

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри супрамолекулярної хімії

д.х.н. Рябухін Сергій Вікторович

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 2023 р.

**МОНІТОРИНГ НЕНАСИЧЕНИХ РЕАКТИВНИХ КАРБОНІЛЬНИХ
СПЛУК У ЕУКАРІОТИЧНИХ КЛІТИНАХ ЗА УМОВ ОКИСНОГО
СТРЕСУ**

Випускна кваліфікаційна робота магістра
студента спеціальності 10.102 Хімія
ОП Високі технології (Хімія та наноматеріали)
Голованя Дениса Романовича

Науковий керівник від кафедри
доцент кафедри супрамолекулярної хімії
к.х.н. Булавко Геннадій Володимирович

Робота виконана на хімічному факультеті
Університету Макгілл, Монреаль, Канада
під керівництвом **Гонзало Коси, PhD**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

АНОТАЦІЯ

Перокисне окиснення мембран – процес, що відіграє ключову роль у апоптозі та інших типах клітинної загибелі. Цей процес привертає все більше уваги як ключовий стан при хворобах Альцгеймера, Паркінсона, ракових захворюваннях тощо. Дана робота присвячена розробці методу моніторингу важливого класу метаболітів - α,β -ненасичених карбонільних сполук, флуоресцентні методи дослідження для яких суттєво обмежені. У даній роботі було запропоновано селективний флуоресцентний зонд, вдосконалено метод його синтезу, запропоновано механізм для пояснення роботи, а також перевірено можливість його застосування за умов як у спрощеній ліпосомній моделі, так і для прижиттєвого моніторингу клітин. Показано залежність між флуоресцентною відповіддю репортеру та рівнем перекисного окиснення мембран, що може свідчити про накопичення ненасичених продуктів окиснення ліпідів за цих умов.

Ключові слова: флуоресцентний репортер, перекисне окислення ліпідів, реактивні карбонільні сполуки, флуоресцентна мікроскопія, отримання ліпосом, теорія функціоналу густини, окисний стрес, перекисне окислення мембран, рівень накопиченого окиснення мембран

ANNOTATION

Lipid peroxidation (LP) is a key metabolic process that, once initiated, can lead to cell death through apoptosis or nonapoptotic pathways. This process was shown to be a crucial element in the development of disease or pathological conditions, including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and different types of cancer. In this study, we proposed improved synthesis and application of the fluorescent reporter BODIPY-Ph-SH. The PeT mechanism of the "Off-On" switch was proposed with the support of DFT calculations. The possibility of unsaturated reactive carbonyl species (UROS), important metabolites of LP, monitoring was shown for simplified liposome media as well as for in vivo cell imaging. A correlation between the fluorescence response of the reporter and the level of lipid peroxidation through UROS production was shown for HT1080 cells under oxidative stress conditions.

Key words: fluorescent reporter, lipid peroxidation, reactive carbonyl species, fluorescent microscopy, liposome preparation, DFT calculations, oxidative stress, membrane damage, accumulated membrane oxidation

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень	6
Вступ	8
Розділ 1. Огляд літератури	10
1.1. Peroкисне окиснення мембран та його роль у розвитку патологічних станів клітин та тканин	10
1.2. Сучасні методи визначення РКС у клітинах	12
1.3. Підходи до вивчення флуоресцентних властивостей систем донор-акцептор із застосуванням ТФГ-обчислень	15
1.3.1. Обчислювальні методи	17
1.3.2. Кореляційно-обмінна функція	18
1.3.3. Базисний набір функцій.....	20
1.3.4. Моделі для опису впливу розчинника	22
1.3.5. Обчислення за моделлю газової фази	23
1.3.6. Модель неявної сольвації.....	24
Розділ 2. Теоретична частина та обговорення результатів	25
2.1. Обґрунтування вибору сполуки BODIPY-Ph--SH	25
2.2. Передбачення механізму флуоресцентної відповіді репортеру	27
Розділ 3. Експериментальна частина	31
3.1. Синтез	31
3.1.1 Матеріали та методи	31
3.1.2. Використані синтетичні методики	31

3.2. Вивчення можливості застосування обраного зонду для моніторингу РКС у спрощеній ліпосомній моделі	34
3.2.1. Флуоресцентні властивості BODIPY-Ph-S.....	34
3.2.2. Експерименти з допованими ліпосомами	34
3.2.3. Підготовка ліпосом	34
3.2.4. Підготовка розчину ліпосом, що складаються тільки з DOPC-фосфоліпідами.....	34
3.2.5. DOPC-ліпосоми, доповані 2-транс-деценалем.....	35
3.2.6. Отримання спектру випромінювання сполуки BODIPY-Ph-SH і ліпосомній моделі	36
3.2.7. Спостереження.....	38
3.3. Вивчення можливості використання обраного зонду для моніторингу ПОМ на прикладі клітин HT1080	38
3.3.1. Культура клітин	38
3.3.2. Проведення мікроскопіювання.....	39
3.3.3. Аналіз зображень.....	41
Висновки	43
Список використаних джерел.....	44
Додатки.....	49

Перелік умовних позначень

ПОЛ - перекисне окислення ліпідів

ПОМ - перекисне окислення мембран

РКС - реакційноздатні карбонільні сполуки

АФК - активні форми кисню

ДНК - дезоксирибонуклеїнова кислота

РНК - рибонуклеїнова кислота

ТФГ (eng. DFT) - теорія функціоналу густини

ТХФ (eng. HF) - теорія Хартрі-Фока

НЛЩ - наближення локальної щільності

ЛСЩ (eng. LDA) - локальна спінова щільність

УГА (eng. GGA) - узагальнена градієнтна апроксимація

мета-УГН (eng. meta-GGA) - мета-узагальнений градієнт наближення

ОСТ (eng. STO) - орбіталі слейтерського типу

ОГС (eng. GTO) - орбіталі гаусового типу

МПК - модель поляризованого континууму

ФПЕ (eng. PeT) - фотоіндукованого переносу електронів

ЛВ (eng. LR) - лінійний відгук

СС (eng. SS) - специфічний стан

ЧС-ТФГ - часозалежна теорія функціоналу густини

BODIPY-Ph-SH - 4-(5,5-дифлуоро-1,3,7,9-тетраметил-5Н-4І4,5І4-дипіроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,2]діазоборин-10-іл)бензотіол

ВЗМО (eng. HOMO) - вища зайнята молекулярна орбіталь

НЗМО (eng. LUMO) - найнижча вакантна молекулярна орбіталь

МО – молекулярна орбіталь

ЗЗ, (eng. CT) - зсув заряду

еВ – електронвольт

ТФК (eng. TFA) - трифлуороцтова кислота

ТШХ – тонкошарова хроматографія

ДМФА - диметилформаїд

Вступ

Перекисне окислення ліпідів можна описати як процес, за якого окисники, наприклад, вільні радикали або нерадикальні сполуки, атакують ліпіди, що містять вуглець-вуглецеві подвійні зв'язки, у тому числі поліненасичені жирні кислоти або їх залишки, включені в функціональні молекули ліпідів. Цей процес складається з відриву водню від атома вуглецю та приєднання кисню, що призводить до появи ліпідних пероксильних радикалів і гідропероксидів [1]. Порухений ліпідний обмін, зокрема перекисне окислення ліпідів (ПОЛ), ймовірно, пов'язаний з розвитком багатьох патологічних станів, включаючи хворобу Альцгеймера, хворобу Паркінсона та бічний аміотрофічний склероз, за перебігу яких було встановлено підвищені рівні продуктів перекисного окиснення мембран (ПОМ) і білків, модифікованих ПОМ [2]. Крім того, порушення нормального функціонування антиоксидантів відіграє вирішальну роль у розвитку патологічних станів клітин і тканин, а також призводить до загибелі клітин через шляхи загибелі клітин, такі як апоптоз, фероптоз або некроз [3]. Відомо, що активні форми кисню накопичуються як побічні продукти ПОМ в мембранах живих клітин [4].

Таким чином, докладаються значні зусилля для розробки методів, які дозволять моніторити реакційнодатні карбонільні сполуки (РКС) за допомогою флуоресцентних репортерів молекул. Розроблені зонди в основному зосереджені на візуалізації жорстких електрофільних частинок, наприклад, формальдегіду, фосгену, NO, CO, метилгліоксалу тощо. Ці методи дозволяють здійснювати прямий моніторинг генерації та накопичення цих активних форм кисню (АФК) у біологічному середовищі через флуоресцентну відповідь. Завдяки розробці так званих флуоресцентних зондів «Off-On Switch» стало можливим локалізувати поодинокі молекулярну взаємодію в просторі та часі та контролювати її, що дає безпрецедентні можливості для дослідження біологічних систем [5]. Хоча

застосування флуоресцентних молекул останнього покоління в локалізаційній мікроскопії однієї молекули привернуло велику увагу наукового співтовариства в останні роки через його багатообіцяючі результати [6], розробка флуоресцентних репортерів для величезної серії так званих м'яких АФК, пов'язаних з ПОЛ у клітинах за різних умов, залишається недостатньо дослідженою – нам відомий лише малий обсяг існуючих репортерів [7].

Відповідно, була встановлена **мета** цієї роботи – розробити флуоресцентний зонд, який буде націлений на м'які електрофіли, і дослідити можливість його використання для моніторингу електрофільних реактивних карбонільних сполук, які можуть накопичуватися в клітинах в умовах окисного стресу.

Розділ 1. Огляд літератури

1.1. Перокисне окиснення мембран та його роль у хворобах

Ліпіди, зокрема фосфоліпіди, які містять ненасичені залишки поліненасичених жирних кислот, є частими мішенями шкідливої та потенційно летальної дії перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). У відповідь на ПОМ і згідно з конкретним метаболічним станом і здатності до самовідновлення, клітини можуть сприяти виживанню клітин або індукувати клітинну смерть. За фізіологічної або низької швидкості ПОЛ (субтоксичні умови) клітини підтримують свою життєдіяльність за допомогою систем конститутивного антиоксидантного захисту або активації сигнальних шляхів, які активізують антиоксидантні білки, що призводить до адаптивної реакції на стрес. Проте, за середньої або високої швидкості ПОЛ (токсичні умови) ступінь окисного пошкодження перевищує здатність до відновлення, і клітини індукують апоптоз або некроз, запрограмовану клітинну смерть; обидва процеси зрештою призводять до молекулярного пошкодження клітин, що може сприяти розвитку різних патологічних станів і прискореному старінню [1,4, 8].

Загальний процес ПОЛ складається з трьох основних етапів: ініціації, росту ланцюга та завершення. На етапі ініціації перекисного окиснення ліпідів прооксиданти, такі як гідроксильні радикали, поглинають алільний водень, утворюючи вуглецецентрований ліпідний радикал ($L\cdot$). У фазі росту ланцюга ліпідний радикал ($L\cdot$) швидко реагує з киснем, утворюючи пероксирадикал ліпідів ($LOO\cdot$), який відриває водень від іншої молекули ліпідів, утворюючи новий $L\cdot$ (що продовжує ланцюгову реакцію) і гідропероксид ліпідів ($LOOH$). У реакції припинення дії антиоксиданти, наприклад, вітамін Е, віддають атом водню $LOO\cdot$ і утворюють відповідний радикал вітаміну Е, який реагує з іншим $LOO\cdot$, утворюючи нерадикальні продукти.

