λ_{ex} 445 нм, λ_{em} 570 нм) та **16** (λ_{ex} 440 нм, λ_{em} 560 нм) при додаванні АТФ в 300мМ ТРИС буфері, рН 7.4.

При додаванні АТФ до сполук анізотропія флуоресценції різко зменшується (Рис. 5.43). В перше чергу це пов'язано зі збільшенням часу життя збудженого хромофору у комплексі з АТФ. Оскільки сполуки у вільному стані мають короткий час життя у збудженому стані (низький квантовий вихід), то за час випромінювання вони не встигають змінити орієнтацію диполя, і тому мають достатньо високу анізотропію флуоресценції. При утворенні комплексу з АТФ час життя зростає, що спричиняє зростання квантового виходу флуоресценції. Це дає можливість переорієнтуватись диполу молекули за час випромінювання і сприяє зменшенню анізотропії флуоресценції. Після досягнення концентрації АТФ 1 мМ анізотропія дещо зростає. Такий ефект можна пояснити утворенням комплексу зі стехіометрією 1:3, що підтверджує зроблені вище припущення. Так як хромофор опиняється у комплексі з трьома аніонами АТФ, він має нижчу рухомість, що спричиняє збільшення анізотропії флуоресценції. Такі ефекти анізотропії добре узгоджуються зі спектрами емісії та збудження флуоресценції - при поступовому додаванні АТФ інтенсивність флуоресценції збільшується досягаючи насичення при 1 мМ, далі поступово зменшується.

5.5. Селективність взаємодії досліджуваних сполук з АТФ, АДФ, АДФ та ГТФ

Для визначення селективності взаємодії похідних 3-гідроксифлавонів з нуклеозидфосфатами, були розраховані константи дисоціації комплексу досліджуваних сполук з АТФ, АДФ і ГТФ за рівняннями описаними вище. Дані наведені у Таблиці 5.2.

Таблиця 5.2.

Константи дисоціації комплексів флавонолів з нуклеозидфосфатами.

	13	16	21
АТФ	-4,09	-3,79	-3,73
АДФ	-3,41	-3,82	-3,2
ГТФ	-3,72	-3,72	-4,17

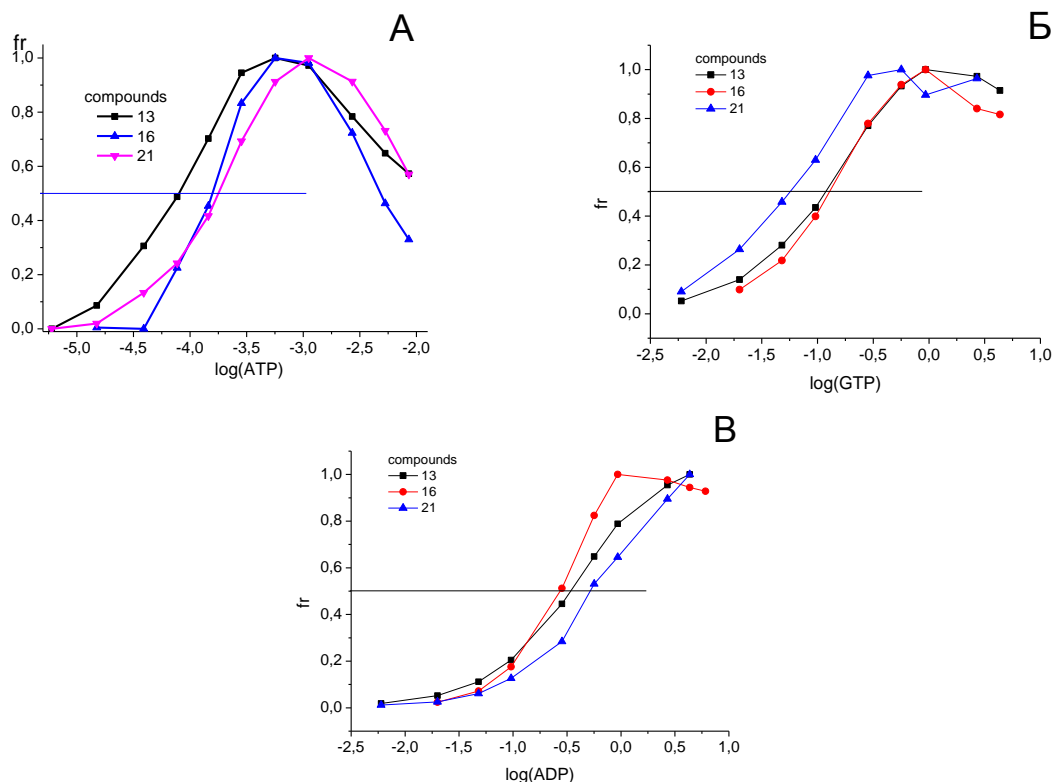


Рис. 5.44. Графіки частка зв'язаного флавонолу (fr) - $\log(NP)$ для АТФ (А), ГТФ (Б) та АДФ (В) сполук **13**, **16** та **21**.

Отримані дані свідчать, що сполука **13** має найвищий афінитет до АТФ (Рис. 5.44 А), а сполука **21** – до ГТФ (Рис. 5.44 Б). Комплекси з АДФ для

цих сполук є менш міцними, як з АТФ та ГТФ. У випадку сполуки **16** селективність не проявляється. У випадку з АМФ спектральна відповідь на комплексоутворення низька. Це означає, що як мінімум два фосфатних залишки необхідні для взаємодії похідних 3-гідроксифлавонолу з нуклеотидами, причому третій фосфат значно покращує стабільність комплексу.

Утворення комплексу відбувається за рахунок π - π стекингових взаємодій між ароматичними кільцями флавонолу і нуклеотидів та електростатичних взаємодій між позитивно зарядженою частиною диполу 3-гідроксифлавонолу та фосфат аніоном. Значний вклад у міцність комплексу створює 3-ОН група та гідроксильні групи замісників біля атома Нітрогену. Так як π - π стекингові взаємодії не є специфічними, то заміна нуклеотиду не впливає на зв'язування. Проте збільшення кількості фосфатних залишків покращує зв'язування, що означає, що електростатичні взаємодії відіграють важливу роль у комплексоутворенні.

5.6. Висновки

Результати дослідження взаємодії флавонолу з нуклеотидфосфатами у водних розчинах за нейтральних значень рН свідчать, що комплексоутворення з нуклеотидами проявляється у наступних спектральних ефектах:

- Зменшення оптичної густини у спектрах поглинання за рахунок стекингу флавонолу з нуклеїновою основою
- Збільшення інтенсивності флуоресценції внаслідок зменшення концентрації молекул води в оточенні флавонолу та усунення гасіння флуоресценції водою. У випадках флавонолу з електроноакцепторними замісниками цей ефект часто маскується відомим ефектом гасіння флуоресценції нуклеїновою основою за рахунок фотоперенесення електрону на флавонол. Проте при утворення

комплексу 1:2 таке гасіння блокується внаслідок компенсації електроноакцепторності флавонолу другою нуклеїною основою.

- Поява нової смуги у спектрах збудження флуоресценції внаслідок потужного електростатичного ефекту фосфатних груп нуклеотиду на хромофор флавонолу.

Сполуки, які містять захищену 3-гідрокси групу проявляють слабкіші ефекти у спектрах флуоресценції та мають нижчий афінітет до нуклеотидів. Це означає, що 3-ОН група приймає участь у комплексоутворенні та у формуванні спектральної відповіді на комплексоутворення.

Результати проведених титрувань флавонолів з ГТФ, АДФ та АМФ свідчать про селективність взаємодії. Флавоноли проявляють схожі спектральні ефекти при взаємодії з АТФ, ГТФ та АДФ, проте константи стабільності комплексів відрізняються у кілька разів. Отримані результати свідчать, що сполука **13** має збільшену селективність до АТФ, тоді як сполука **21** демонструє збільшену селективність до ГТФ. У відношенні до АМФ всі флавоноли проявили занижений афінітет та незначні спектральні ефекти при зв'язуванні.

Розраховані константи дисоціації демонструють, що природа нуклеїнової основи в нуклеозид-3-фосфатах, як і число фосфатних залишків впливає на константу стабільності комплексу з похідними 3-гідроксифлавонолу.

Отримані результати вказують, що комплексоутворенню сприяють не лише π - π стекінгові взаємодії між ароматичними кільцями флавонолів і нуклеозадфосфатів та електростатичні взаємодії між позитивно зарядженою частиною диполу 3-гідроксифлавонолу та фосфат аніоном, а й додаткові гідроксильні групи у боковому ядрі 3-гідроксифлавонолу.

5.7. Експериментальна частина

Гідрат динатрієвої солі аденозин 5'-трифосфату (АТФ), АДФ, ГТФ, АМФ, ДМСО та трис-(гідроксиметиламіно)-метан (ТРИС) хімічно чисті були придбані у Sigma-Aldrich. Спектри поглинання реєстрували на спектрофотометрі Cary 4 (Varian). Спектри флуоресценції були записані на спектрофлуориметрі Fluorolog та FluoroMax 3.0 (HORIBA Jobin Yvon).

Взаємодія сполук з АТФ. Для приготування буферу було розчинено 1,82 г ТРИС у 50 мл Milli-Q води та доведено до рН 7.4 за допомогою хлоридної кислоти. Були приготовлені стоки досліджуваних сполук у ДМСО з концентрацією 200 μM . Для дослідження було відібрано аліквоту 20 μL і додано у кювету, яка містила 780 μL буферу. Таким чином, концентрація усіх досліджуваних флавонолів у розчині завжди складала 5 μM .

Титрування з АТФ було виконано поетапно, додаючи порціями від 6 μL до 30 μL розчину АТФ зі стоків з концентрацією від 1,5 mM до 120 mM АТФ у буфері, який додатково містив 1.7 еквівалентів КОН відносно АТФ. Спектри були записані при 25 °C після кожного додавання.

Взаємодія сполук з ГТФ. Титрування з ГТФ було виконано поетапно, додаючи порціями від 3.2 μL до 32 μL розчину ГТФ зі стоків з концентрацією від 1,5 mM до 50 mM ГТФ у буфері, який додатково містив 1.7 еквівалентів КОН відносно ГТФ. Спектри були записані при 25 °C після кожного додавання.

Взаємодія сполук з АДФ. Титрування з АДФ було виконано поетапно, додаючи порціями від 3.2 μL до 32 μL розчину АДФ зі стоків з концентрацією від 1,5 mM до 50 mM АДФ у буфері, який додатково містив 1.7 еквівалентів КОН відносно АДФ. Спектри були записані при 25 °C після кожного додавання.

Взаємодія сполук з АМФ. Титрування з АМФ було виконано поетапно, додаючи порціями від 3.2 μL до 32 μL розчину АМФ зі стоків з концентрацією від 1,5 мМ до 50 мМ АМФ у буфері, який додатково містив 1.7 еквівалентів КОН відносно АМФ. Спектри були записані при 25°C після кожного додавання.

Отримані у результаті всіх досліджень спектри поглинання, емісії та збудження флуоресценції оброблялися в середовищі програми OriginPro 8. У спектрах поглинання, емісії та збудження флуоресценції внесена поправка на розбавлення розчину досліджуваної речовини при додаванні АТФ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ДО РОЗДІЛУ 5

156. Patel A., Malinovska L., Saha S., Wang J., Alberti S., Krishnan Y., Hyman A. A. Biochemistry: ATP as a Biological Hydrotrope. *Science*. **2017**, 356, 6339, 753–56.
157. Mitchell P. R., Sigel H. Proton Nmr-Study of Self-Stacking in Purine and Pyrimidine Nucleosides and Nucleotides. *European Journal of Biochemistry*. **1978**, 88, 1, 149–54.