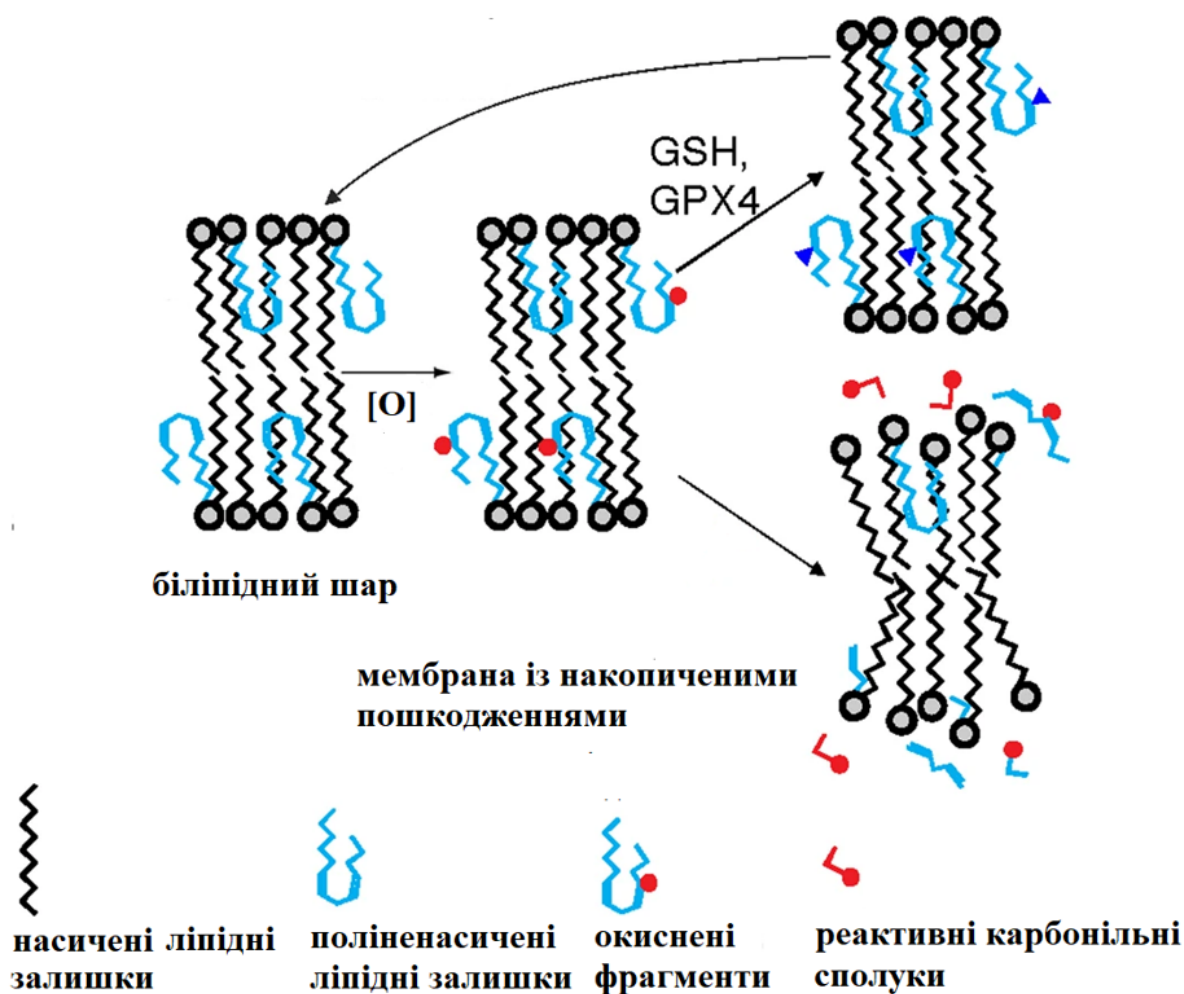


Рис. 1.1 - Схематичне зображення процесу ПОМ [9].

Після початку ПОЛ спостерігатиметься каскад ланцюгових реакцій, доки не будуть утворені продукти термінації [10]. Схематичне зображення цього процесу наведено на **рисунку 1.1**.

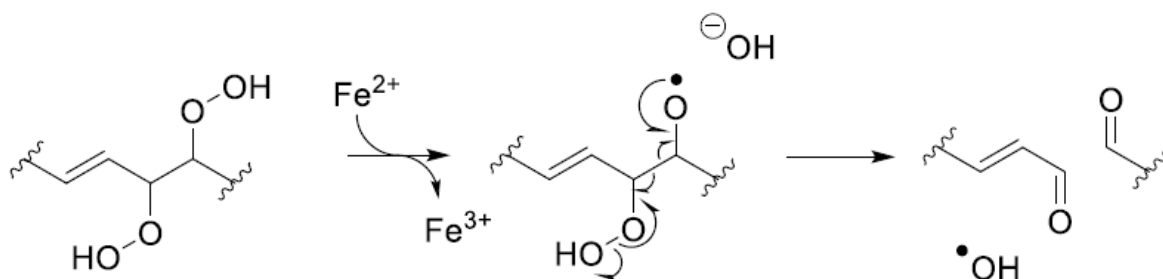


Рис. 1.2 - Загальний механізм радикального окислення ліпідів, який може призводити до α , β -ненасичених альдегідів.

1.2. Сучасні методи визначення РКС у клітинах

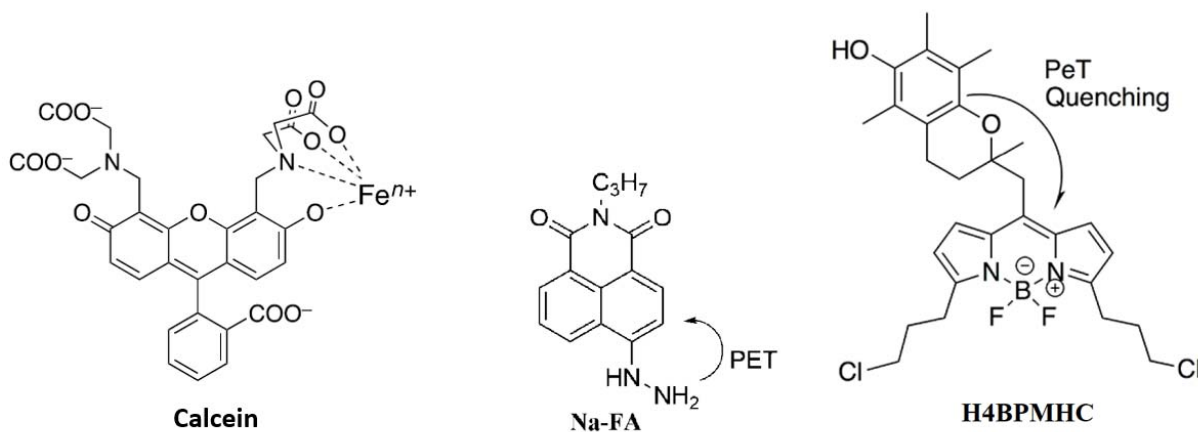


Рис 1.3 - Приклади успішно застосованих флуоресцентних зондів [11,12, 13].

Процес ПОЛ викликає утворення різноманітних високоактивних органічних молекул на аномальному рівні. Активні види вуглецю або РКС – основна група сполук, що утворюються в цьому процесі.

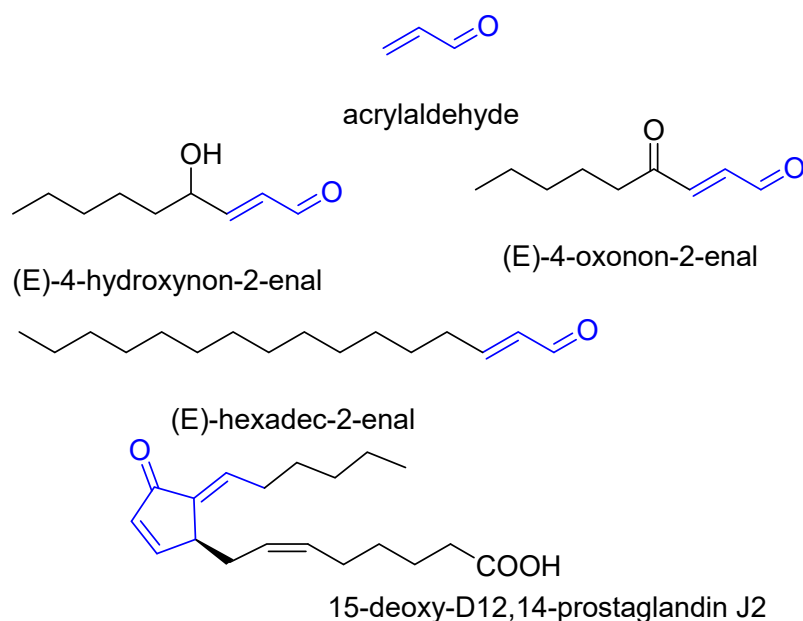


Рис. 1.4 - Деякі з найпоширеніших ненасичених РКС, що утворюються в умовах окисного стресу.

PKC відіграють значну роль у фізіології людини. Однак спонтанна взаємодія цих реактивних молекул з функціональними біомолекулами, включаючи дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК), рибонуклеїнова кислота (РНК) і білки, може призвести до шкідливих наслідків і розвитку захворювань в організмі людини. Раніше аналіз зразків в основному залежав від складних аналітичних інструментів: високоефективної рідинної або газової хроматографії, мас-спектрометрії, колориметричних аналізів, раманівської спектроскопії тощо. Проте, в останні десятиліття використовується та вдосконалюється інший підхід до дослідження клітинних механізмів – використання флуоресцентних хімічних датчиків/зондів. Флуоресцентна спектроскопія дозволяє проводити аналізи в реальному часі з живими клітинами, до того ж є високочутливим та потужним підходом. За допомогою локалізаційної мікроскопії однієї молекули ми можемо візуалізувати окремі процеси у самій клітині, що є унікальною рисою даного методу. Як наслідок, метод флуоресценції вважається потужним інструментом для моніторингу живих зразків завдяки його неінвазивності, доступності, чутливості, економічній ефективності та безпрецедентній роздільній здатності [14].

Існує багато захворювань, викликаних аномальним вмістом PKC в організмі людини. Таким чином, дослідження патології та діагностики захворювань можна проводити шляхом виявлення змін рівнів PKC. Хоча існує близько 30 типів PKC, їхні дослідження в основному зосереджені на монооксиді вуглецю, фосгені, NO, CO, HClO, метилглюксалі та формальдегіді [15], [16]. Остання, яка є високореакційною та стерично неутрудненою карбонільною сполукою, привертає найбільшу увагу завдяки десяткам флуоресцентних зондів, розроблених як «вмикаючих», так і ратіометричних [17].

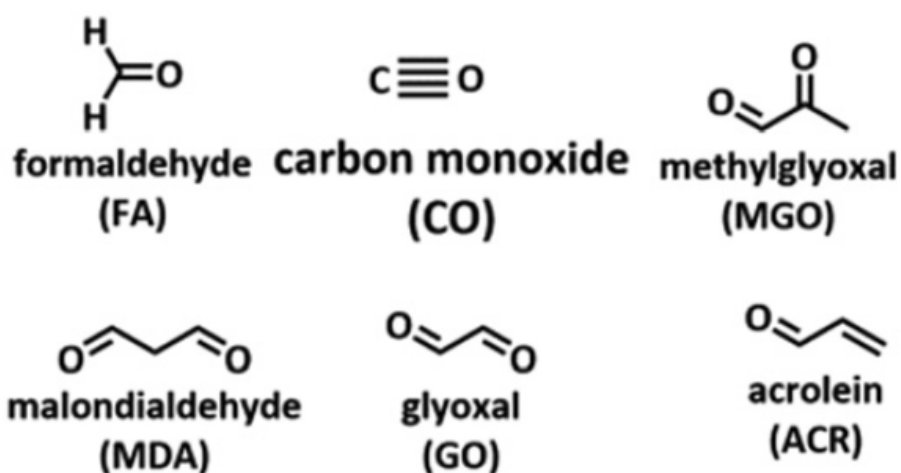


Рис 1.5 - Основні РКС, для яких були продемонстровані флуоресцентні репортери [7].

Особливу увагу в останні роки привернула проблема розробки флуоресцентних зондів для м'яких електрофілів. Наприклад, К. Jiang та ін. нещодавно повідомили про синтез зонда mPr-Acr [18], [19]. Дана молекула складається з нафталімідної флуорофорної частини та тіогрупи, що дозволяє здійснювати реакцію Міхаеля (приєднання до α,β -ненасичених альдегідів). Було показано специфічність до акролеїну та його гомологів [20].

Важливим підходом до створення хемоселективних сенсорів для внутрішньоклітинних АФК є конденсація гідрозину з альдегідами [21], [22]. На основі цієї реакції як ключового «вмикання» флуоресцентного перемикача повідомлялося про зонди Na-Fa, а також оцінку аддуктів, утворених після конденсації [23], [24].

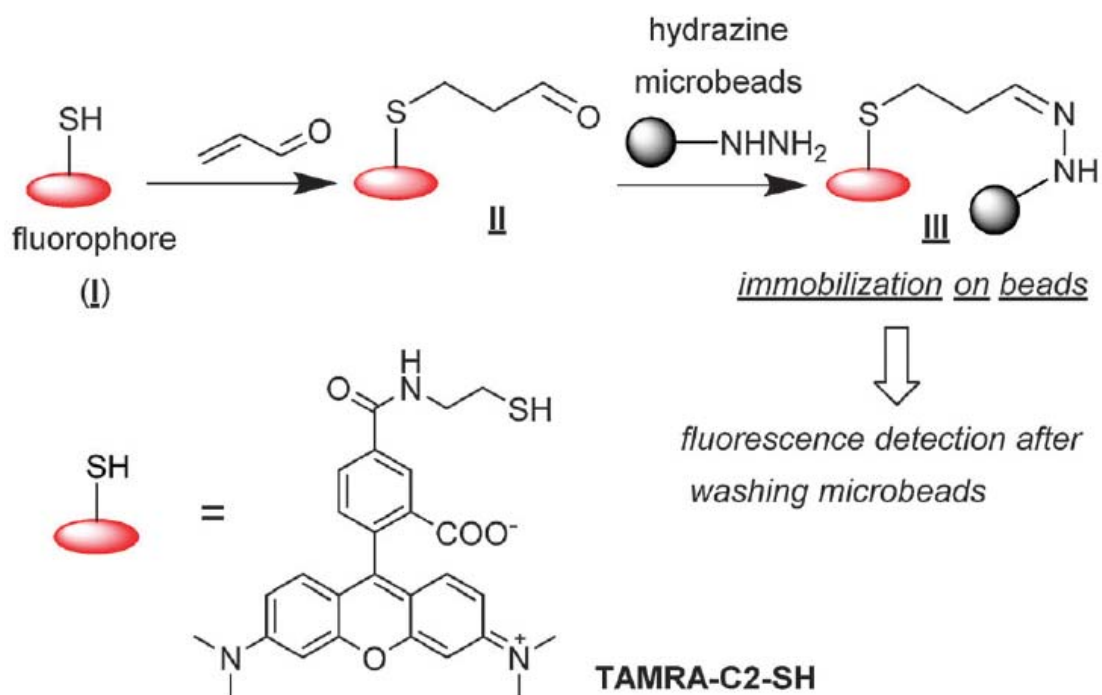


Рис 1.6 - Запропонована методика флуоресцентного визначення акролеїну [25].

Важливим є приклад флуоресцентного визначення ненасичених альдегідів шляхом їх іммобілізації на твердому носії (**Рис. 6**). До недоліків даного методу можна віднести неможливість його безпосереднього використання для прижиттєвих досліджень.

1.3. Підходи до вивчення флуоресцентних властивостей систем донор-акцептор та застосування ТФГ-обчислень

Явище люмінесценції було помічене людством здавна, та активно вивчалось вченими, щонайменше, із початку XIX ст. На сьогодні явища поглинання матерією світла його випромінення із зміненою енергією лежить в основі численних розробок у найсучасніших галузях науки та техніки. Зокрема, для природничих наук, особливу роль у методах досліджень займає флуоресцентна мікроскопія. Розробка флуоресцентних молекул-репортерів є важливим

завданням, адже специфічні взаємодії є ключовими для успішного застосування у вивченні молекулярних механізмів хімічних перетворень, метаболічних шляхів захворювань, властивостей новітніх матеріалів тощо [14].

Розгляд основних аспектів комп'ютерного передбачення спектрів флуоресценції є важливим завданням для раціонального підходу до створення новітніх флуоресцентних зондів.

На **Рис. 1.7** зображено діаграму Яблонського, що спрощено ілюструє фізичний процес переходу електрона під час флуоресцентної події.

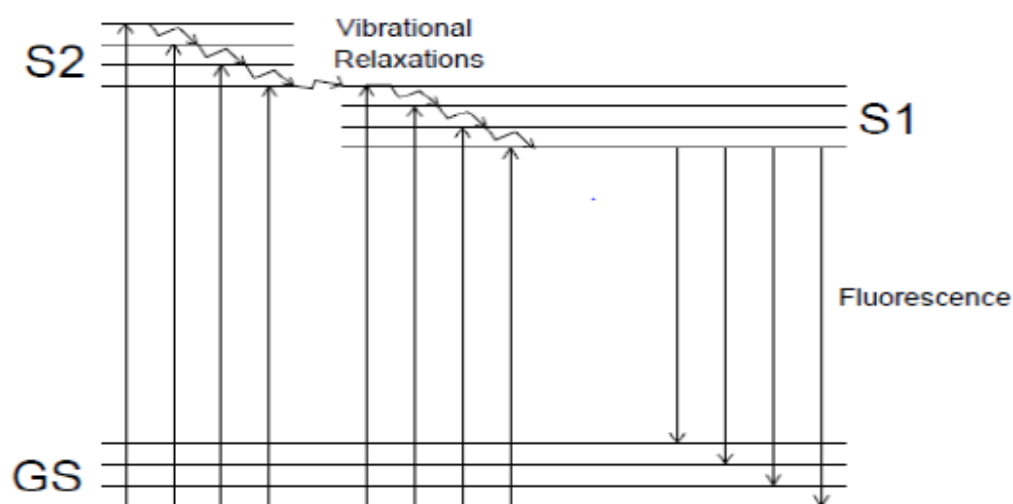


Рис. 1.7 - Діаграма Яблонського, що демонструє процес флуоресценції, де GS — основний стан, S1 і S2 — синглетно збуджені стани [14].

У випадку органічного флуорофору електрон спочатку збуджується енергією поглинутого кванту світла. Збуджений електрон може перейти у будь-який із синглетно-збуджених станів, позначених S1 і S2. Якщо електрон збуджується до стану, вищого за S1, він перейде зі збудження до стану S1 за пікосекунди через безвипромінювальне внутрішнє перетворення. Якщо електрон має надлишкову вібраційну енергію (тобто не перебуває в тепловій рівновазі з навколишнім середовищем), електрон зазнає безвипромінювальної релаксації до найнижчого стану S1. Електрон у найнижчому стані S1 зазнає миттєвого

переходу, до одного з GS рівнів, що викликає випромінювання енергії переходу (флуоресценцію), це відбувається за кілька наносекунд. На **рисунку 1.7** також показано, що стрілки вгору, що позначають поглинання, є більшими або дорівнюють стрілкам вниз, які позначають флуоресценцію, що відповідає меншій кількості енергії, втраченої під час випромінювання, ніж отриманої енергії, поглиненої під час збудження, що призводить до червоного зсуву фотонного світла (Стоксового зсуву) [14].

1.3.1. Обчислювальні методи

Флуоресценцію можна розрахувати шляхом наближення рішення хвильового рівняння до залежного від часу **Формула 1.1** [14].

$$\hat{H}(\{r\}, t)\Psi(\{r\}, t) = E(\{r\}, t)\Psi(\{r\}, t)$$

Формула 1.1 - Рівняння Шредінгера

Де H - це гамільтоніан, Ψ — хвильова функція електрона, а E — енергія системи. Рівняння Шредінгера можна точно розв'язати для однієї системи тіла (наприклад, атом водню); однак рівняння Шредінгера для декількох тіл не має точного рішення. Теорія функціоналу густини (ТФГ, *eng.* DFT) була розроблена для вирішення рівняння Шредінгера за допомогою базисного набору та енергетичного функціоналу, що використовуються для опису електронної густини як наближення хвильової функції [26,27].

Базисні набори — це сукупність функцій (наприклад, функцій Гауса), які використовуються для наближення атомних орбіталей, які містять електрони даної системи. Енергетичні функціонали електронів апроксимовані енергію електронного обміну та кореляцією електронів для всіх електронів у системі.

Хвильова функція описує всі просторові властивості, такі як імпульс, кінетична енергія, потенціальна енергія тощо електрона щодо його положення.

Разом базисні набори та функціонали можуть надати приблизну електронну густину молекули, а отже, надати приблизне рішення рівняння Шредінгера.

1.3.2. Корреляційно-обмінна функція

Функціонал енергії є математичним описом повної енергії системи. Для багато-частинної системи необхідне наближення для вкладу обміну електронами та кореляції компонент енергетичного функціоналу. Результати, отримані від різних функціоналів значною мірою залежать від розміру та геометрії молекул, що моделюються. Так само різні функціонали забезпечують різні методи розрахунку обміну та кореляції енергії електронів. Наприклад, теорія Хартрі-Фока (ТХФ, *eng.* HF) використовує просте рішення для рівняння Шредінгера атома водню і примножує додаткову одноелектронну хвилю функції для отримання повної хвильової функції, [14,27] таким чином точно моделюючи обмін електронами і опускаючи енергетичні внески кореляційної енергії електронів.

У той час як ТХФ використовує підхід вирішення задачі багатьох електронів безпосередньо вирішуючи за допомогою хвильової функції, натомість теорія функціоналу густини використовує густину електронів як наближення хвильової функції. Основний метод наближення – це обмінно-кореляційний потенціал, відомий як наближення локальної щільності (НЛЩ). Цей метод використовувався Хоенбургом і Коном [28] для моделювання системи повільної змінної щільності. НЛЩ використовує обмін кореляційної енергії однорідного електронного газу однакової густини, що дозволяє змоделювати будь-яку систему. Енергію справжньої щільності можна наближено визначити енергіями, так званих, локальних щільностей.

Подібний підхід застосовується до наближення локальної спінової щільності (ЛСЩ, *eng.* LDA), яке відокремлює густини, пов'язані зі спіном вгору

та зі спіном вниз, замість того, щоб мати справу з ними обома одночасно. ЛСЩ не має аналітичної форми для кореляційної енергії, а має форму апроксимації Монте-Карло [28]. Обидва ці методи не можуть бути застосовані, якщо відбувається різка зміна електронної густини (тобто, не виконується принцип Франка-Кондона для даної системи).

Узагальнена градієнтна апроксимація (УГА, eng. GGA) і мета-узагальнений градієнт наближення (мета-УГН, eng. meta-GGA) включають більш складний метод для розробки обмінних та кореляційних вкладів енергій. Така апроксимація мета-УГН дає ще більш точний результат, ніж узагальнений градієнт.

УГА відбувається шляхом включення лапласіана електронної густини, а не лише градієнта. Гібридні функціонали були запропоновані для поєднання компонентів ТФГ і ТХФ. Таким чином, переваги кожного методу можна об'єднати, щоб сформувавши гнучкий метод наближення обмінно-кореляційний функціоналів [26,28]. Наприклад, обчислення для обмінної енергії можуть включати певну частку ЛСЩ та УГА, а компоненти обміну може включати повністю чи частково обміни обчислені за допомогою ЛСЩ, УГА та ТХФ.

Тут ми зосередимося на використанні функціоналів B3LYP, M06-2X, CAM-B3LYP і wB97XD.

B3LYP — це гібридний функціонал, розроблений Акселем Д. Беке, який поєднує обчислення за методами ТХФ і ЛСЩ.

Функціонал M06-2X класифікується як гібридний метаобмінно-кореляційний функціонал, який використовує довгострокові корекції шляхом подвоєння нелокального обміну для більших діапазонів, але не використовує ЛСЩ [28].

SAM-B3LYP — це гібридний функціонал, який поєднує в собі якості B3LYP, додаючи дальню дію корекції шляхом перемикавання суміші 19% ТХФ обміну на короткій відстані до 65% ТХФ для дальньої дії [27].

B97X-D є гібридним функціоналом, який використовує емпіричні поправки дисперсії та функція демпфування для корекції взаємодій електронів на великій відстані. Ці функціонали були вибрано для оцінки ряду методів розрахунку електронних збуджень. B3LYP є одним із найпопулярніші функціоналів, що використовується у якості основного для обчислень геометрії основних за збуджених станів низькомолекулярних флуорофірів без важких атомів та суттєвих дисперсійних ефектів. Якщо ж молекула зазнає зміни електронної густини від збудження або випромінювання, молекула може поляризуватися, і дисперсійні сили можуть почати впливати на молекулу. Тоді застосовують рівні M06-2X, SAM-B3LYP і B97XD, що включають певну форму поправок на дисперсійні сили.

1.3.3. Базисний набір функцій

Базисний набір — це набір функцій, які використовуються для побудови атомних орбіталей. Електронна густина молекули залежить від атомних орбіталей, визначених базисним набором. Отже, визначення атомних орбіталей необхідне для визначення енергії в системі.