РОЗДІЛ 6

МОЛЕКУЛЯРНИЙ ПІНЦЕТ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ АТФ У РОЗЧИНАХ НА ОСНОВІ ФЛАВОНОЛУ

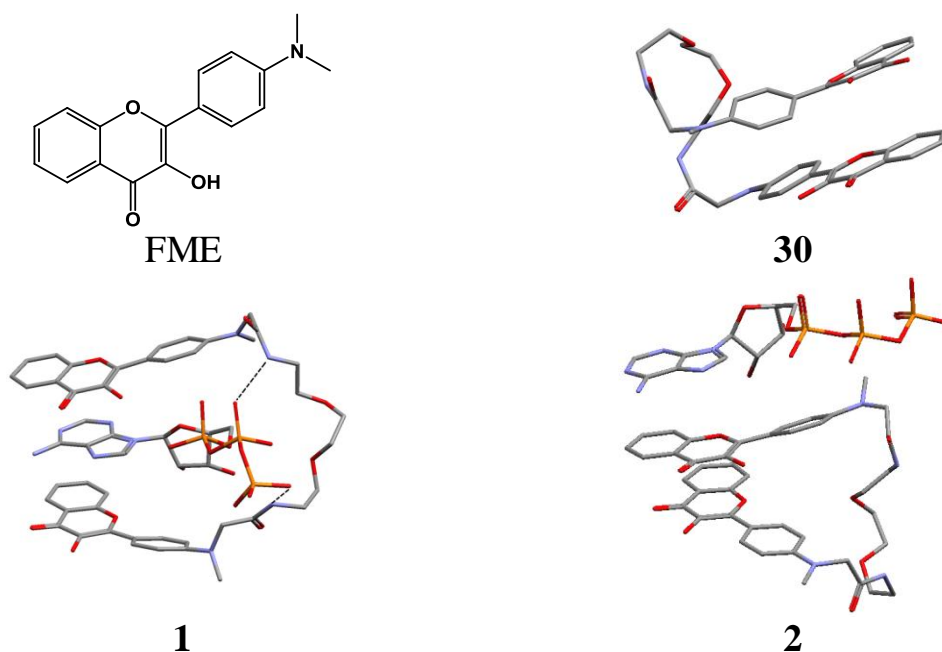
Аналізуючи спектри поглинання та збудження флуоресценції флавонолу FME у присутності АТФ можна переконатись, що довгохвильова смуга, яка інформує про утворення комплексу, утворюється шляхом збудження популяції, яка складає менше 5% від загальної популяції комплексу барвник - АТФ, тоді як інша частина дає приблизно на два порядки нижчу флуоресценцію. Це вказує на те, що лише невелика частина барвника у комплексі має особливу орієнтацію і близьке розташування до заряджених фосфатів АТФ, а не вся популяція, як це було запропоновано раніше [101]. У такому разі, застосовуючи спеціальний дизайн зонду, можна покращити параметри його відповіді на АТФ за рахунок збільшення інформативної частки популяції барвників у комплексі.

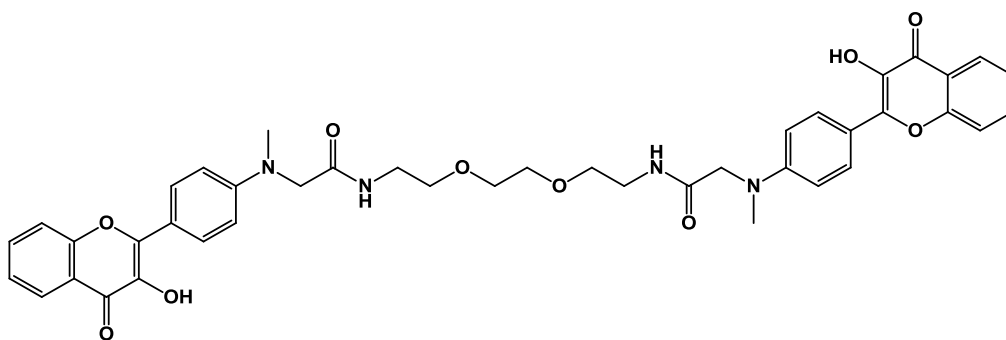
Для досягнення цієї мети ми пропонуємо молекулярний пінцет (Рис. 6.1), що складається з двох флавонольних фрагментів, з'єднаних активним лінкером. Молекулярні пінцети є рецепторами з двома платформами для зв'язування аналізів [158]. Наявність двох планарних хромофорів у молекулі пінцету надає їм підвищену спорідненість та селективність до планарних поліциклічних молекул у розчинах, включаючи АТФ [159, 160] та інші похідні пурину [161] внаслідок збільшення стекінг-взаємодій.

На нашу думку, маючи дві NH-амідні групи, амінокислотний лінкер утворює водневі зв'язки з фосфатами АТФ і цим додатково збільшує частину популяції комплексу зонд - АТФ у представленій конформації (Рис. 6.1). Крім того, збільшення кількості водневих зв'язків та стекінг-взаємодій

має підвищити стабільність комплексу зонд - АТФ. Врешті, наявність двох хромофорів – генераторів аналітичного сигналу, може забезпечити додаткову інформацію про будову комплексу з АТФ, зокрема – про розташування компонентів у комплексі.

Оскільки даний молекулярний пінцет оснащений гнучким лінкером, слід чекати, що у водних розчинах він буде перебувати у «закритому» стані, коли обидва хромофори перебувають у стекінгу за рахунок взаємодій π -орбіталей їх планарних частин (Рис. 6.1). При утворенні комплексу з АТФ аденінова основа може розміститись між двома хромофорами пінцету (1), або біля одного з них (2). У першому випадку обидва хромофори перебуватимуть в оточенні, яке за природою близьке до оточення зонду FME у комплексі з АТФ зі стехіометрією 1:1. У другому випадку оточення обох хромофорів своєрідне, і передбачити флуоресцентну відповідь у такому разі важко.





30

Рис. 6.1. Структура барвника **1** та молекулярного пінцету **30**. ММ⁺ моделі просторової структури вільного пінцету **30** та його комплексу з АТФ. Атоми водню не показані. Пунктирні лінії вказують на водневі зв'язки N-H ... O=P довжиною 2 Å.

6.1. Спектри поглинання

Синтез, підтвердження чистоти зразка та доказ хімічної будови пінцету **30** описано у розділі 3. У спектральних дослідженнях пінцету **30**, який по суті є барвником з двома еквівалентними хромофорами, використовували еталонну сполуку FME, яка за своєю будовою представляє один хромофор пінцету. Незважаючи на однакову структуру хромофорних одиниць, спектри поглинання барвників FME і **30** мають декілька важливих відмінностей (Рис. 6.2). По-перше, барвник **30**, що має подвійне число хромофорів, має коефіцієнт молярної екстинкції, близький до барвника FME з одним хромофором. Смуга поглинання S₀-S₁ пінцету **30** набагато вузла, а її максимум зсунутий у синю область спектру на 35 нм. Ці дві ознаки свідчать про більш гомогенне, менш полярне та менш гідратоване оточення молекулярного пінцету **30**. Враховуючи також і рівень молярної екстинкції, всі ці дані вказують на агрегацію хромофорних одиниць **30** у водному буферному розчині.

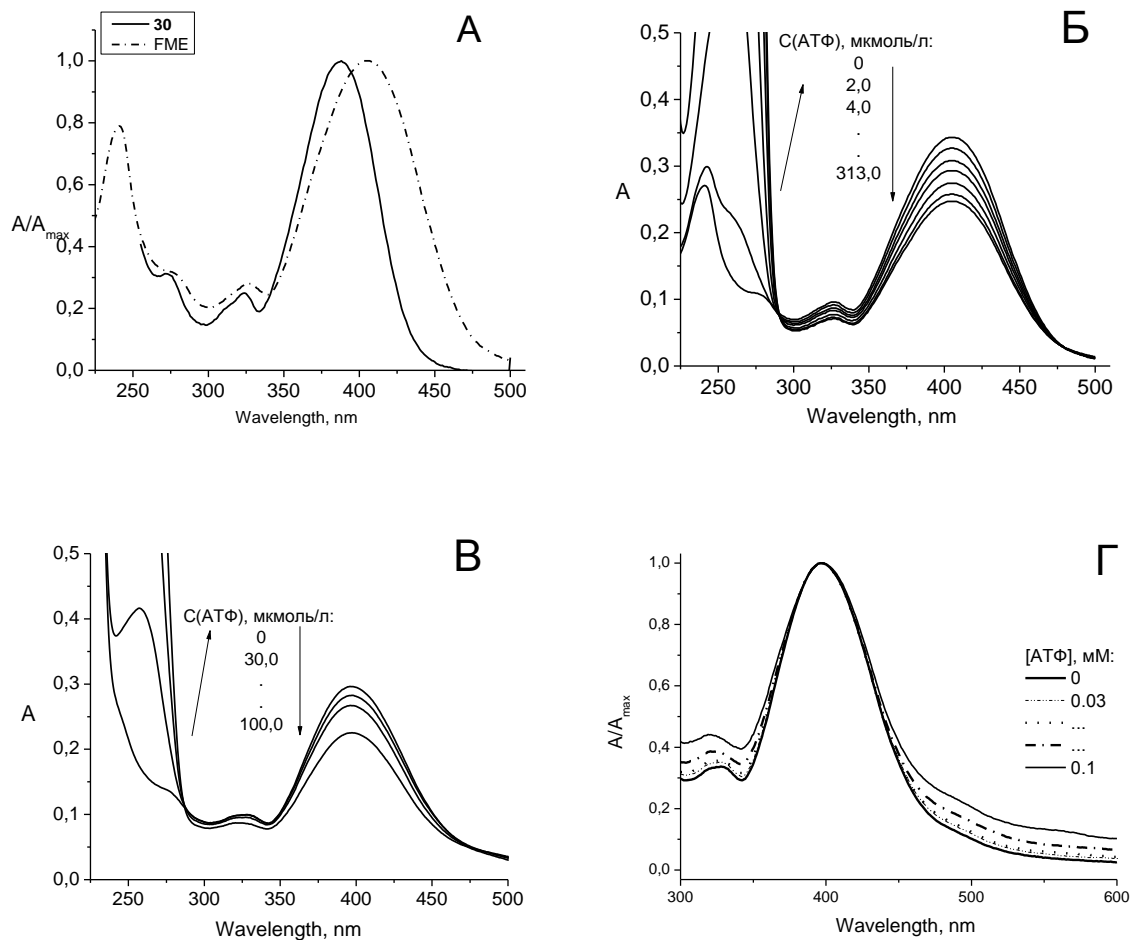


Рис. 6.2. (А) Нормовані спектри поглинання барвників FME (штрих-пунктир) і **30** (суцільна лінія) у буфері вода-ацетонітрил 9:1, рН 7.8. Зміни спектрів поглинання барвника FME (Б) та **30** (В), нормовані спектри поглинання **30** (Г) при збільшенні концентрації АТФ у буфері. Концентрація барвників становить $1 \cdot 10^{-5}$ моль л⁻¹ у всіх випадках.

Збільшення концентрації АТФ у розчині веде до падіння оптичної густини у випадку обох барвників (Рис. 6.2 Б, В). Такий гіпохромний ефект спостерігався раніше для барвника FME [55] і був пояснений стекінг-взаємодіями з аденіновим залишком АТФ. Максимум поглинання барвника FME дещо зміщується в синю область в результаті менш полярного оточення, тоді як барвник **30**, що має агреговані хромофори, не змінює положення максимуму в комплексі АТФ. Описаний гіпохромізм при зростанні концентрації АТФ супроводжується незначним посиленням поглинання на червоному краю смуги S_0-S_1 переходу, яке стає помітним при нормуванні спектрів (Рис. 6.2 Г).

6.2. Спектри флуоресценції

Значні відмінності у флуоресцентних властивостях були встановлені для барвників FME і **30** (Рис. 6.3). По-перше, флуоресценція барвника **30** в буфері у 1.5 рази яскравіша, ніж барвника FME. Також, **30** демонструє на 2000 см^{-1} більший Стоксів зсув, оскільки його максимум поглинання на 2000 см^{-1} зміщений в синю область, а максимумами флуоресценції барвників співпадають. Ще однією відмінністю є те, що смуга флуоресценції **30** є ширшою, що демонструє більш гетерогенне оточення хромофорів барвника у збудженому стані S_1 , на відміну від основного стану, де оточення **30** є більш однорідним, ніж у FME. Це спостереження може свідчити про суттєві зміни відносного розташування хромофорів **30** у збудженому стані.