Таким чином, розрахунок енергії системи може бути специфічним для кожної унікальної молекули системи, що моделюється, оскільки електронна густина унікальна для кожної молекулярної структури. У 1930 році Д. С. Слейтер опублікував статтю [29], у якій визначив ефективний заряд, який відчуває електрон в атомі орбітальний. Використовуючи цю інформацію, Слейтер розробив метод визначення щільності електрони в своїх оболонках при різних радіусах. Використовуючи лінійну комбінацію атомних орбіталей, тоді можна описати енергію молекулярної орбіталі. Таке формування базового набору

називається орбіталі слейтерського типу (ОСТ, eng. STO). OST є базовими функціями, які мають пряму фізичну інтерпретацію орбіти атома водню, але громіздкі для розрахунку у великих моделях. Натомість наближення до OST можна зробити за допомогою лінійної комбінації орбіталей гаусового типу (ОГС, eng. GTO). Хоча ОГС добре описує атомні орбіталі, цей підхід не дозволяє враховувати вплив розширення/стиснення орбіталей, що знаходяться поблизу інших атомів у молекулі. Щоб допомогти усунути цей недолік, додаткові функції додаються для опису кожного «проблемного» атома. Крім того, внески кожного з цих додаткових функцій можна зважити певним чином для кращого наближення хвильової функції. Базисні набори називають подвійними дзетами (у валентній електронній структурі), коли вони містять вдвічі більше базисних функцій, ніж мінімальний базисний набір. Базові набори називаються триплететами (у валентній електронній структурі), коли вони містять утричі більше базисних функцій, ніж мінімальний базисний набір. Як подвійні дзета-, так і потрійні дзета-базиси вважаються розщеплено-валентними через поділ валентної електронної структури на різні функції. Додаткові функції можна додати до цих базисних наборів, такі як поляризаційні або дифузні функції [30]. Поляризаційні функції дозволяють атомним орбіталям стати поляризованими та рухатися, коли вони знаходяться поблизу інших сусідніх атомів.

Дифузні функції дозволяють електронам займати ширшу область в межах однієї орбіталі, ніж це було б визначено інакше. Ми розглядатимемо як використовується базисний набір 6-31G (d,p) для всіх розрахунків для збалансувати обчислювальну ефективність і точність. Базисний набір 6-31G (d,p) включає шість ОГС описують основні електрони, а валентну структуру розділено на два окремих ОГС; один містить три функції Гауса, а друга містить одну. Є також поляризаційні функції, додані до всіх атомів [28].

1.3.4. Моделі для опису впливу розчинника

Розрахунки ТФГ виконуються в газовій фазі, якщо модель сольватації не обрана. Сольватацію можна моделювати явно чи неявно, або робити модель у газовій фазі. Явні моделі явно розраховують вплив розчинника на молекулу, маючи перевагу у описі взаємодії розчинник-речовина [30]. Однак явні моделі потребують багато часу, інтенсивних обчислень, і важко виконати. Як їх альтернатива, застосовуються неявні моделі, що описують розчинник як певний континуум, який представляє розчинник як поляризаційне середовище. Неявні моделі сольватації простіші в обчисленні ніж явні моделі, але не в змозі врахувати конкретні взаємодії розчиненої речовини та розчинника. Популярна модель континууму - це модель поляризованого континууму (МПК), яка описує розчинник через поляризаційне поле з використанням діелектричної проникності вибраного розчинника. Порожнина, молекулярної форми розраховуваної молекули розчиненої речовини вставляється в поляризаційне поле і обчислюється поверхневий заряд. У межах неявної області можуть бути обчислення збудження, що виконуються з використанням теорії лінійного відгуку (ЛВ, *eng.* LR) або теорії специфічного стану (СС, *eng.* SS). Істотна перевага підходу СС порівняно з теорією ЛВ є здатність правильного врахування взаємної релаксації електронної густини розчиненої речовини і відповіді від розчинника під час збудження. Таким чином, СС підхід має а більш точний опис електростатичних взаємодій між молекулами розчиненої речовини та розчинника, що призводить до більш точного визначення енергій збудження [31].

Інші моделі використовують теорію ЛВ, яка за замовчуванням є нижчим методом для розрахунку поглинання та смуги випромінювання порівняно з методами СС.

Через обмеження як чисто неявних, так і явних моделей, були розроблені гібридні методи, які включають явну модель на першій сольватній оболонці тоді

як, для врахування впливу основної маси розчинника використовується неявна модель. Дослідження показали, що змодельовані електронні збудження добре коррелюють з експериментальною роботою, коли поле розчинника має явне значення компоненти [31].

Ми розглядатимемо, квантово-механічні теорії ТФГ/часозалежна ТФГ (ЧС-ТФГ), реалізовані програмному пакет Gaussian09.

1.3.5. Обчислення за моделлю газової фази

Модель газової фази обчислюється для порівняння з сольватованими моделями. Флуоресценцію кожної молекули флуорофору в газовій фазі розраховували за допомогою функціоналу M06-2X.

Обчислення флуоресценції газової фази складається з чотирьох кроків. На **рисунку 1.8** представлено кожен розрахунок виконаний крок і результати кожного кроку.

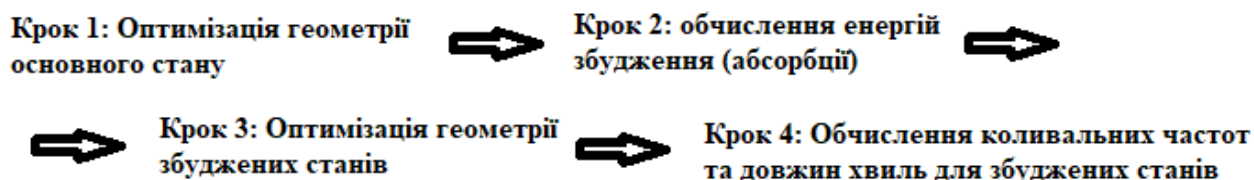


Рисунок 1.8 - Основні кроки у обчисленні флуоресценції у газовій фазі.

Для кожного розрахунку оптимізованої геометрії проводився розрахунок частоти коливань, що виконується для підтвердження того, що розрахунок досяг мінімуму на кривій потенційної енергії (**рис. 1.8**, крок 1). Вібраційні спектри аналізували, щоб підтвердити відсутність будь-яких від'ємних (негативних) частот. Негативні частоти виникають, якщо молекулярна геометрія не знаходиться на енергетичному мінімумі.

Як тільки геометрія основного стану визначена, лінійна енергія збудження відповіді до першого збудженого стану розраховується в газовій фазі (**рис. 1.8**,

крок 2). Геометрія збудженого стану є розраховується шляхом збурення геометрії основного стану, введення енергії збудження та повторної оптимізації молекула в першому збудженому стані (рис. 1.8, крок 3). Знову розрахунок частоти виконується для підтвердження правильності геометрії та створюється спектр випромінювання (рис. 1.8, крок 4).

1.3.6. Модель неявної сольвації

Модель неявної сольватації виконується шляхом реалізації техніки МПК у шести кроках для кожної молекули для моделювання повного процесу поглинання-випромінювання. Шість кроків можуть бути розділені на три великі категорії:

- 1) оптимізація геометрії,
- 2) розрахунок перехідної енергії,
- 3) розрахунки частоти коливань.

Для кожного розрахунку оптимізованої геометрії виконано розрахунок частоти коливань.

Перший виконаний етап обчислення – це оптимізація геометрії основного стану ТФГ за допомогою додавання розрахунку частоти атомного зв'язку. Результати цього початкового кроку включають як енергетичну складову, так і частоти коливань оптимізованої структури.

На *другому етапі*, теорія ЧС-ТФГ використовується для розрахунку спектрів поглинання кожної молекули. Енергія збудження, необхідна для досягнення першого збудженого стану, обчислюється та використовується для розрахунку перша геометрія збудженого стану. Щоб отримати більш реалістичну модель для енергії поглинання та довжини хвилі, використовується підхід сольватації залежно від стану.

Врешті, фінальний *третій етап*. Розрахунок поглинання залежно від стану надає довжини хвиль, пов'язані з різними орбітальними переходами, а також відносну інтенсивність, виражена як сила осцилятора.

Розділ 2. Теоретична частина та обговорення результатів

2.1. Обґрунтування вибору BODIPY-Ph-SH

На **Рисунку 2.1** зображено основні елементи, що необхідні для побудови репортеру:

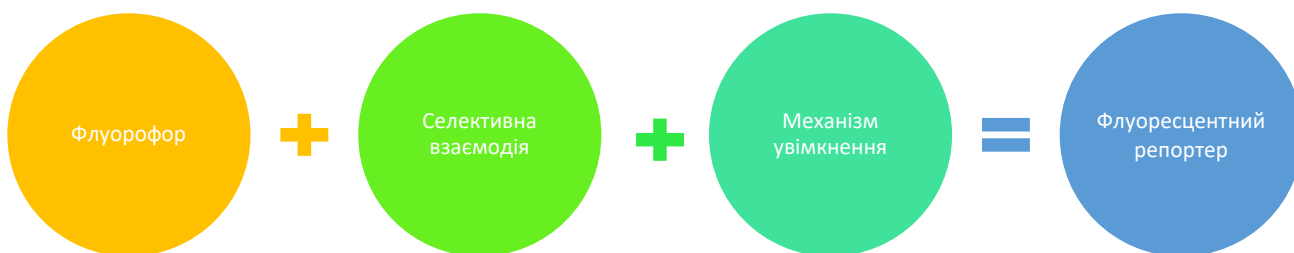


Рис. 2.1 - Основні елементи, важливі для створення флуоресцентного зонду.

Роль флуоресцентної групи полягає у випромінненні світла при опроміненні сполуки зовнішнім джерелом. Відтак, важливими її характеристиками є максимуми хвиль поглинання, флуоресценції, молярний коефіцієнт екстинкції та квантовий вихід флуоресценції. Також ключовими параметрами є біосумісність достатній час напіврозкладу за умов мікроскопіювання клітин.

Хімічна реакція (або фізична взаємодія), що є селективною до обраної мішені. Завдяки ній досягається взаємодія сполуки лише із вибраними сполуками-мішенями (за обраних фізичних параметрів).

Механізм передачі сигналу між першими двома елементами, та детекція цієї зміни при виконанні умов селективної взаємодії. Має надійно змінювати властивості флуоресцентної частини-еміттера, тим самим передаючи інформацію про взаємодію.

Відповідно до вищезазначених вимог, була запропонована сполука 4-(5,5-дифлуоро-1,3,7,9-тетраметил-5Н-4І4,5І4-дипіроло[1,2-с:2',1'-f][1,3,2]діазоборин-10-іл)бензотіолу (дипіррометенбородифлуорид, **BODIPY-Ph-SH**, Рис. 2.2).

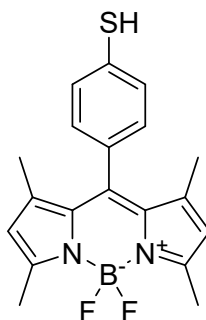


Рис. 2.2 - Структура сполуки **BODIPY-Ph-SH**.

Запропонована сполука **BODIPY-Ph-SH**:

- є ліпофільною
- має у своїй структурі яскравий, біосумісний флуорофор – дипіррометенбородифлуориду (eng. BODIPY)
- присутня група для селективної реакції із α,β -ненасиченими РКС
- продукт реакції (**Рис. 2.3**) є флуоресцентним, на відміну від вихідної тіолатної форми
- $pK_a(\text{Ph-SH})$: 6.47

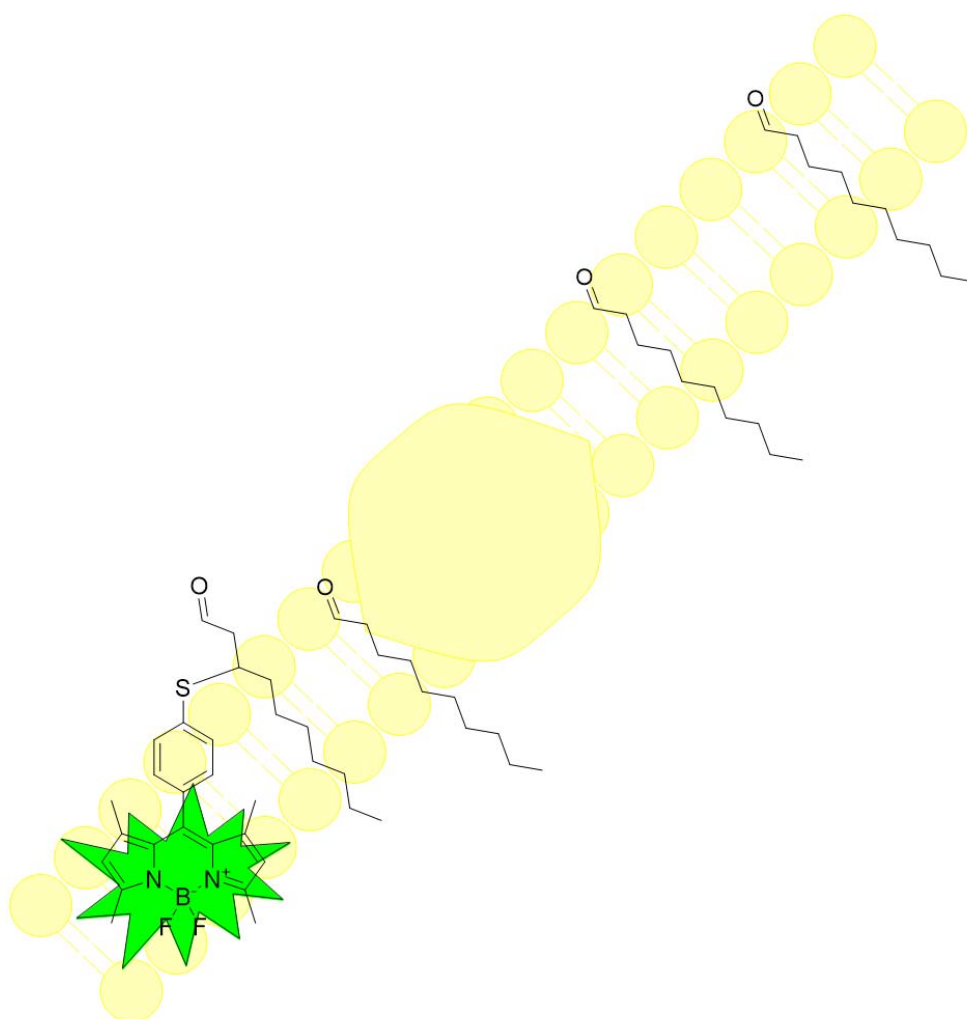


Рис 2.3 - Схематичне зображення продукту реакції сполуки BODIPY-Ph-SH у мембрані клітин.

2.2. Передбачення механізму флуоресцентної відповіді репортеру

Згідно описаних вище підходів (розділ 1.3), розрахунки ТФГ (метод: M062X/6-311G) були застосовані для дослідження можливості гасіння фотоіндукованого переносу електронів (ФПЕ, *eng.* PeT) барвників BODIPY-Ph-SH і BODIPY-Ph-S- (рис. 2.4). Молекулярні орбітальні рівні від -4 рівня вищої зайнятої молекулярної орбіталі (ВЗМО, *eng.* HOMO) до +4 рівня найнижчої вакантної молекулярної орбіталі (НЗМО, *eng.* LUMO) барвників були розраховані для основного та збудженого станів системи за допомогою

програмного пакету Gaussian 16 (Gaussian 16: ES64L-G16RevC.01, 28 процесорів через спільну пам'ять Digital Reserch Alliance Canada) та візуалізовано за допомогою програмного забезпечення Avogadro Chemistry© 2022, щоб обчислити кожен орбіталь і надати обґрунтовані докази на підтримку фотоіндукованого механізму переносу електронів або його відсутності в кожній із форм.

Розрахункові дані зведені в табл. 2.1.

	ВЗМО-1 (eV)	ВЗМО (eV)	НВМО (eV)	НВМО+1 (eV)	Дієдральний кут BODIPY-Ph-SH (°)
BODIPY-Ph-SH (GS)	-6,65	-5,91	-2,10	0,112	80,6
BODIPY-Ph-S⁻ (GS)	-5,66	-5,09	-1,97	0,71	71,9
BODIPY-Ph-SH (ES)	-6,65	-5,84	-2,18	0,112	73,5
BODIPY-Ph-S⁻ (ES)	-5,60	-4,94	-2,15	0,65	72,9

Таблиця 2.1. Розрахункові дані запропонованих молекулярних структур.

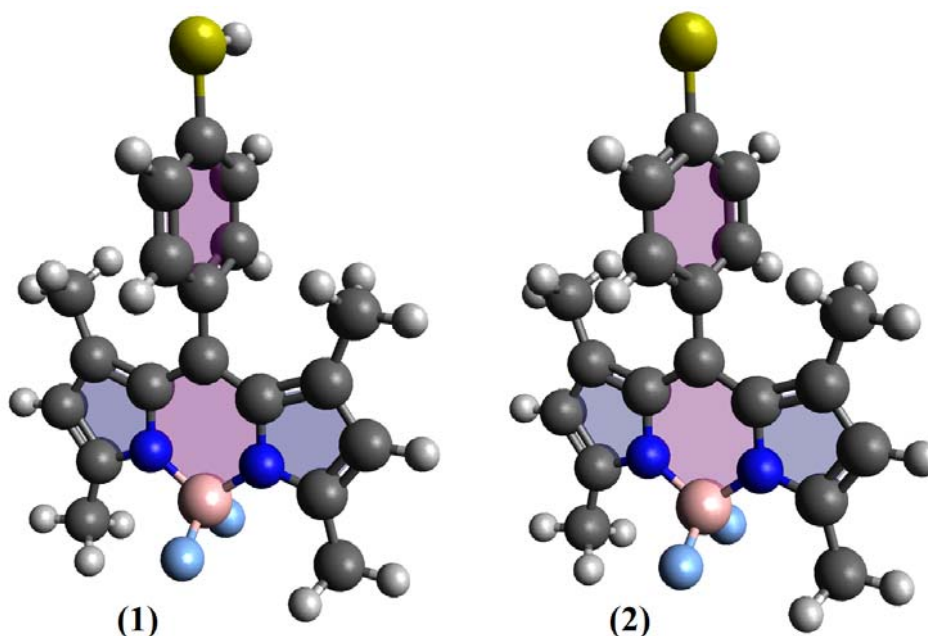


Рисунок 2.4 - (1)-BODIPY-Ph-SH (2)-BODIPY-Ph-S⁻.

Цікаво, що попередні дані напівемпіричного аналізу, наведеного у посиланні [17], вказував на те, що ступінь кон'югації між фенільним кільцем і флуорофором BODIPY може бути вирішальним ефективною процесу ФПЕ. Згідно з цими попередніми розрахунками, у депротонованій формі помітно вища донорна сила тіолатної групи відкриває ефективний шлях гасіння, швидше за все, через швидку зворотну електронну передачу зі зсувом заряду (ЗЗ, *eng.* СТ).

Тим не менш, ґрунтуючись на нашій оцінці рівнів молекулярних орбіталей (МО) BODIPY-Ph-SH та наявній інформації в літературі [32,16], ми можемо зробити висновок, що значне збільшення квантового виходу флуоресценції у випадку протонованої форми барвника є результатом збільшення на 1,5 електронвольта (eV) рівня ВЗМО фенілтіолату порівнюється з донорною групою тіофенолу в меза-положенні флуорофору. Крім того, відмінності в дієдральному куті між площинами фенільного кільця і BODIPY відрізняються лише на 8,7 градусів в основному стані і майже не мають різниці (1 градус) у збудженому стані. Це також може вказувати на вирішальну роль зміни рівня ВЗМО як ключової причини для спостереження появи флуоресценції у разі протонування BODIPY-Ph-S-.

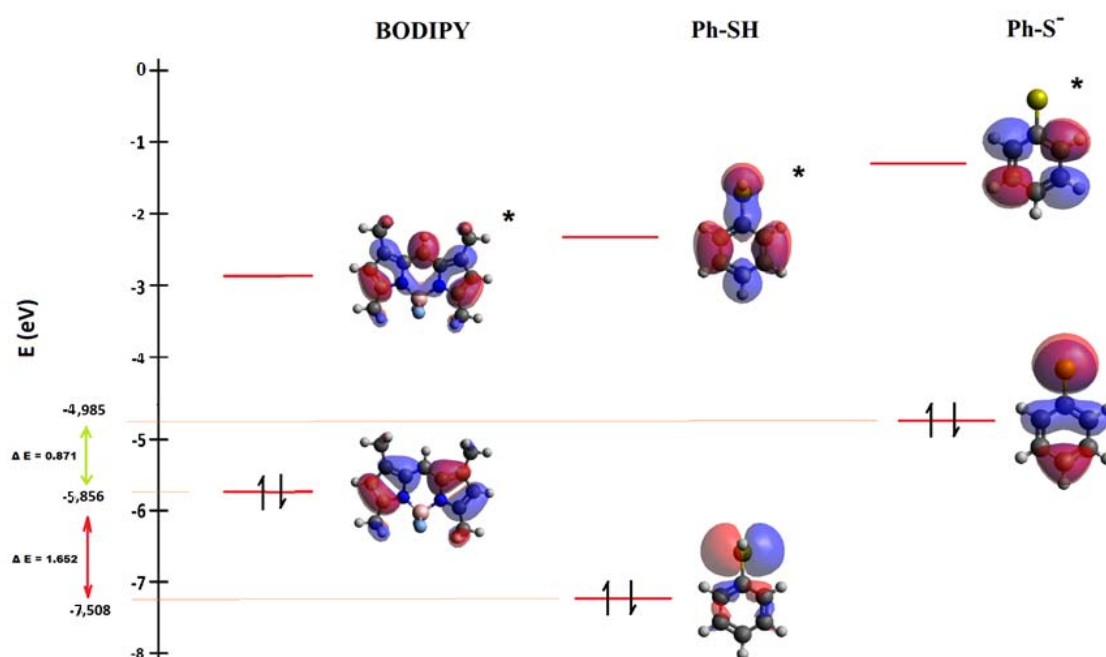


Рисунок 2.5 - Обчислені рівні ВЗМО та НЗМО BODIPY-Ph-SH та BODIPY-Ph-S⁻. Проведені розрахунки показують, що лише депротонована форма може мати гасіння ФПЕ, що підтверджується експериментальними даними.

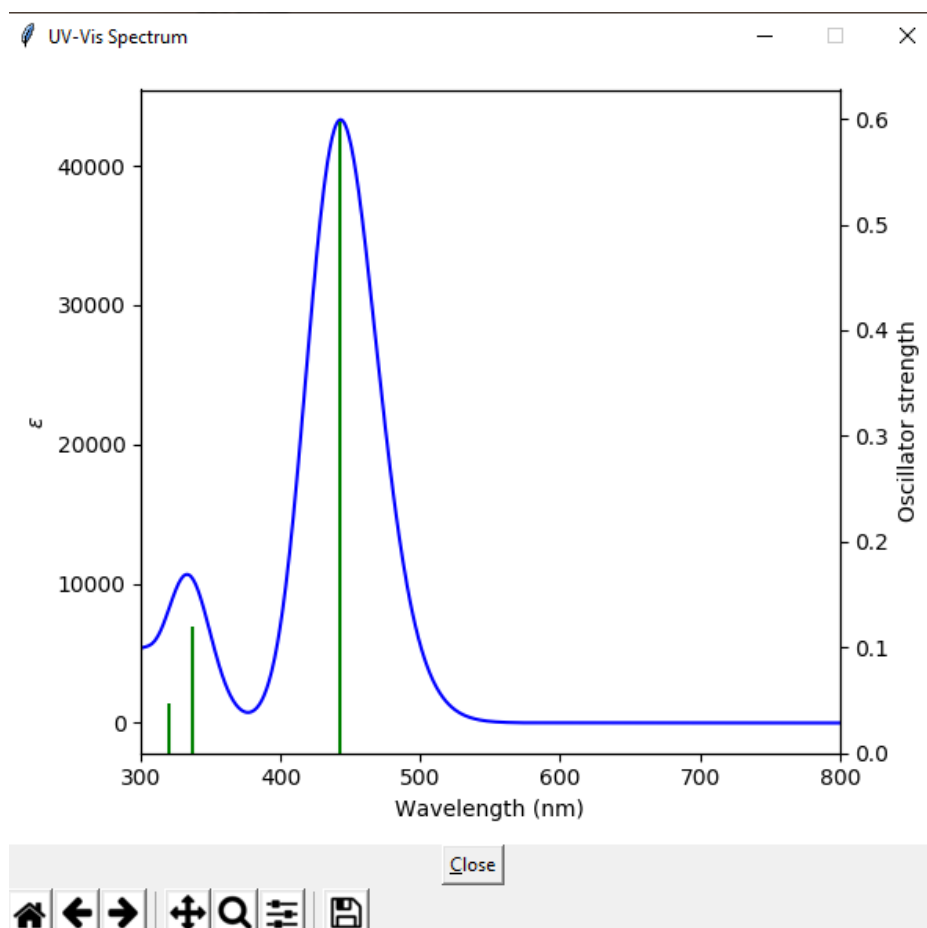


Рисунок 2.6 - Передбачений спектр флуоресценції для сполуки BODIPY-Ph-SH із виділеними основними енергіями переходів (виділено зеленим) у програмі Gausssum.