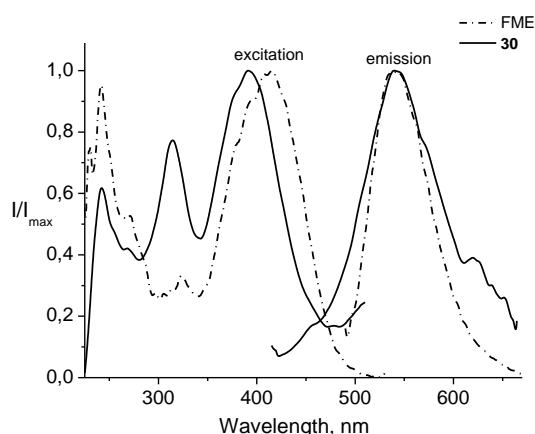


Рис. 6.3. Нормалізований спектр збудження та емісії флуоресценції барвників FME (штрих) та **30** (суцільна лінія) у буфері вода-ацетонітрил 9:1, рН 7.8. $C_{\text{dye}} = 1 \cdot 10^{-6}$ моль л^{-1} у всіх випадках. $\lambda_{\text{ex}} = 460$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 560$ нм для барвника FME. $\lambda_{\text{ex}} = 390$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 544$ нм для барвника **30**.

Ще більш значна різниця у флуоресцентних властивостях спостерігалась для барвників FME і **30** у присутності АТФ (Рис. 6.4). Барвник FME при зростанні концентрації АТФ демонструє червоний зсув максимуму (від 545 до 555 нм) та підвищення інтенсивності флуоресценції. Навпаки, барвник **30** у цих умовах демонструє синій зсув максимуму з 545 до 530 нм, при значно більшому зростанні інтенсивності флуоресценції. У спектрах збудження флуоресценції барвника FME збільшення концентрації

АТФ провокує поступове зміщення максимуму смуги від 425 до 465 нм. У випадку барвника **30** в спектрі з'являється нова смуга з максимумом при 495 нм, тоді як смуга вільного барвника на 395 нм зберігає своє положення та інтенсивність. Смуга при 495 нм є у два рази вищою, ніж при 395 нм, і обидві мають напівширину меншу, ніж смуги барвника FME на початку чи в кінці титрування. Дві смуги, наявні в спектрах збудження вказують, що для двох хромофорів сполуки **30** в стані S_0 існує два типи оточення, і в кожному разі однорідність оточення хромофору є кращою, ніж для барвника FME.

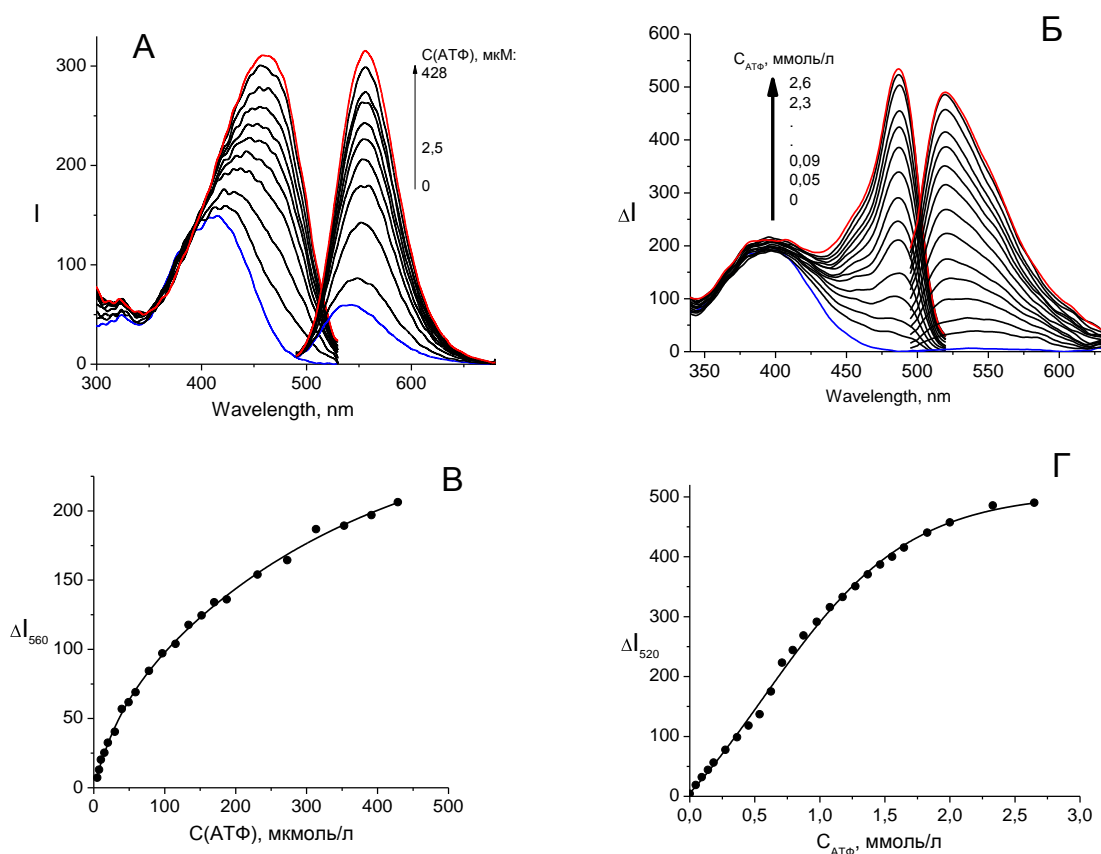


Рис. 6.4. Спектри збудження та випромінювання флуоресценції барвників FME (А) та **30** (Б) при збільшенні концентрації АТФ у буфері вода-ацетонітрил 9:1. Зміни інтенсивності флуоресценції барвника FME (В) та **30** (Г) при збільшенні концентрації АТФ. $C_{\text{dye}} = 1 \cdot 10^{-5}$ моль л⁻¹ у всіх випадках. $\lambda_{\text{ex}} = 460$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 560$ нм для барвника FME. $\lambda_{\text{ex}} = 450$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 544$ нм для барвника **30**.

На нашу думку дві смуги, що спостерігаються в спектрах збудження комплексу **30** з АТФ, є смугами, що належать кожному з двох його

хромофорів: один, просторово наближений до заряджених атомів АТФ, дає довгохвильову смугу. Інший, віддалений від АТФ - короткохвильову. Смуга наближеного флуорофора розташована при 495 нм, де інтенсивність поглинання комплексу **30** - АТФ дуже низька, приблизно 10% від поглинання у максимумі. На основі порівняння площі спектрів поглинання під короткохвильовою і довгохвильовою смугами можна зробити висновок, що у стані S_0 близько 10% флавонольних залишків **30** зберігають близьке положення до заряджених фосфатів АТФ. Саме ці 10% і генерують сигнал про утворення комплексу. Інші 90% є віддаленими від фосфатів АТФ і збуджуються світлом з довжиною хвилі 350-450 нм. Оскільки пінцет має два флуорофори, наведене вище обговорення, зокрема – мала напівширина смуги при 495 нм приводить до висновку, що у близькому контакті з фосфатами АТФ перебуває лише один флуорофор, і тут справджується запропонована структура **2** (Рис. 6.1). На основі наведених вище цифр можна стверджувати, що структуру **2**, яка генерує інформацію про утворення комплексу, має як мінімум 20% комплексу **30**-АТФ. Інші 80% можуть мати як структуру **2**, так і структуру **1**, з віддаленим розташуванням хромофорів пінцету і фосфатів АТФ у обох випадках.

Спектри флуоресценції **30** у присутності АТФ мають низькі значення Стоксового зсуву (близько 1300 cm^{-1}), розрахованого відносно довгохвильової смуги збудження, що свідчить про незначну релаксацію середовища барвника в таких умовах. Малі Стоксові зсуви можуть бути результатом високої в'язкості середовища барвника в електричному полі фосфатів. Слід зауважити, що смуга флуоресценції комплексу **30** - АТФ має набагато більшу напівширину порівняно зі смугою комплексу FME - АТФ. Більша напівширина смуги флуоресценції свідчить про меншу гомогенність оточення. Це може бути додатковим доказом на користь існування кількох популяцій комплексу з різною орієнтацією хромофорів пінцету та АТФ. Можливо також, що після збудження комплекс **30** - АТФ проходить

конформаційні перетворення, під час яких відстань між збудженим флуорофором і полярними фосфатами помітно змінюється. Зміна локальної концентрації молекул води в оточенні флуорофора також має вплив у цьому випадку.

Криві титрування (Рис 6.4 В, Г) свідчать, що інтенсивність флуоресценції барвника FME досягає насичення при концентрації АТФ приблизно 1 мМ, тоді як для барвника **30** насичення відбувається при концентраціях у 3-5 разів вищих. Межа чутливості до АТФ у обох випадках приблизно однакова ~2 мкМ. На підставі таких спостережень можна прийти до висновку, що наявність двох хромофорів у пінцеті значно розширює межі детекції АТФ внаслідок того, що наявні у розчині димери АТФ не впливають на корисний сигнал від зонду.

6.3. Висновки

Отже, синтезований молекулярний пінцет **30** продемонстрував свою ефективність у детекції АТФ, а його флуоресцентні властивості дозволили розкрити будову комплексів з АТФ. Встановлено, що молекулярний пінцет у водних розчинах існує у «закритій» конформації як наслідок стекінгу його планарних гідрофобних частин. У цій же «закритій» конформації він існує у комплексі з АТФ – як мінімум, у випадку 20% його популяції. Значний (100 нм) зсув смуги збудження комплексу пінцет – АТФ та її мала напівширина створюють покращені умови для селективного збудження флуоресценції цього комплексу з метою його детекції у розчинах. Наявність окремої смуги збудження другого, віддаленого від АТФ хромофору створює зручні умови для ратіометричного визначення концентрації комплексу пінцет – АТФ. Указані можливості разом із більш широкими межами детекції АТФ є суттєвими перевагами молекулярного пінцету у порівнянні з простими монохромоформними конструкціями флуоресцентних зондів.

6.4. Експериментальна частина

Всі реактиви були хімічно чистими і придбані в Sigma-Aldrich. Синтез еталонної сполуки FME описаний у роботі [162]. У спектральних експериментах використовували бідистильовану воду, ацетонітрил (градієнтний сорт для ВЕРХ, Sigma-Aldrich) та трис(гідроксиметиламіно)метан (TRIS, від Merck). Сталий рН розчинів підтримували за допомогою буфера TRIS-HCl у точці рН 7.8. Робочі розчини містили 10% ацетонітрилу у всіх спектральних експериментах. Спектри поглинання фіксували на спектрофотометрі Shimadzu 2401PC а спектри флуоресценції - на спектрофлуориметрі Perkin Elmer LS 55 (UK) при 22 °С.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ДО РОЗДІЛУ 6

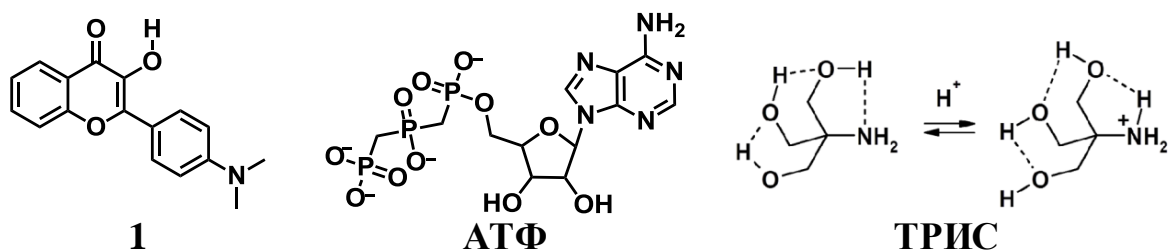
158. Chen C. W., Whitlock H. W. Molecular Tweezers: A Simple Model of Bifunctional Intercalation. *Journal of the American Chemical Society*. **1978**, 100, 15, 4921–22.
159. Xu Z., Singh N. J., Lim J., Pan J., Kim H. N., Park S., Kim K. S., Yoon J. Unique Sandwich Stacking of Pyrene-Adenine-Pyrene for Selective and Ratiometric Fluorescent Sensing of ATP at Physiological pH. *Journal of the American Chemical Society*. **2009**, 131, 42, 15528–33.
160. Tang J.-L., Li C.-Y., Li Y.-F., Zou C.-X. A Ratiometric Fluorescent Probe with Unexpected High Selectivity for ATP and Its Application in Cell Imaging. *Chemical Communications*. **2014**, 50, 97, 15411–14.
161. Zimmerman S. C., Wu W. A Rigid Molecular Tweezer with an Active Site Carboxylic Acid: An Exceptionally Efficient Receptor for Adenine in an Organic Solvent. *Journal of the American Chemical Society*. **1989**, 111, 20, 8054–55.
162. Ormson S. M., Brown R. G., Vollmer F., Rettig W. Switching between Charge- and Proton-Transfer Emission in the Excited State of a Substituted 3-Hydroxyflavone. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*. **1994**, 81, 2, 65–72.

РОЗДІЛ 7

ФЛУОРИМЕТРІЯ КОМПЛЕКСІВ ФЛАВОНОЛІВ З АДЕНОЗИН-5'-ТРИФОСФАТОМ ПРИ ЗМІНІ ІОННОЇ СИЛИ, рН РОЗЧИНУ ТА КОНЦЕНТРАЦІЇ ОРГАНІЧНОГО БУФЕРА

7.1. Флуориметрія комплексів 4'-диметиламінофлавонолу з аденозин-5'-трифосфатом

Відомо, що флавонол **1** утворює з АТФ комплекси, внаслідок чого інтенсивність флуоресценції зростає, а смуга збудження флуоресценції зонду в комплексі зміщується на рекордні 60 нм у довгохвильову область [101]. Усі найближчі за будовою до АТФ нуклеотиди (аденозин-5'-дифосфат, аденозин-5'-монофосфат, гуанозин-5'-трифосфат, інозин-5'-трифосфат, урідин-5'-трифосфат, нікотинамід-динуклеотид тощо) не створюють такого специфічного відгуку у спектрі зонду [55], чим і підтверджується висока селективність його флуоресцентної відповіді на зв'язування з АТФ. Дослідження агрегації зонду **1** з АТФ проводилося в умовах нейтральних значень рН та незначних варіацій концентрації та складу буферу. У дослідженнях АТФ – зонд застосовується значно ширший спектр хімічного складу середовища – з варіацією іонної сили, рН та вмісту малих органічних молекул [163-166], тож це спонукало нас до поглибленого дослідження умов, у яких можливе утворення комплексів флавонолу з АТФ та їх флуориметрична реєстрація. Метою даного розділу роботи є вивчення впливу рН, іонної сили розчину та концентрації буферу на флуоресценцію комплексів флавонол – АТФ та підтвердження природи впливу аніону АТФ на флуоресценцію зонду в комплексах.



Зростання концентрації органічного буферу ТРИС у розчині **1** веде до 1000-кратного зростання інтенсивності його флуоресценції без помітних змін у положенні максимумів та напівширині смуг спектрів збудження флуоресценції (Рис. 7.1 а). Такі зміни є характерними для переважної більшості флуоресцентних барвників у водних розчинах. Зростання інтенсивності флуоресценції тут пов'язане зі зменшенням впливу численних механізмів гасіння флуоресценції індивідуальними молекулами води та їх комплексами [167]. У присутності 2.8 мМ АТФ положення максимуму у спектрі збудження зміщується на 50 нм у довгохвильову область. Початкова інтенсивність флуоресценції є більшою на порядок, ніж у відсутності АТФ і надалі ще збільшується на півтора порядки при зростанні концентрації ТРИС у розчині (Рис. 7.1 б,в). Такі зміни є характерними для переважної більшості флавонолів при появі АТФ у розчині [55, 101, 168, 169, 170]. Розгоряння флуоресценції при зростанні концентрації ТРИС тут теж можна пов'язати з пригніченням процесів гасіння флуоресценції водою, а значне зменшення напівширини смуги – збільшенням однорідності у просторовій будові комплексів **1** з АТФ [55, 101]. Головним же результатом дослідження є спостереження щодо положення спектрів збудження флуоресценції **1** без АТФ та у присутності АТФ, які значно різняться між собою при всіх досліджених концентраціях буферу ТРИС у розчині (Рис. 7.1 г). Поряд із даними, отриманими у розчині 0.25 М сахарози [55, 101] ці дані свідчать про можливість флуориметричного визначення концентрації АТФ у присутності високих концентрацій низькомолекулярних органічних сполук у розчині.

Спектри флуоресценції комплексів зонду **1** з АТФ при високих концентраціях ТРИС у розчині локалізовані при 550 нм. За формою і положенням вони мало відрізнялися від отриманих раніше [55, 101] в умовах розбавлених буферів та у присутності 0.25 М сахарози.

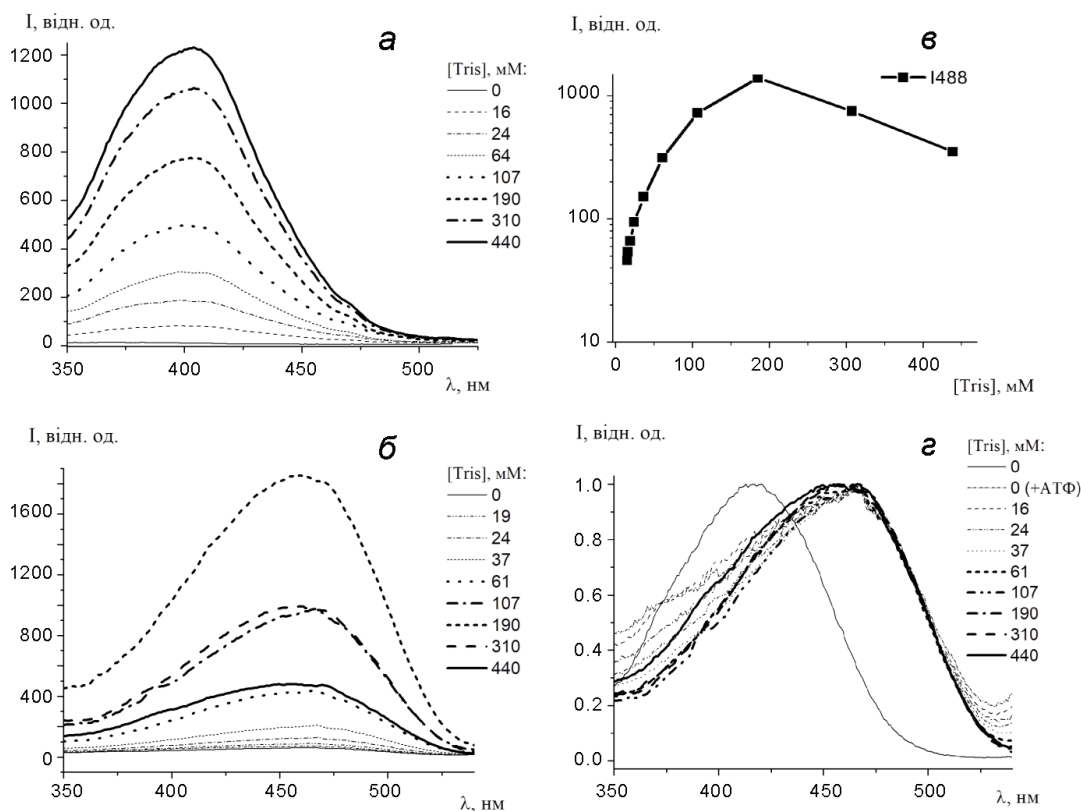


Рис. 7.1. Зміни у спектрах збудження флуоресценції зонду **1** у вільному стані (а), та у присутності 2.8 мМ АТФ (б) при збільшенні концентрації буферу ТРИС у розчині (рН 7.4). Крива зміни інтенсивності флуоресценції комплексів **1**-АТФ від концентрації буферу ТРИС у розчині (в) та їх нормовані спектри флуоресценції (г). Концентрації **1**: $2 \cdot 10^{-6}$ М у всіх випадках. Реєстрація флуоресценції здійснювалась на 550 нм у всіх випадках.

Зростання концентрації натрій хлориду у розчині **1** веде до 20-кратного росту інтенсивності флуоресценції без помітних змін у положенні максимумів та напівширині смуг спектрів збудження флуоресценції (Рис. 7.2 а). Оскільки збільшення іонної сили посилює агрегацію органічних сполук, що присутні у розчині, ці спостереження також можуть бути пов'язані зі зменшенням локальної концентрації води у сольватній оболонці

зонду і, як наслідок – з пригніченням процесів гасіння флуоресценції водою [167]. У випадку комплексів **1** – АТФ теж спостерігається подібний ефект розгоряння флуоресценції при збільшенні концентрації NaCl (Рис. 7.2 б,в), проте додатково тут зафіксовано зміну форми спектру та зміщення максимуму смуги з 465 до 415 нм (Рис. 7.2 г). Цей ефект свідчить про поступове зменшення популяції аніонної форми **1** [101] (яка формує довгохвильову частину спектру збудження) у складі комплексу на користь нейтральної форми флавонолу. Отже, поява катіонів натрію у сольватній оболонці комплексу **1** – АТФ зменшує популяцію аніонної форми зонду. Цей факт є додатковим свідченням на користь електростатичної природи ефекту, що спостерігається у спектрах збудження комплексу **1** – АТФ [101]. У випадку комплексів **1** з аденозиндифосфатом та аденозинмонофосфатом електростатичний вплив не спостерігається навіть за відсутності хлориду натрію [55], а у комплексі з гуанозинтрифосфатом він проявляється у значно меншій мірі внаслідок нижчої основності гуанінового залишку та/або іншої орієнтації компонентів у комплексі **1** – ГТФ.

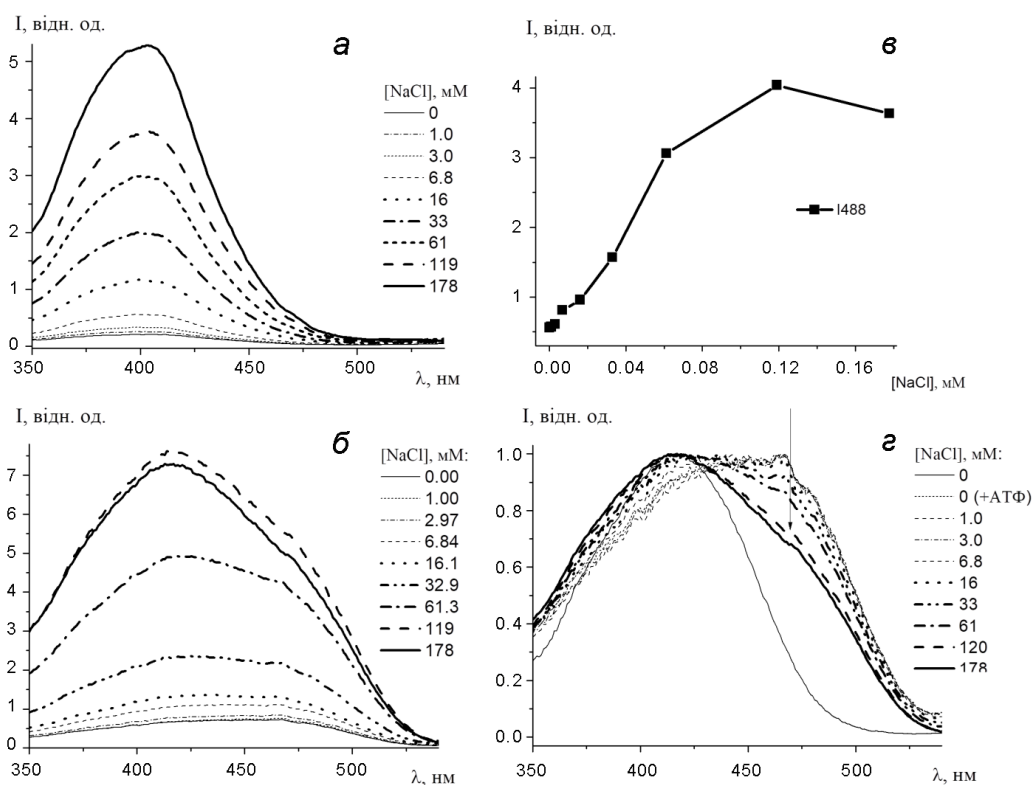


Рис. 7.2. Зміни у спектрах збудження флуоресценції зонду **1** у вільному стані (а), та у присутності 2,8 мМ АТФ (б) при збільшенні концентрації NaCl у розчині (15 мМ ТРИС, рН 7.4). Крива зміни інтенсивності флуоресценції комплексів **1**-АТФ від концентрації NaCl у розчині (в) та їх нормовані спектри флуоресценції (г). Концентрації $1: 2 \cdot 10^{-6}$ М у всіх випадках. Реєстрація флуоресценції здійснювалась на 550 нм у всіх випадках.