Підсумовуючи, на основі розрахованих структур і значень для ВЗМО і НЗМО акцептора (ядро BODIPY) і донорів Ph-SH і Ph-S⁻ як частин молекул BODIPY-Ph-SH і BODIPY-Ph-S⁻ можна зробити висновок: лише депротонована форма запропонованого флуоресцентного репортера може бути флуоресцентно неактивною. Тож описані у цьому оглядовому рефераті теорія методи для обчислення були застосовані та апробовані для моделювання та розрахунку

сполук. Результати, зокрема передбачення щодо відмінності у квантовому виході для BODIPY-Ph-SH і BODIPY-Ph-S- є важливим підтвердженням релевантності застосування методів ТФГ розрахунків для аналізу геометрії та люмінісцентних властивостей органічних сполук.

Розділ 3. Експериментальна частина

3.1. Синтез

3.1.1 Матеріали та методи

Розчинники (HPLC-grade) для спектроскопії та колонкової хроматографії були придбані через Fisher Scientific. Усі хімічні речовини були поставлені компанією Sigma-Aldrich і використані без додаткового очищення.

3.1.2. Використані синтетичні методики

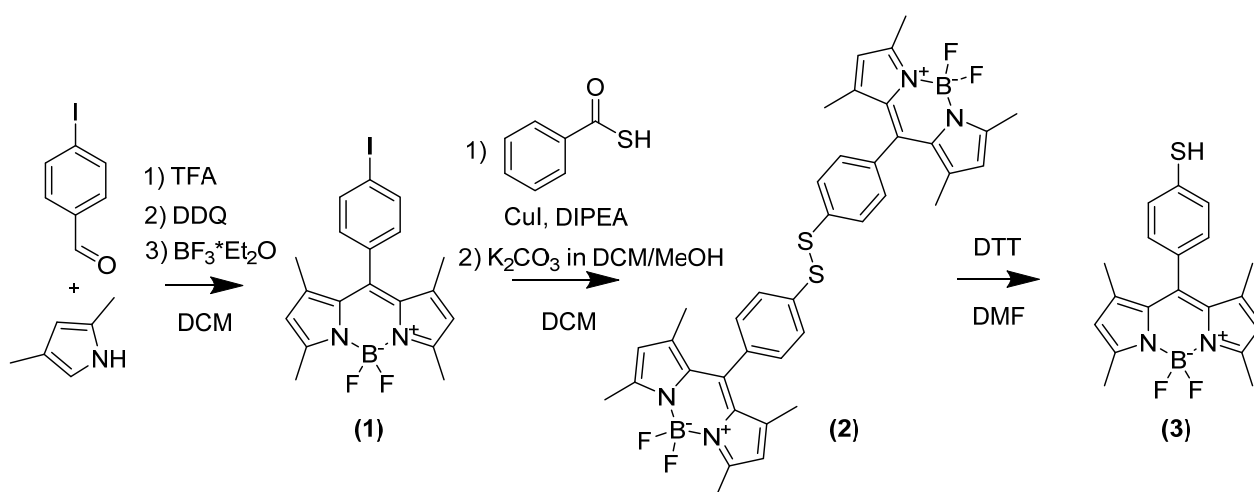


Рис. 3.1 - Загальний синтетичний шлях до BODIPY-Ph-SH модифіковано з [33].

5,5-difluoro-10-(4-iodophenyl)-1,3,7,9-tetramethyl-5H-4,5,14-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinine) (1)

У круглодонну колбу на 200 мл, оснащену магнітною мішалкою, входом для сухого аргону та перегородкою, послідовно завантажували 4-йодбензальдегід (0,189 г, 0,811 ммоль), дихлорметан (100 мл) і 2,4-диметилпірол.

(0,17 мл, 1,622 ммоль). Реакційну суміш перемішували протягом 10 хв. і додавали трифлуороцтову кислоту (1-2 краплі). Отриманий темно-червоний розчин перемішували при 20 °С протягом ночі в темряві. Далі була проведена тонкошарова хроматографія (Етилацетат/циклогексан 2:8). Наступного ранку додавали суспензію 2,3-дихлор-5,6-диціано-1,4-бензохінону (0,19 г, 0,81 ммоль) у дихлорметані (7 мл) і перемішування продовжували протягом 5 годин.

Потім до реакційної суміші послідовно додавали N,N-діізопропілетиламін (4 мл, 24,33 ммоль) і комплекс трифториду бору з діетилендіаміном (4,2 мл, 32,44 ммоль), що призвело до утворення темно-зеленого розчину. Перемішування продовжували протягом 2 годин (19:30-21:30) і реакційну суміш пропускали через шар силікагелю. Леткі речовини випарювали при зниженому тиску. Червоний (зелена флуоресценція) неочищений матеріал очищали хроматографією на силікагелі (дихлорметан/циклогексан 2:3) з отриманням (1) у вигляді оранжевого порошку (вихід 46 %).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.85 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.05 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 5.99 (s, 2H), 2.55 (s, 6H), 1.42 (s, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 156.0 (C), 143.1 (C), 140.2 (C), 138.5 (2 CH), 134.7 (C), 131.3 (C), 130.1 (2 CH), 121.6 (2 CH), 94.9 (C), 14.8 (4 CH_3).

1,2-bis(4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-4H,5H-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)phenyl)disulfane (2)

У десятимілілітрову круглодонну колбу, обладнану магнітною мішалкою, входом для сухого аргону та перегородкою, завантажували p-I-Benz-BODIPY (120 мг, 0,25 ммоль). Послідовно додавали сухий толуол (4 мл) і 1,10-фенантролін (10 мг, 0,08 ммоль), свіжодистильований N,N-діізопропілетиламін (100 мкл, 0,58 ммоль) і тіобензойну кислоту (40 мкл, 0,33 ммоль). Потім отриманий розчин дегазували аргоном протягом 3 хв. перед додаванням йодиду міді (10 мг, 0,06

ммоль). І дегазували аргоном ще 3 хв. Реакційну суміш кип'ятили зі зворотним холодильником протягом ночі.

Після охолодження темно-червону суміш фільтрували через целіт, промивали CH₂Cl₂ і видаляли леткі речовини за зниженого тиску. Отриманий темний неочищений BODIPY-тіобензоат розчинили в CH₂Cl₂ (5 мл) і MeOH (5 мл) і додали K₂CO₃ (115 мг, 0,83 ммоль). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 4 год (13:00-17:00). Далі було видалено леткі речовини, а залишок розчинено в CH₂Cl₂, промито насиченим водним розчином NH₄Cl. Далі його сушили над MgSO₄, фільтрували та упарювали. Отриману речовину очищали хроматографією на силікагелі (CH₂Cl₂/циклогексан 6:4). У результаті було отримано (2) з виходом 61%.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 4H), 7.23 (d, *J* = 8.4 Hz, 4H), 5.98 (s, 4H), 2.55 (s, 12H), 1.36 (s, 12H). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 156.0 (4 C), 142.9 (4 C), 140.4 (2 C), 137.9 (2 C), 134.5 (4 C), 131.4 (2 C), 129.0 (4 CH), 128.9 (4 CH), 121.6 (4 CH), 14.7 (4 CH₃), 14.6 (4 CH₃). ¹⁹F NMR (400 MHz, CDCl₃) δ -141.8 (q, *J*_{F-B} = 33 Hz, BF₂).

4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-4l4,5l4-dipyrrolo [1,3,2]diazaborinin-10-yl)benzenethiol (3)

37 мг раніше синтезованого димеру помістили в п'ятимілітрову двогорлу колбу, далі додали 3 мл диметилформамід (ДМФА). Реакційна колба і конденсатор були дегазовані 5 разів. Після додавання дитіотреїтолу (6 мг), реакційну суміш дегазували ще 5 разів і залишили на ніч при кімнатній температурі. Далі до неї додали 50 мл дихлорометан() та промили розсоллом (x1) і водою (x3). Органічний шар висушили над NaSO₄ і випарили. Потім суміш була очищена колонковою хроматографією з виходом (86 %, 24 мг) 3:2 DCM: Нех для ТШХ.

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 7.39 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.15 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 5.98 (s, 2H), 3.58 (s, 1H), 2.55 (s, 6H), 1.43 (s, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 155.7 (2 C), 143.1 (2 C), 140.9 (C), 132.6 (C), 132.4 (2 C), 131.5 (C), 129.8 (2 CH), 128.9 (2 CH), 121.4 (2 CH), 14.8 (4 CH_3).

Таким чином, перші дві стадії були виконанні згідно з методикою [33]. Умови проведення останньої стадії, де відбувалося відновлення дисульфиду (2), були модифіковані для підвищення виходу реакції (з 65% до 86%).

3.2. Вивчення можливості застосування обраного зонду для моніторингу РКС у спрощеній ліпосомній моделі

3.2.1. Флуоресцентні властивості BODIPY-Ph-SH

Максимальне поглинання РТІ-спектрофлуориметра в ацетонітрилі було виміряно для BODIPY-Ph-SH: 501 нм, з молярним коефіцієнтом екстинкції: $89251 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.2.2. Експерименти з допованими ліпосомами

Для дослідження здатності барвника BODIPY-Ph-SH реагувати з альдегідами, було використано розчини ліпосом, що містять BODIPY-Ph-SH і два типи ліпосом: з 2-транс-деценалем як характерною АФК і без нього.

3.2.3. Підготовка ліпосом

Вихідний 20-наномольний розчин 1,2-діолеоїл-sn-гліцерин-3-фосфохоліну (DOPC) був зроблений в хлороформі..

3.2.4. Підготовка розчину ліпосом, що складаються тільки з DOPC-фосфоліпідами

У колбу додали 150 мкл 20 мМ DOPC. Хлороформ випарили під током ліпідна плівка була додатково висушена у вакуумі протягом мінімум 60 хв. Далі

її було гідратовано за допомогою 150 мкл буферного розчину 150 мМ NaCl – 10 мМ HEPES (рН 7,3) до отримання концентрації ліпідів 20 мМ. Для того, щоб збільшити одношаровість, отриману суспензію піддали п'яти циклам заморожування-розморожування-обробці ультразвуком (5 хв у сухому льоду, потім 5 хв обробці ультразвуком у водяній бані кімнатної температури). Потім зразок був екструдований 21 раз через полікарбонатну мембрану 100 нм за допомогою міні-екструдера (Avanti Polar Lipids, Inc.), що дозволило отримати суспензію ліпосом діаметром 100 нм. Одержані ліпосоми містять у середньому 75 000 ліпідів DOPC на ліпосому.

3.2.5. DOPC-ліпосоми, доповані 2-транс-деценалем

У колбу додали 150 мкл 20 мМ DOPC. Хлороформ випарили під током. Ліпідна плівка була додатково висушена у вакуумі протягом мінімум 60 хв. Далі її було гідратовано за допомогою 150 мкл буферного розчину 150 мМ NaCl – 10 мМ HEPES (рН 7,3) до отримання концентрацій ліпідів 20 мМ та альдегідів 2 мкМ. Для того, щоб збільшити одношаровість, отриману суспензію піддали п'яти циклам заморожування-розморожування-обробці ультразвуком (5 хв у сухому льоду, потім 5 хв обробці ультразвуком у водяній бані кімнатної температури). Потім зразок був екструдований 21 раз через полікарбонатну мембрану 100 нм за допомогою міні-екструдера (Avanti Polar Lipids, Inc.), що дозволило отримати суспензію ліпосом діаметром 100 нм. Одержані ліпосоми містять у середньому 75 000 ліпідів DOPC на ліпосому та 100 молекул альдегіду на ліпосому.

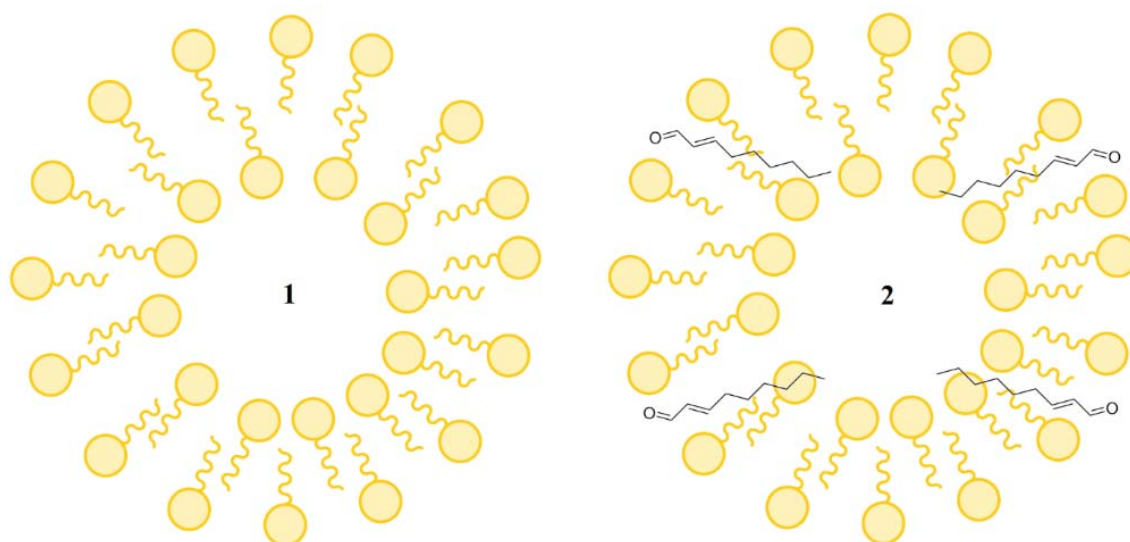


Рис. 3.2 - Схематичне зображення підготовлених ліпосом DOPC.