Спектри збудження флуоресценції комплексу **1**-АТФ сильно різняться за інтенсивністю і положенням максимуму при різних значеннях рН розчину, що свідчить про високу рН-чутливість його флуоресценції. У даному досліді було важливим визначити межі рН, у яких спектр збудження комплексу найбільше відрізняється за положенням від спектру збудження вільного зонду. Саме така різниця уможливує ратіометричне визначення АТФ у розчині при сталих рН. Згідно до отриманих даних, смуга збудження флуоресценції з максимумом при 468 нм, або її компонента, присутня у спектрах, отриманих у межах рН 5.75 – 9.5, що свідчить про можливість визначення АТФ у цих межах. При значеннях рН > 9 максимум смуги зсувається до 425 нм, що відповідає вільній аніонній формі **1** [55, 101]. На основі цих даних є логічним зробити припущення, що при рН > 9 комплекс **1**-АТФ втрачає протон, який водневим зв'язком скріплює компоненти між собою (Рис. 7.4, [101]), і комплекс дисоціює.

Ще одним важливим результатом, отриманим у даному досліді, є реєстрація зростання інтенсивності флуоресценції при підвищенні рН у межах від 7.2 до 8.4 (Рис. 7.3 а). Воно свідчить про зростання вмісту аніонної форми у комплексі з АТФ і є додатковим підтвердженням того, що аніонна форма **1**, яка утворюється у комплексі **1** – АТФ шляхом зміщення протону 3-ОН групи до основного центру аніону АТФ, саме вона і формує довгохвильову частину спектру збудження, відповідальну за корисний сигнал зв'язування зонду з АТФ (Рис. 7.4).

При зниженні рН розчину до 2.75 у спектрі збудження флуоресценції комплексу **1** – АТФ зареєстровано дві смуги з максимумами при 340 і 407

нм. Перша смуга за своїм положенням у спектрі відповідає протонаній формі **1** [171], тоді як друга – вільній формі зонду. На основі цих даних можна допустити, що за таких умов відбувається дисоціація більшої частини комплексу **1** – АТФ.

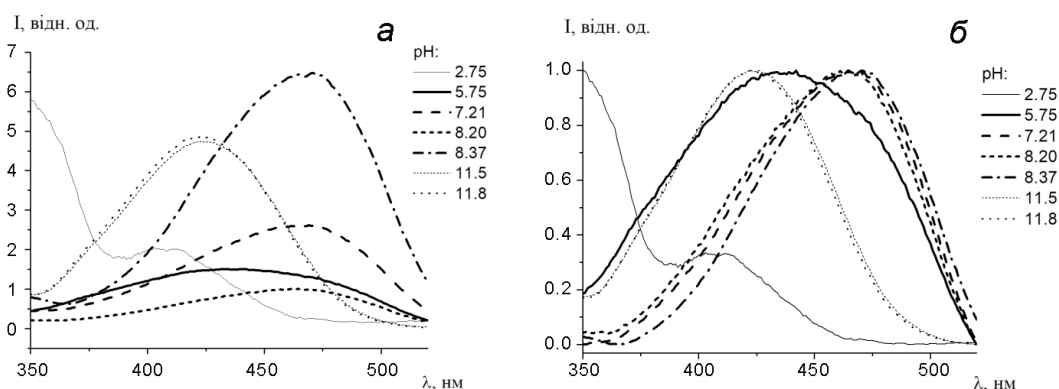


Рис. 7.3. Спектри збудження флуоресценції зонду **1** у присутності 2.8 мМ АТФ за різних значень рН розчину (а) та їх нормований варіант (б). Концентрація **1**: $2 \cdot 10^{-6}$ М (15 мМ ТРИС). Реєстрація флуоресценції здійснювалась на 550 нм у всіх випадках.

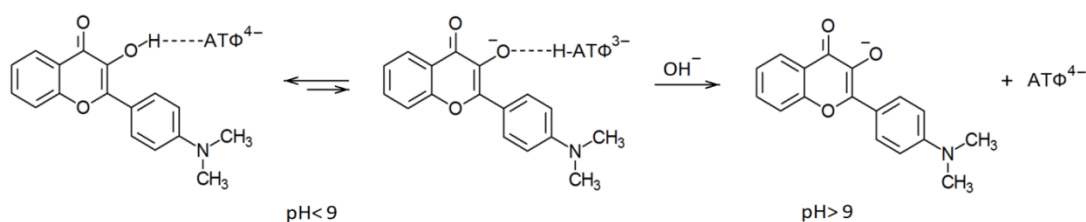
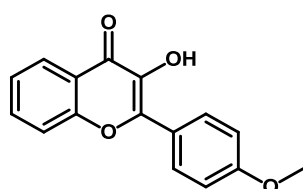


Рис. 7.4. Структура комплексу зонду **1** з АТФ та схема його дисоціації при підвищенні рН. У рівновазі перебувають дві форми, з яких права відповідальна за флуоресцентну відповідь зв'язування зонду з АТФ.

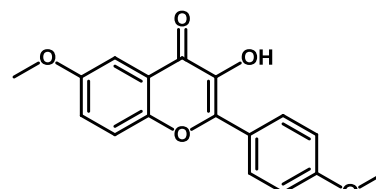
7.2. Утворення комплексів метоксифлавонолів з АТФ

Пропередні результати спонукали нас дослідити агрегацію метоксифлавонолів з АТФ, оскільки саме вони володіють найбільш яскравою флуоресценцією у водних розчинах. Додатково у порівнянні з власне гідроксильованими флавонолами їх метокси похідні не будуть ускладнювати спостереження за зав'язуванням з АТФ утворенням аніонних форм різного типу, що варто враховувати у таких дослідах [172]. Для дослідження були взяті: 2-(4-(диметиламіно)феніл)-3-гідрокси-4Н-хромен-4-

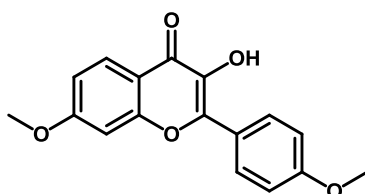
он (1), що використовувався як референтна сполука, 3-гідрокси-2-(4-метоксифеніл)-4Н-хромен-4-он (2), 3-гідрокси-6-метокси-2-(4-метоксифеніл)-4Н-хромен-4-он (3), 3-гідрокси-7-метокси-2-(4-метоксифеніл)-4Н-хромен-4-он (4) та 2-(3,4-диметоксифеніл)-3-гідрокси-4Н-хромен-4-он (5).



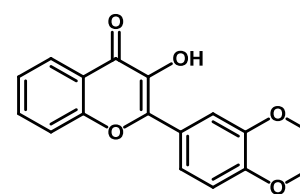
2



3



4



5

Попередньо кожен з флавонолів методом спектрофотометрії був досліджений на предмет автоагрегації в умовах досліду. Для уникнення автоагрегації робочі концентрації сполук **1** та **2** було знижено у кілька разів, до $2,5$ та $3,4 \cdot 10^{-6}$ М відповідно, при яких автоагрегація в умовах досліду не спостерігалася.

Додавання АТФ до розчинів флавонолів у всіх випадках викликає гіпохромний ефект у спектрах поглинання, що ми пояснюємо утворенням комплексів з АТФ (Рис. 7.5). Найпотужніше падіння оптичної густини розчину відбувається у випадку сполук **1**, **2** та **5**, які мають метильні замісники лише у боковому ядрі. На нашу думку, фізична причина такого значного падіння оптичної густини пов'язана з будовою комплексів. Саме у цих випадках комплекси з АТФ можуть мати збільшену кількість молекул флавонолу, або ж особливу орієнтацію компонентів, у якій відбувається максимальна компенсація дипольного моменту переходу флавонолу у

збуджений стан. У всіх випадках при агрегації з АТФ оптична густина розчину при 600 нм залишалася незмінною (близькою до нуля) вказуючи на те, що інтенсивність розсіювання світла розчином не зростає при додаванні АТФ. Це є свідченням того, що при агрегації з АТФ у розчині великі (нанорозмірні) комплекси не утворюються.

Ізобестичні точки на спектральних кривих флавонолів **1** та **4** свідчать про утворення лише одного типу комплексу, тоді як у випадку сполук **2**, **3** та **5** ізобестичних точок не спостерігається. Ми вважаємо, що в останніх випадках при появі АТФ у розчині одночасно утворюються кілька типів комплексів. І дійсно, аналіз кривих залежності оптичної густини від концентрації АТФ, отриманих на максимумі поглинання свідчить про те, що у випадку сполук **2** та **5** агрегація починається при концентраціях АТФ, на порядок нижчих, ніж для інших флавонолів (Рис. 7.5 Е), що може бути пов'язаним з високою гідрофобністю цих флавонолів [173], яка веде до збільшення стійкості їх комплексів з АТФ. Оскільки у найбільш простих випадках сполук **1** та **4** хід титриметричних кривих згідно до методології Бенеші-Гільдебранда [174] відповідає утворенню комплексу стехіометрії 1:1, ми вважаємо, що у випадку сполук **2** та **5** при низьких концентраціях АТФ спочатку утворюються комплекси флавонол:АТФ стехіометрії 2:1. Саме подвійна кількість молекул флавонолу в комплексі може бути причиною значного падіння оптичної густини розчину, що спостерігається під час взаємодії з АТФ.

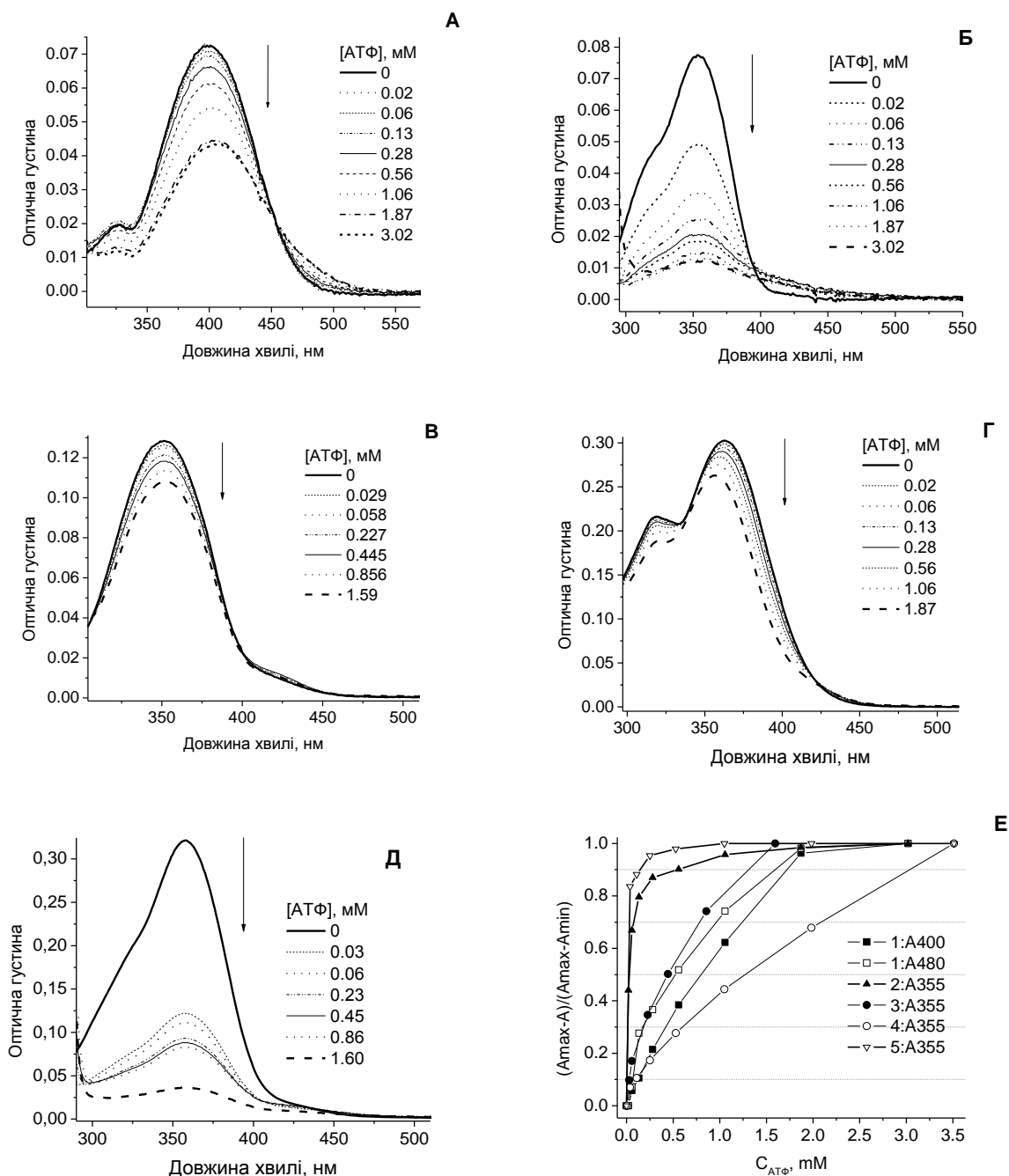


Рис. 7.5. Зміни у спектрах поглинання сполук **1** (А), **2** (Б), **3** (В), **4** (Г) та **5** (Д) при збільшенні концентрації АТФ у розчині 20 мМ фосфатного буферу рН 7.2, 150 мМ NaCl та титрометричні криві в координатах частка падіння оптичної густини у максимумі поглинання $(A_{\max} - A) / (A_{\max} - A_{\min})$ від концентрації АТФ (Е). Концентрації флавонолів: $2,5 \cdot 10^{-6}$ М (**1**), $3,4 \cdot 10^{-6}$ М (**2**), $5,6 \cdot 10^{-6}$ М (**3**), $1,3 \cdot 10^{-5}$ М (**4**), $1,1 \cdot 10^{-5}$ М (**5**).

У спектрах флуоресценції флавонолів агрегація з АТФ викликає зміщення смуги у довгохвильовий бік та зменшення її на півширини (Рис. 7.6). Перша ознака може свідчити про повне або часткове утворення

аніонної форми флавонолу [101] внаслідок сильного збільшення полярності оточення зонду – результат тісного розташування чотиризарядного трифостату АТФ, тоді як зменшена напівширина – про кращу гомогенність молекулярного оточення флавонолу в комплексі у порівнянні з індивідуальним флавонолом. Збудження флуоресценції на довгохвильовому плечі смуги поглинання веде до отримання спектру, який раніше віднесли до аніонної форми флавонолу у комплексі з АТФ як результату електростатичного впливу чотиризарядного аніону та збільшеної основності залишку аденозину у порівнянні з іншими нуклеїновими основами [101]. Утворення аніонної форми флавонолу також може свідчити про те, що у комплексі з АТФ локальне значення рН відрізняється від того, що створюється у масиві розчину буфером. Збудження на максимумі поглинання флавонолу дає спектр, де присутнє лише плече аніонної форми флавонолу (Рис. 7.6 Б), а у випадку флавонолу **5** навіть плече аніонної форми не спостерігається (Рис. 7.6 Д). Це вказує на те, що при збудженні у комплексах з АТФ флавоноли існують у двох формах: у першій флавонол є нейтральною молекулою, а в другій - аніоном. І співвідношення цих форм більше залежить не від кислотності ОН-групи флавонолу (яка для піддослідних сполук є дуже близькою), а від будови комплексу з АТФ, точніше – від взаємної орієнтації компонентів у комплексі. Підтвердженням впливу орієнтації компонентів у комплексі на спектральні властивості може бути і той факт, що у випадку сполуки **2** при зв'язуванні з високополярним аніоном АТФ смуга флуоресценції зміщується на 10 нм у короткохвильовий бік, вказуючи на дестабілізаційну орієнтацію поля аніону відносно диполя збудженої молекули **2**.

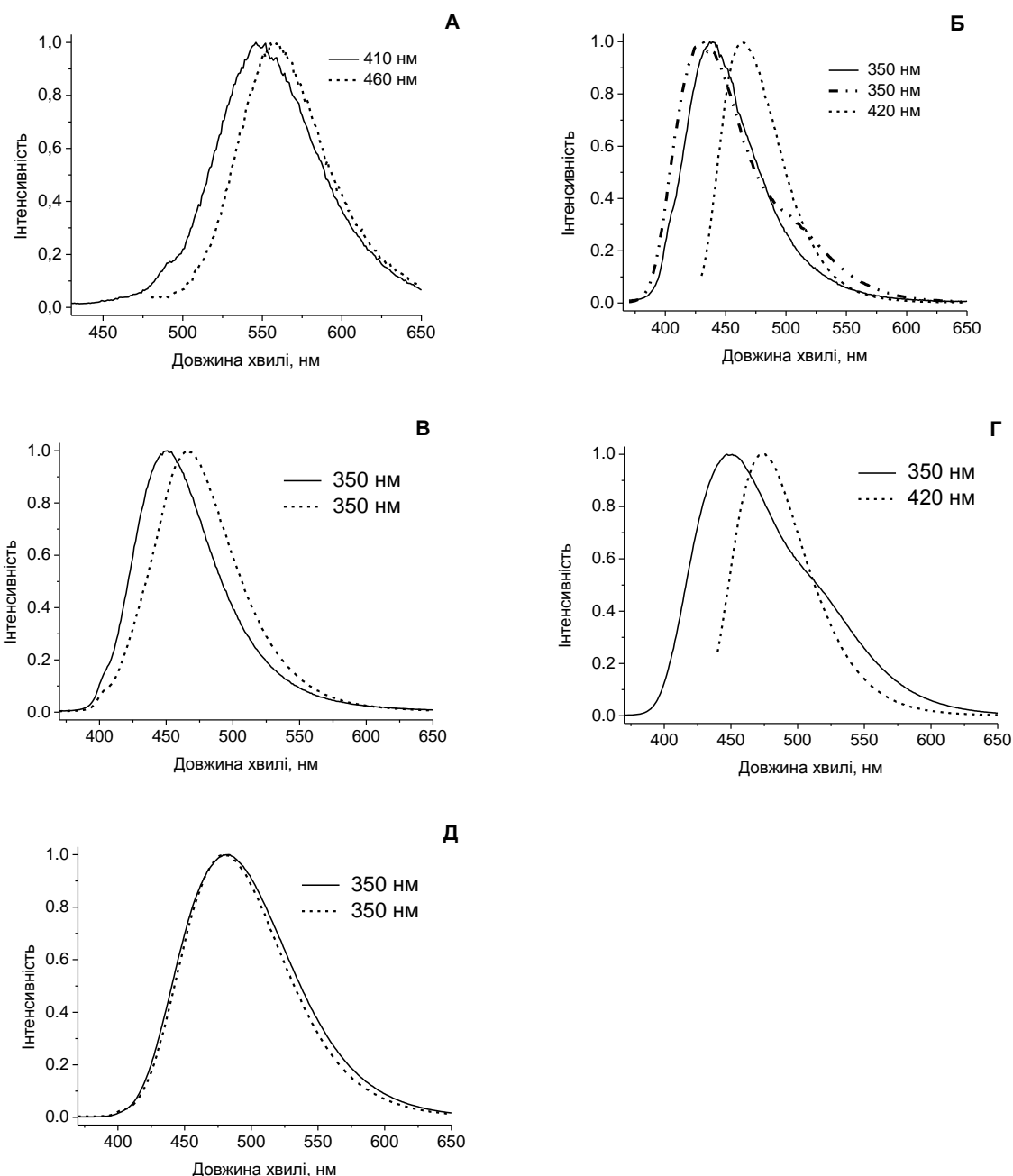


Рис. 7.6. Нормалізовані спектри флуоресценції сполук **1** (А), **2** (Б), **3** (В), **4** (Г) та **5** (Д) за відсутності (суцільна крива) та у присутності 3 мМ АТФ (штрих) у розчині 20 мМ фосфатного буферу рН 7.2, 150 мМ NaCl. Цифра біля лінії вказує на довжину хвилі збудження при отриманні спектру флуоресценції. Концентрації флавонолів: $2,5 \cdot 10^{-6}$ М (**1**), $3,4 \cdot 10^{-6}$ М (**2**), $5,6 \cdot 10^{-6}$ М (**3**), $1,3 \cdot 10^{-5}$ М (**4**), $1,1 \cdot 10^{-5}$ М (**5**).

Найбільш різноманітні і драматичні зміни агрегація з АТФ викликає у спектрах збудження флуоресценції сполук. Усі флавоноли, як і спостерігалось раніше для **1** в роботах [55, 101] демонструють появу нової смуги флуоресценції комплексу АТФ – флавонол, максимум якої зміщений

на 50-70 нм у довгохвильовий бік, до 463 нм для **1** та 420 нм для інших сполук (Рис. 7.7). Проте лише у випадку флавонолів **1** (Рис. 7.7 А) та **2** (Рис. 7.7 Б) ця смуга домінує у спектрі. Три інші сполуки демонструють одночасно дві смуги флуоресценції, одна з яких зміщена у довгохвильову область, а інша має положення, близьке зі спектром вільного флавонолу (сполуки **3-5**). Враховуючи, що спектри поглинання краще (більш кількісно) відтворюють співвідношення форм у популяції незбудженого комплексу (Рис. 7.5) ми вважаємо, що у випадку всіх флавонолів у незбудженому комплексі з АТФ існують обидві форми: аніонна та нейтральна. У спектрах збудження флуоресценції флавонолів **1** та **2** в комплексі з АТФ спостерігається лише аніонна форма [101], оскільки нейтральна форма тут володіє низькою яскравістю флуоресценції. Отже, обидві форми реєструються і в основному стані (за спектрами поглинання та збудження флуоресценції) і в збудженому стані (власне за спектрами флуоресценції). Проте їх співвідношення для різних сполук є різним. Зі спектрів поглинання (Рис. 7.5) за зростанням оптичної густини на довгохвильовому плечі спектру (460 нм для сполуки **1** і 420 нм – для сполук **2-4**) можна зробити припущення, що найбільше аніонної форми в основному стані утворюється у випадку сполук **1** та **2**.

Ми відслідкували динаміку появи довгохвильової смуги у спектрі збудження флавонолів **1-5** при збільшенні концентрації АТФ у розчині (Рис. 7.7 Е). Вона показує, що на відміну від динаміки гіпохромного ефекту (Рис. 7.5 Е) зростання цієї смуги з ростом концентрації АТФ відбувається приблизно однаково для всіх піддослідних сполук – приблизно в одному й тому ж діапазоні концентрацій АТФ (концентрація половинної інтенсивності $I_{1/2} \sim 0.5$ мМ АТФ). Це спостереження може бути доказом того, що саме довгохвильова смуга у спектрі збудження відповідає аніонному комплексу зі стехіометрією флавонол:АТФ 1:1, тоді як процеси, зареєстровані у спектрах поглинання для сполук **2** та **5** як падіння оптичної

густини (Рис. 7.5 Е) відповідають утворенню комплексів флавонол:АТФ 2:1, у яких аніонна форма флавонолу не реєструється.