3.2.6. Отримання спектру випромінювання сполуки BODIPY-Ph-SH і ліпосомній моделі

Інтенсивність флуоресценції ліпосом Дипальмітоїлфосфатидилхоліну (ДФХ, *eng.* DOPC) розміром 400 нм і 1 мкМ розчину BODIPY-Ph-SH (розчиненого в 2,6 мкл ДМСО) у суміші буфера LCIS вимірювали за допомогою флуориметра (Photon Technology International Inc) зі щілинами світлового потоку збудження та випромінювання шириною 0,3 мм. Спектри випромінювання були отримані шляхом збудження зразка світлом із довжиною хвилі 488 нм та запису спектру випромінювання від 500 нм до 700 нм. Як джерело альдегіду використовували 2-транс-деценаль у концентрації 300 нМ (об'єм кювети 150 мкл).

Результати флуориметричних вимірювань узагальнено на **рисунках 3.3. та 3.4.**

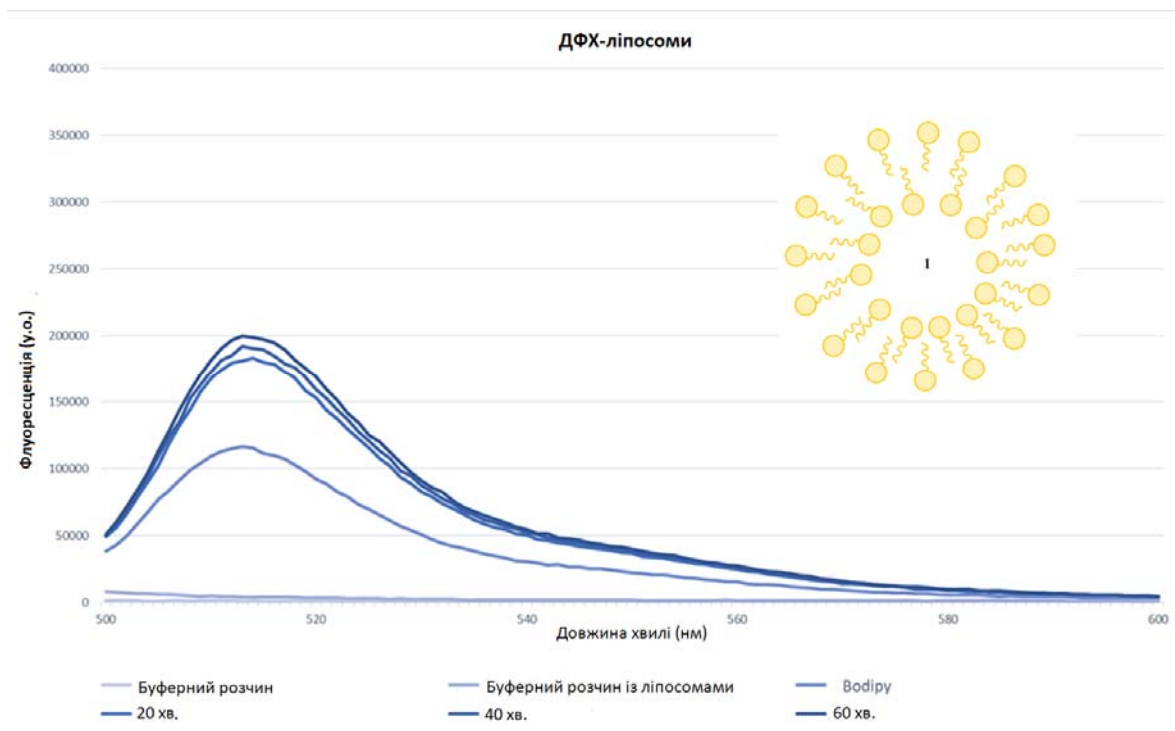


Рис. 3.3. Залежні від часу флуориметричні вимірювання ліпосом DOPC за допомогою флуоресцентного зонда BODIPY-Ph-SH.

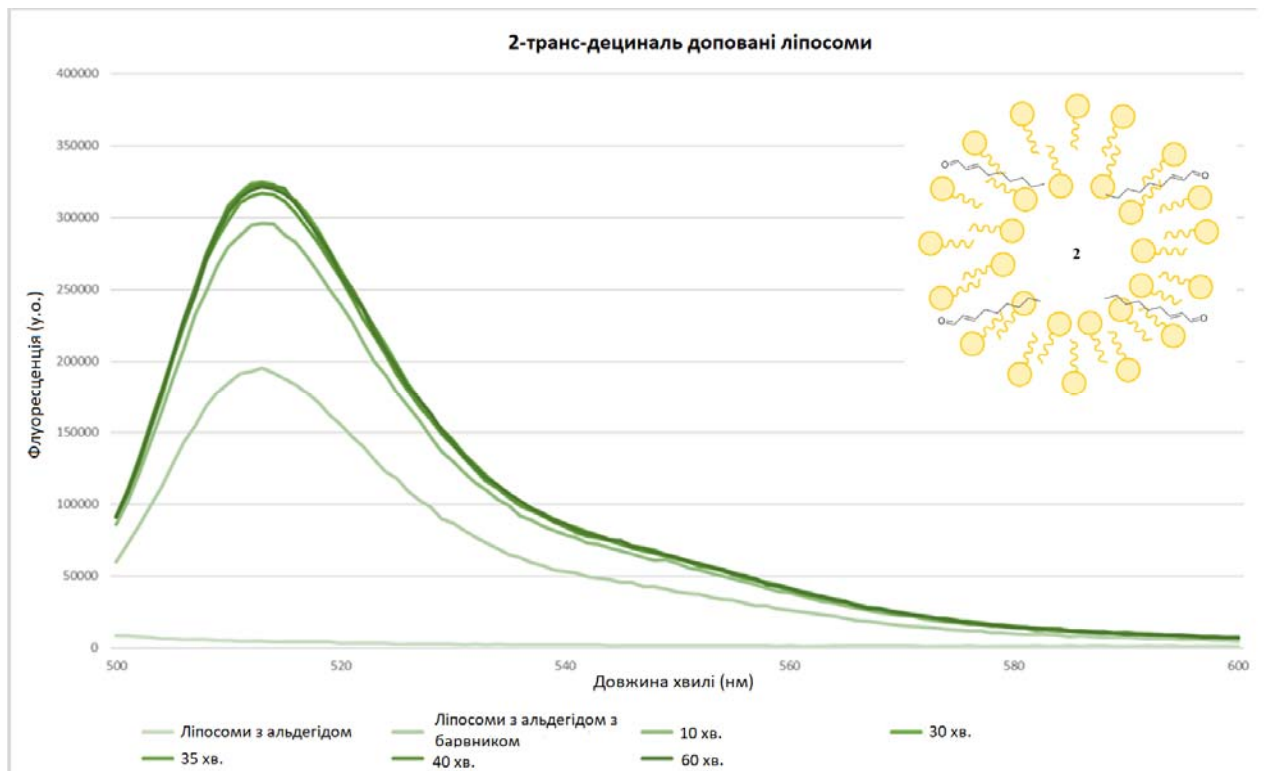


Рис. 3.4. Вимірювання спектру флуоресценції репортеру BODIPY-Ph-SH у ДФХ-ліпосомах в залежності від часу.

3.2.7. Спостереження

Флуоресценцію гетерофазної емульсії ліпосом DOPC з 2-транс-деценалем і без нього при збудженні 488 нм спостерігали протягом 60 хв в діапазоні довжин хвиль від 500 до 700 нм. Після додавання зонда інтенсивність флуоресценції зросла на 1,88 за 60 хв, з 18000 до 33000 у.о. на відміну від ліпосом, що містять лише DOPC: після додавання BODIPY-Ph-SH вони показали початкову інтенсивність при 12700 у.о., та протягом наступних 60 хв було зафіксовано зростання лише в 1,45 рази до 18400 у.о. Отримані дані свідчать, що додавання вибраного флуоресцентного зонда до DOPC-ліпосом, допованих альдегідом, призводить до вищого початкового рівня флуоресценції, але також до вищої інтенсивності флуоресценції після 60 хвилин *інкубації*. Слід зазначити, що спостережувану зміну флуоресцентних властивостей не можна пояснити виключно алкілуванням флуоресцентно тихої тіолатної форми барвника, оскільки очікуваний квантовий вихід не-ФПЕ флуорофора BODIPY-Ph-S-Alk становитиме майже $5 \cdot 10^3$ разів вище [34].

3.3. Вивчення можливості використання обраного зонду для моніторингу ПОМ на прикладі клітин HT1080

3.3.1. Культура клітин

Клітини лінії HT-1080 культивувалися в DMEM-середовищі (поживне середовище із високим вмістом глюкози, L-глутаміну, фенолового червоного та пірувату натрію, доповненого 10% фетальної бичачої сироватки (eng. FBS, Gibco), 1% пеніцилін-стрептоміцин і 1% незамінних амінокислот). Під час дослідження клітини знаходилися середовищі із зволоженою атмосферою при мемпературі 37°C та відсотковому вмісту CO₂ 5%. Клітини оброблялись

трипсином та переносилися на нове середовище два тижні із проведенням контролю на мікоплазменну інфекцію. Клітини зазнавали не більше 30 поділів на момент проведення мікроскопіювання.

3.3.2. Проведення мікроскопіювання

Широкопольна флуоресцентна мікроскопія та мікроскопія диференціально-інтерференційного контрасту (ДІК, *eng.* DIC) проводилися із застосуванням широкопольної установки на основі об'єктива, що складається з інвертованого мікроскопа (Nikon Eclipse Ti), оснащеного системою ідеального фокусування (СІФ) з повітряним об'єктивом (20x, Nikon CFI Plan Apo VC). Клітини перебували у сталому середовищі (37°C і 5% CO₂ у зволоженій атмосфері з використанням інкубатора з верхньою поверхнею, компанії Токаї Ніт). Лазерне збудження із максимумом 488 нм використовувалося при потужності 0,1 мВт для об'єктиву 20x; промінь був підключений до об'єктива мікроскопа за допомогою багатосмугового дільника променя (ZT488/640grc, Chroma Technology). Випромінювання було спектрально відфільтровано за допомогою емісійного фільтра ZET488/640m (Chroma Technology). Моторизована вежа блоку фільтра використовувалася для багатоканального зображення для перемикання між флуоресцентним каналом і ДІК, щоб забезпечити відповідність зображень цих двох каналів у часі. Флуоресцентне випромінювання було зібрано через той самий об'єктив і зафіксовано на камері пристрою із зарядовим зв'язком електронів із зворотним освітленням (*eng.* EM-CCD) (Andor iXon Ultra DU-897). Керування приладом відбувалося за допомогою програмного забезпечення Nikon NIS-Elements: автоматична експозиція 300 мс (readout mode (EM Gain 1 MHz at 16-bit), EM gain multiplier (17), conversion gain (Gain 3)).

Клітини переносилися на поживне середовище за 24 години до мікроскопіювання на вкриту фібронектином 8-лунковий скляний тримач (ibidi μ -предметне скло) в DMEM буфері, що містить фактори росту. Щоб досягти приблизно 50% конфлюентності під час візуалізації, 15 000 трипсинізованих клітин, суспендованих у 300 мкл DMEM, поміщали в кожен лунку.