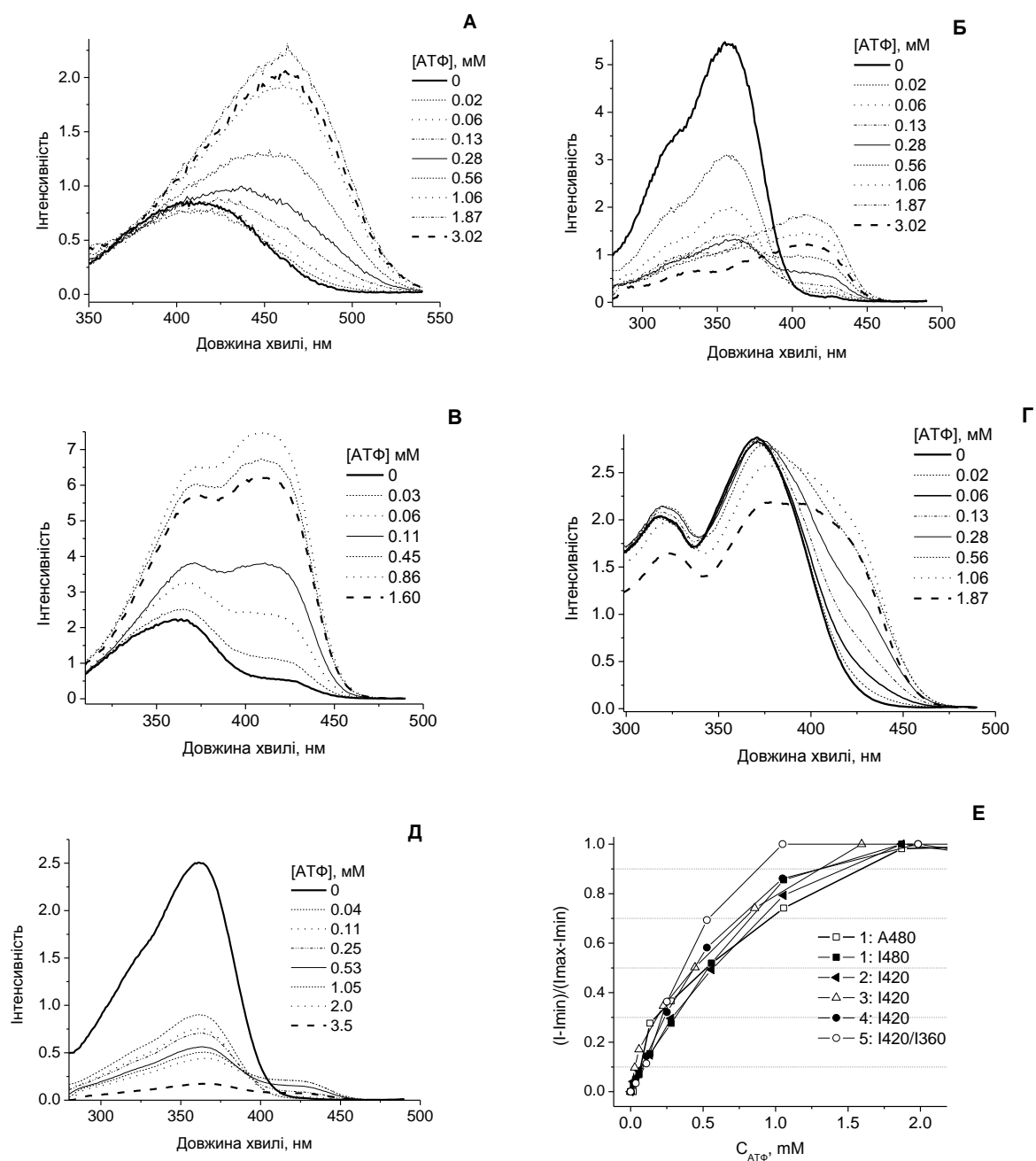


Рис. 7.7. Зміни у спектрах збудження флуоресценції сполук **1** (А), **2** (Б), **3** (В), **4** (Г) та **5** (Д) при збільшенні концентрації АТФ у розчині 20 мМ фосфатного буферу рН 7.2, 150 мМ NaCl та титрометричні криві в координатах частка зростання інтенсивності флуоресценції довгохвильової смуги $(I - I_{\min}) / (I_{\max} - I_{\min})$ від концентрації АТФ (Е). Для порівняння подана крива спадання оптичної густини флавонолу **1** (Рис. 7.5). Концентрації флавонолів: $2,5 \cdot 10^{-6}$ М (**1**), $3,4 \cdot 10^{-6}$ М (**2**), $5,6 \cdot 10^{-6}$ М (**3**), $1,3 \cdot 10^{-5}$ М (**4**), $1,1 \cdot 10^{-5}$ М (**5**). Реєстрація інтенсивності у кожному разі здійснювалась на

довжині хвилі максимуму флуоресценції аніонної форми (штриховані криві на Рис. 7.6).

7.3. Висновки

Отже, корисний сигнал зв'язування зонду **1** з АТФ – довгохвильова компонента спектру збудження комплексу зберігається у широких інтервалах рН (від 5.7 до 9) концентрацій органічного буферу ТРИС (0-440 мМ), сахарози (0-250 мМ) і натрій хлориду (0-180 мМ). Такі дані свідчать про можливість флуориметричного визначення концентрації АТФ у широких межах рН, у присутності високих концентрацій органічних сполук у розчині та при високій іонній силі розчину.

Метоксипохідні флавонолу також утворюють комплекси з АТФ у водному розчині, рН 7.2. Значно менший вплив на міцність комплексів чинить іонна сила водного розчину чи присутність сахарози [101]. Для сполук **2** і **5**, що мають найвищу гідрофобність, утворення комплексів починається на рівні мікромольних концентрацій АТФ і супроводжується різким падінням оптичної густини розчину. Остання ознака може свідчити, що у даному разі комплекси містять подвійну кількість флавонолу (стехіометрія флавонол:АТФ 2:1), тоді як для інших сполук зареєстровано утворення лише комплексів зі стехіометрією флавонол:АТФ 1:1. Утворення вказаних комплексів відбувається за приблизно однакових концентрацій АТФ – близько 0.5 мМ. На нашу думку, відносна орієнтація молекул флавонолу і АТФ у комплексах вказаної стехіометрії відрізняється і залежить від положення метоксильних замісників у флавонолі, оскільки при збудженні флуоресценції у спектрі реєструються 2 форми комплексу – «нейтральна» і «аніонна», а співвідношення цих форм різне для різних флавонолів. Флавоноли **1** та **3** демонструють флуоресценцію лише аніонної форми, тоді як інші сполуки – флуоресценцію обох форм. Отримані результати, при врахуванні рівня концентрації АТФ у клітинах організмів (3-10 мМ) [175-177] дозволяють припустити, що в цитоплазмі і окремих клітинних органелах ендогенні (у рослинах) та екзогенні флавоноли

перебувають у вигляді комплексів з АТФ, за виключенням тієї долі цих сполук, яка специфічно зв'язується з білками [178].

7.4. Експериментальна частина

Гідрат динатрієвої солі аденозин 5'-трифосфату (АТФ), ДМСО, NaCl, HCl, натрій-фосфатний буфер (НФБ, рН 7.2) та трис(гідроксиметил)амінометановий буфер (ТРИС), хімічно чисті, були придбані у Sigma-Aldrich. Флавоноли **1** [179] та **2** [180] було синтезовано згідно до опублікованих методик. Їх чистота була перевірена хроматографічно, а спектри ¹H-ЯМР та температури плавлення відповідали опублікованим даним. Зразки флавонолів **3** - **5** (від Indofine Chemical Co. Inc., Принстон, США) були люб'язно надані професором О.П. Демченком. Спектри поглинання реєстрували на спектрофотометрі Cary 4 (Varian). Спектри флуоресценції реєстрували при 25 °С на спектрофлуориметрі FluoroMax 3.0 (HORIBA Jobin Yvon). Усі наведені спектри є відкорегованими за інтенсивністю джерела світла та чутливістю фотодетектора у шкалі довжин хвиль. Отримані спектри флуоресценції та збудження флуоресценції оброблялися в середовищі програми OriginPro 8. Показник рН розчинів вимірювали з допомогою рН-метру Metrohm 713 у флуориметричній кюветі (1×1 см) двічі: безпосередньо перед записом спектрів збудження флуоресценції та відразу після їх запису.

7.4.1. Дослідження впливу концентрації буфера ТРИС на флуоресценцію флавонолу **1** та його комплексів з АТФ

У флуориметричну кювету додавали 1,5 мл деіонізованої води, аліквоту розчину АТФ (кінцева концентрація: 2,8 мМ), аліквоту буферу ТРИС (рН 7.4, початкова концентрація: 750 мМ) і 10 μл розчину зонду в ДМСО (кінцева концентрація: 2 μМ). Розчин розбавляли водою до об'єму 3 мл, перемішували і протягом 2-3 хв. записували спектри поглинання та збудження флуоресценції. Контрольні досліди проводили у тих же умовах, без додавання АТФ.

7.4.2. Дослідження впливу концентрації NaCl на флуоресценцію флавонолу 1 та його комплексів з АТФ

У флуориметричну кювету додавали 1,5 мл деіонізованої води, аліквоту розчину АТФ (кінцева концентрація: 2,8 мМ), аліквоту буферу ТРИС (рН 7.4, кінцева концентрація: 15 мМ), аліквоту розчину натрію хлориду у 15 мМ буфері ТРИС (початкова концентрація NaCl 2 М) і 10 μ л розчину зонду у ДМСО (кінцева концентрація 2 μ М). Розчин розбавляли водою до об'єму 3 мл, перемішували і протягом 2-3 хв. записували спектри поглинання та збудження флуоресценції. Контрольні досліди проводили у тих же умовах, без додавання АТФ.

7.4.3. Дослідження впливу рівня рН розчину на флуоресценцію флавонолу 1 та його комплексів з АТФ

У флуориметричну кювету додавали 1,5 мл деіонізованої води, аліквоту розчину АТФ (кінцева концентрація: 2,8 мМ), аліквоту буферу ТРИС (рН 7.21, кінцева концентрація: 15 мМ) і 10 μ л розчину зонду у ДМСО (кінцева концентрація: 2 μ М). Розчин розбавляли водою до об'єму 3 мл і додавали кілька порцій 10 М розчину натрію гідроксиду (по 1 μ л кожна, при перемішуванні) до встановлення бажаного рН, рівень якого вимірювали безпосередньо в кюветі. Аналогічно, у другій частині досліду у кюветі до розчину комплексів **1** з АТФ у 15 мМ буфері ТРИС (рН 7.21) додавали 6 М розчин соляної кислоти.

7.4.4. Взаємодія сполук 1 – 5 з АТФ

Титрування з АТФ було виконано поетапно, додаючи у кюветі до 1 мл розчину флавонолу (концентрації вказані у підписах до рисунків) порції 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 та 320 μ л розчину АТФ з концентрацією 14,6 мМ. Вказані розчини мали рН 7.2 і були виготовлені на основі буферу наступного складу: 150 мМ NaCl, 20 мМ НФБ. Спектри були записані при 25 °С протягом 2-3 хв. після кожного додавання[181].

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ДО РОЗДІЛУ 7

163. Butler S. J. Ratiometric Detection of Adenosine Triphosphate (ATP) in Water and Real-Time Monitoring of Apyrase Activity with a Tripodal Zinc Complex. *Chemistry - A European Journal*. **2014**, 20, 48, 15768–74.
164. Kumar A., Prasher P., Singh P. A Fluorescent Probe for Estimation of Adenosine Diphosphate and Monitoring of Glucose Metabolism. *Organic & Biomolecular Chemistry*. **2014**, 12, 19, 3071–79.
165. Ojida A., Takashima I., Kohira T., Nonaka H., Hamachi I. Turn-on Fluorescence Sensing of Nucleoside Polyphosphates Using a Xanthene-Based Zn(II) Complex Chemosensor. *Journal of the American Chemical Society*. **2008**, 130, 36, 12095–101.
166. Kurishita Y., Kohira T., Ojida A., Hamachi I. Rational Design of FRET-Based Ratiometric Chemosensors for in Vitro and in Cell Fluorescence Analyses of Nucleoside Polyphosphates. *Journal of the American Chemical Society*. **2010**, 132, 38, 13290–99.
167. Dobretsov G. E., Syrejschikova T. I., Smolina N. V. On Mechanisms of Fluorescence Quenching by Water. *Biophysics*. **2014**, 59, 2, 183–88.
168. Pivovarenko V. G., Bugera O., Humbert N., Klymchenko A. S., Mély Y. A Toolbox of Chromones and Quinolones for Measuring a Wide Range of ATP Concentrations. *Chemistry - A European Journal*. **2017**, 23, 49, 11927–34.
169. Бугера О. І., Пивоваренко В. Г. Утворення агрегатів метоксифлавонолів з АТФ. *Укр. хім. журн.* **2017**, 83, 121-128.
170. Бугера О.І., Ющенко Д.А., Пивоваренко В.Г. Флуориметрія агрегатів 4'-диметиламінофлавонолу з аденозин-5'-трифосфатом при зміні іонної сили, рН розчину та концентрації органічного буфера. *Український хімічний журнал*. 2018, 84, № 4, 94
171. Poteau X., Saroja G., Spies C., Brown R. G. The Photophysics of Some 3-Hydroxyflavone Derivatives in the Presence of Protons. Alkali Metal and Alkaline Earth Cations. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. **2004**, 162, 2–3, 431–39.

172. Colombini M. P., Andreotti A., Baraldi C., Degano I., Łucejko J. J. Colour Fading in Textiles: A Model Study on the Decomposition of Natural Dyes. *Microchemical Journal*. **2007**, 85, 1, 174–82.
173. Pogodaeva N.N., Medvedeva S.A. The hydrophobic properties of some substituted flavone and flavanone derivatives. *Journal of Physical Chemistry*. **2005**. 79, 751.
174. Hildebrand J. H., Benesi H. A. Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons. *Journal of the American Chemical Society*. **1949**, 71, 8, 2703–7.
175. Trautmann A. Extracellular ATP in the Immune System□: More Than Just a “Danger Signal”. *Science Signaling*. **2009**, 2, 56, 1–4.
176. Imamura H., Nhat K. P. H., Togawa H., Saito K., Iino R., Kato-Yamada Y., Nagai T., Noji H. Visualization of ATP Levels inside Single Living Cells with Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Genetically Encoded Indicators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2009**, 106, 37, 15651–56.
177. Beis I., Newsholme E. A. The Contents of Adenine Nucleotides, Phosphagens and Some Glycolytic Intermediates in Resting Muscles from Vertebrates and Invertebrates. *The Biochemical Journal*. **1975**, 152, 1, 23–32.
178. Andersen Ø.M., Markham K.R. *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. Taylor & Francis Group: Boca Raton, **2006**.
179. Ormson S. M., Brown R. G., Vollmer F., Rettig W. Switching between Charge- and Proton-Transfer Emission in the Excited State of a Substituted 3-Hydroxyflavone. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*. **1994**, 81, 2, 65–72.
180. Webb R.A. Smith M.A., Neumann R.M. A Modification of the Algar-Flynn-Oyamada Preparation of Flavonols. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. **1968**, 5, 425.
181. Пивоваренко В. Г., Бугера О. І. (2017). Патент України 113471 «Спосіб детекції аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах». Державне патентне відомство України.

Висновки

Досліджено серію із тридцяти трьох синтезованих раніше флавонолів, біс-флавонолів, 3-гідроксихромонів та 3-гідроксихінолонів та встановлено, що їх переважну більшість можна використовувати у якості флуоресцентних зондів, що зв'язуються з АТФ і дозволяють визначати його в межах фізіологічних концентрацій, а саме 1 – 50000 мкМ. Вся серія з тридцяти барвників являє собою набір для виявлення АТФ, що дозволяє вибирати зонд з відповідним спектром збудження та емісії, розміром, гідрофобністю або зарядом.

Синтезовано ряд флуоресцентних зондів, що містять один та два хромофори. Окремі монохромофорні сполуки мають аніонну, катіонну та цвіттеріонну природу, а також містять інші замісники, що змінюють орієнтацію компонентів у комплексі, а також афінитет та селективність до АТФ. Біхромофорні сполуки – «молекулярні пінцети», містять довгі (активні та пасивні) і короткі лінкери, які теж змінюють як орієнтацію компонентів у комплексі, так і афінитет та селективність пінцету до АТФ.

Результати флуориметричних досліджень взаємодії флавонолів з нуклеозидфосфатами у водних розчинах за нейтральних значень рН свідчать, що комплексоутворення з нуклеотидами проявляється у наступних спектральних ефектах:

- Зменшення оптичної густини у спектрах поглинання за рахунок стекінгу флавонолу з нуклеїновою основою
- Збільшення інтенсивності флуоресценції внаслідок зменшення концентрації молекул води в оточенні флавонолу та усунення гасіння флуоресценції водою. У випадках флавонолів з електроноакцепторними замісниками цей ефект часто маскується

відомим ефектом гасіння флуоресценції нуклеїною основою за рахунок фотоперенесення електрону на флавонол. Проте при утворення комплексу 1:2 таке гасіння блокується внаслідок компенсації електронноакцепторності флавонолу другою нуклеїною основою.

- Поява нової смуги у спектрах збудження флуоресценції внаслідок потужного електростатичного ефекту фосфатних груп нуклеотиду на хромофор флавонолу.

Внаслідок послідовного утворення кількох комплексів межі визначення АТФ з допомогою 3-гідроксифлавонів є мінімум на порядок більшими ніж у випадку інших відомих зондів і складають 3-4 порядки концентрації АТФ.

Афінитет і селективність 3-гідроксифлавонів до нуклеозид фосфатів можна регулювати шляхом зміни природи замісників та їх положення в молекулі. Найбільший вплив чинять замісники в положенні 4', тоді як замісники в положенні 6 - мало впливають на афінитет. Катіонні та гідроксилвмісні замісники в положенні 4' значно підвищують стабільність комплексів з АТФ. Сполуки, які містять захищену 3-гідроксигрупу проявляють слабкіші ефекти у спектрах флуоресценції та мають нижчий афінитет до нуклеотидів. Отже, 3-ОН група приймає участь у комплексоутворенні та у формуванні спектральної відповіді на комплексоутворення. Флуоресцентна відповідь біхромофорних молекулярних пінцетів при зв'язуванні з АТФ є кращою за параметрами інтенсивності сигналу, відстані між смугами збудження вільного зонду та його комплексу з АТФ та меж детекції АТФ. Указані властивості є суттєвими перевагами молекулярного пінцету у порівнянні з простими монохромофорними конструкціями флуоресцентних зондів.

ДОДАТКИ

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗДОБУВАЧА

Публікації, що відображають основні результати дисертаційного дослідження (4 статті, 2 патенти та 11 тез доповідей):

1. Бугера О. І., Пивоваренко В. Г. Утворення агрегатів метоксифлавонолів з АТФ. Український хімічний журнал. 2017, 83, № 2, 121-128.

2. Пивоваренко В. Г., Бугера О. І. (2016). Патент України 113132 «Застосування 2-арил-3-гідроксихінолін-4-онів як флуоресцентних зондів для визначення аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах». Державне патентне відомство України.

3. Пивоваренко В. Г., Бугера О. І. (2017). Патент України 113471 «Спосіб детекції аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах». Державне патентне відомство України.

4. Pivovarenko V. G., Bugera O., Humbert N., Klymchenko A. S., Mély Y.. A Toolbox of Chromones and Quinolones for Measuring a Wide Range of ATP Concentrations. Chemistry – A European Journal. 2017, 23, 11927.

5. Бугера О. І., Нетребчук А. П., Пивоваренко В. Г. Дизайн та синтез молекулярного пінцету для детекції АТФ на основі 3-гідроксифлавонолу. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка (ISSN 1728-3817). 2017, 2, №54, 67.

6. Бугера О.І., Ющенко Д.А., Пивоваренко В.Г. Флуориметрія агрегатів 4'-диметиламінофлавонолу з аденозин-5'-трифосфатом при зміні іонної сили, рН розчину та концентрації органічного буфера. Український хімічний журнал. 2018, 84, № 4, 94.

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЇ ЗДОБУВАЧА

(11 тез конференцій):

1. Бугера О. І., Линник Р. П., Запорожець О. А., Пивоваренко В. Г. Strong anti-Vavilov effect in the fluorescence excitation spectra of flavonol-adenosine 5'-triphosphate complexes. Київська конференція з аналітичної хімії: Сучасні тенденції. Київ, 2017, 139. (Очна, усна доповідь).
2. Бугера О. І., Пивоваренко В. Г. Електрофлуорохромія катіонних та цвіттеріонних флавонолів при агрегації з аденозин-5'-трифосфатом у водному буфері. Сучасні проблеми хімії: 18-та Міжнародна конференція студентів та аспірантів. Київ, 2017, 86. (Очна, усна доповідь).
3. Кримченко Р. Є., Бугера О. І., Линник Р. П., Запорожець О. А., Пивоваренко В. Г. Молекулярний пінцет для флуоресцентної детекції АТФ у розчинах на основі флавонолу. Об'єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень: 4-та Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених. Київ, 2017, 121-123. (Очна, усна доповідь).
4. Нетребчук А.П., Бугера О. І., Пивоваренко В. Г. Молекулярні пінцети для детекції АТФ на основі 3-гідроксифлавононів. Об'єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень: 4-та Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених. Київ, 2017, 133-136. (Очна, усна доповідь).
5. Кримченко Р. Є., Бугера О. І., Пивоваренко В. Г. Синтез молекулярного пінцету на основі 4'-[(гідроксикарбонілметил)метиламіно]флавонолу для детекції аденозинтрифосфату. Сучасні проблеми хімії: 18-та Міжнародна конференція студентів та аспірантів. Київ, 2017, 96. (Очна, усна доповідь).

6. Федик А. В., Бугера О. І., Рябухін С.В., Пивоваренко В.Г. Дизайн і синтез молекулярного пінцету на основі 4'-дигідроксиетиламінофлавонолу для детекції аденозинтрифосфату. Сучасні проблеми хімії: 17-та Міжнародна конференція студентів та аспірантів. Київ, 2016, 62. (Очна, усна доповідь).
7. Бугера О. І., Пивоваренко В.Г. Модифіковані в позиції 4' амінофлавоноли – флуоресцентні сенсори АТФ. Сучасні проблеми хімії: 17-та Міжнародна конференція студентів та аспірантів. Київ, 2016, 45. (Очна, усна доповідь).
8. Бугера О. І., Пивоваренко В.Г. Нові флуоресцентні сенсори АТФ на основі модифікованих за позицією 4' флавонолів. 24-та Українська конференція з органічної хімії. Полтава, 2016, 71. (Очна, усна доповідь).
9. Бугера О. І., Пивоваренко В.Г. Вплив структури хромонових та хінолонових похідних на їх параметри флуоресценції при зв'язуванні аденозинтрифосфату. Сучасні проблеми хімії: 16-та Міжнародна конференція студентів та аспірантів. Київ, 2015, 35. (Очна, усна доповідь).
10. Pivovarenko V. G., Bugera O., Klymchenko A. S., Mély Y. Fluorescence Ratiometric response of Chromone and Quinolone Derivatives upon Binding with Adenosine-5'-Triphosphate. The 14th Conference on Methods and Applications in Fluorescence. Würzburg, Germany, 2015, 113. (Заочна).
11. Bugera O., Pivovarenko V. G., Klymchenko A. S., Mély Y. Structure-fluorescence relationship in a series of chromone and quinolone derivatives upon their binding with adenosine-5'-trophosphate. 8th International Chem. Conf. Toulouse-Kiev. Toulouse, France, 2015, 119. (Очна, стендова доповідь).