Вихідний розчин сульфату міді (II) був приготований у високоочищеній воді MilliQ з концентрацією 5 мг/мл. Основну концентрацію гідропероксиду кумолу готували в PBS-буфері у концентрації 33 мМ. Безпосередньо перед обробкою клітин готували розчин DMEM, який містить 300 мкМ гідропероксиду кумолу та 30 мкМ сульфату міді (II). Обмін середовища для клітин NT1080, проводили обробляючи їх 100 мкМ гідропероксидом кумолу та 10 мкМ сульфатом міді (II) протягом зазначеного часу інкубації перед візуалізацією. Для візуалізації середовище видаляли та замінювали розчином для візуалізації живих клітин (LCIS, ThermoFisher), із 5 мМ концентрацією глюкози. Умови паралельного контролю полягали в заміні середовища на свіжий DMEM перед інкубуванням. Барвник BODIPY-Ph-SH розчиняли у 10 мкл ДМСО (2-3% ДМСО від загального об'єму буфера у кюветі). Мікроскопіювання проводили з концентрацією флуорофора у 100 мкМ. Результати підсумовані на рисунку 3.5.

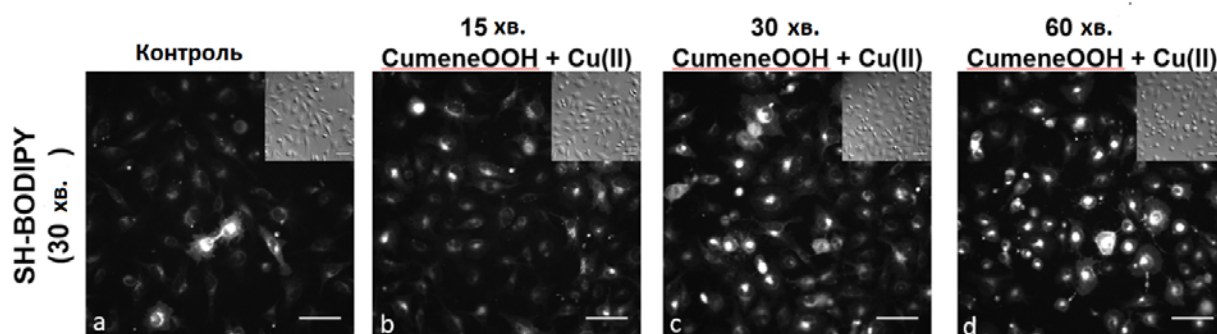


Рис. 3.5 - Клітини лінії NT-1080, що були інкубовані із індуктором ПОМ впродовж різного часу (a – 0 хв, b – 15 хв, c – 30 хв, d - 60 хв) перед мікроскопіюванням. Наведено результат 30-ти хвилинного спостереження.

3.3.3. Аналіз зображень

Усі зображення були проаналізовані за допомогою пакета обробки зображень FIJI4.

Скоригована загальна клітинна флуоресценція (СЗКФ, *eng.* STCF) і значення фонові флуоресценції були кількісно визначені шляхом адаптації раніше опублікованого протоколу. Рівняння S3 було використано для розрахунку STCF:

$$\text{STCF} = \frac{\text{Загальна флуоресценція} - (\text{Загальна площа клітини} * \text{Флуоресценція фону})}{\text{Кількість клітин}}$$

Формула 3.1 - Де загальна флуоресценція — це інтегрована інтенсивність для пікселів, які містять клітини, загальна площа клітини — це кількість пікселів, що містять клітини, флуоресценція фону — середня інтенсивність флуоресценції на піксель для всіх пікселів, які не містять клітин, а кількість клітин — кількість підрахованих вручну клітинок на зображенні. Вимірювання та похибки STCF є середніми значеннями та стандартною похибкою.

Щоб ідентифікувати область зображення, що містить клітини, використовувався макрос ImageJ для аналізу відповідного зображення DIC. Спочатку дисперсійний фільтр із радіусом 4 пікселі був застосований до DIC-зображення, де області високої дисперсії представляють наявність клітини. Було створено бінарне зображення та застосована функція заповнення отворів. Потім була використана функція «Аналіз частинок», щоб заповнити будь-які діри, що залишилися, розміром менше 20 пікселів у бінарному зображенні, встановивши значення пікселів на 255 і застосувавши функцію розширення. Бінарне зображення використовувалося для створення виділеної області, що містить клітини, і області без клітин. Загальна площа комірки та загальна площа фону

вимірюються з цього бінарного зображення для кожного кадру, що полегшує вимірювання загальної флуоресценції та флуоресценції фону.

Спостережуваний рівень фонові флуоресценції є відносно низьким у розчині 98% LCIS з 2% ДМСО. Це може свідчити про те, що в розчині зонд існує в нефлуоресцентній формі за цих умов.

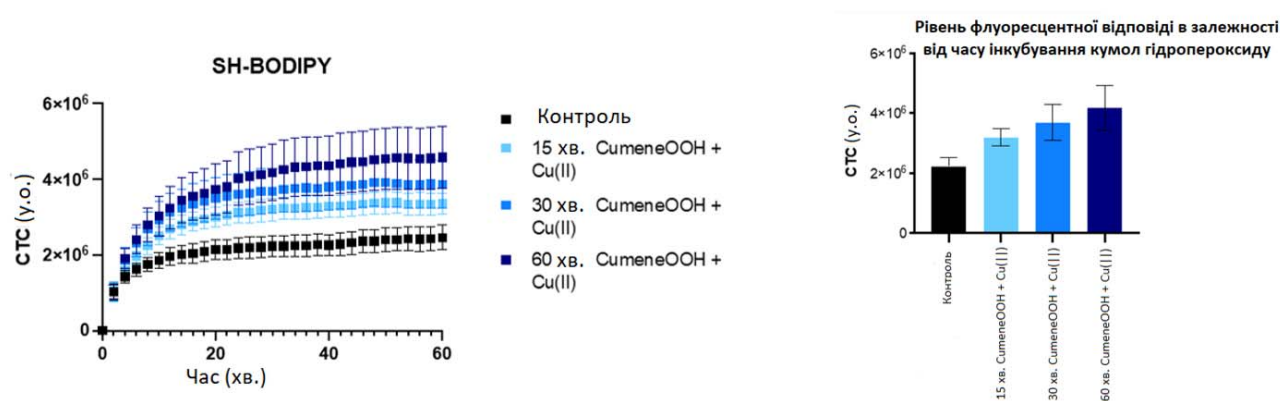


Рис. 3.6 - Результати клітинних досліджень із індуктором ПОМ.

Дані на Рис 3.6 свідчать про те, що клітини під впливом пероксидного стресу виявляють вищу реакцію на флуоресценцію, якщо протягом тривалого часу їх обробляти кумол гідропероксидом.

Клітини, що інкубувалися із гідропероксидом кумолу впродовж 60 хв. Показали вищу, близько 3 разів, флуоресцентну відповідь.

Висновки

У даній роботі було запропоновано флуоресцентний зонд, що є селективним до α,β -ненасичених карбонільних сполук та досліджено можливість його використання в умовах перокисного окиснення мембран.

Зокрема було запропоноване пояснення механізму флуоресцентної відповіді досліджуваного репортеру на основі обчислень за методом ТФГ та вдосконалено синтез цієї сполуки. Також продемонстровано можливість застосування репортеру BODIPY-Ph-SH у флуоресцентній мікроскопії для виявлення важливих метаболітів – α,β -ненасичених реактивних карбонільних сполук (НРКС). Детектована зміна флуоресцентної відповіді спостерігалася у залежності від рівня накопиченого рівня перокисного окиснення мембран, що, враховуючи селективність реакції приєднання тіолатної групи, дозволяє локалізувати у просторі та часі утворення, раніше не досліджених елементів каскаду нових типів клітинної загибелі.

Посилення флуоресцентного сигналу також спостерігалось в умовах спрощених штучних аналогів клітини, фосфоліпідних ліпосом, що дозволило відокремити вплив сторонніх факторів на рівень флуоресцентного сигналу так підтвердило механізм ввімкнення флуоресценції.

Важливо, що обраний зонд на основі флуорофору BODIPY показав достатній рівень біосумісності за умов проведення мікроскопіювання та низьку інтенсивність фонові флуоресценції (розчину). А також порівняно високий (близько 10 разів, порівняно із нафталімідними аналогами) коефіцієнт молярної екстинкції, що робить запропонований, селективний до НРКС, репортер привабливим зондом для досліджень клітинних мембран.

Список використаних джерел

- [1] Ayala, A.; Muñoz, M. F.; Argüelles, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev* **2014**, *2014*, 1–31. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>. [1].
- [2] Boutaud, O.; Aronoff, D. M.; Richardson, J. H.; Marnett, L. J.; Oates, J. A. *Determinants of the Cellular Specificity of Acetaminophen as an Inhibitor of Prostaglandin H 2 Synthases*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.102588199.
- [3] Yang, W. S.; Stockwell, B. R. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends Cell Biol* **2016**, *26* (3), 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.014>.
- [4] Yin, H.; Xu, L.; Porter, N. A. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews*. October 12, 2011, pp 5944–5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>.
- [5] Jana, A.; Baruah, M.; Samanta, A. Activity-Based Fluorescent Probes for Sensing and Imaging of Reactive Carbonyl Species (RCSs). *Chem Asian J* **2022**, *17* (8). <https://doi.org/10.1002/asia.202200044>.
- [6] Kikuchi, K.; Adair, L. D.; Lin, J.; New, E. J.; Kaur, A. Photochemical Mechanisms of Fluorophores Employed in Single-Molecule Localization Microscopy. *Angewandte Chemie International Edition* **2022**. <https://doi.org/10.1002/anie.202204745>.
- [7] Tang, Y.; Ma, Y.; Yin, J.; Lin, W. Strategies for Designing Organic Fluorescent Probes for Biological Imaging of Reactive Carbonyl Species. *Chem Soc Rev* **2019**, *48* (15), 4036–4048. <https://doi.org/10.1039/C8CS00956B>.
- [8] Volinsky, R.; Kinnunen, P. K. J. Oxidized Phosphatidylcholines in Membrane-Level Cellular Signaling: From Biophysics to Physiology and Molecular Pathology. *FEBS Journal*. June 2013, pp 2806–2816. <https://doi.org/10.1111/febs.12247>.

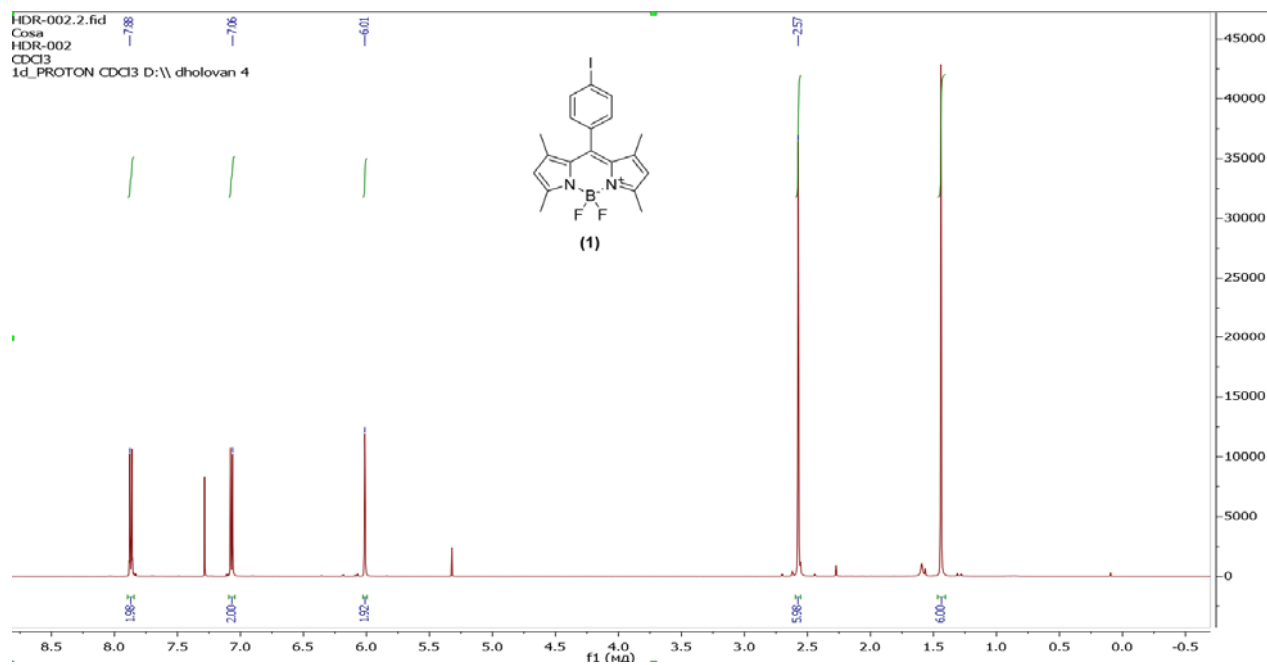
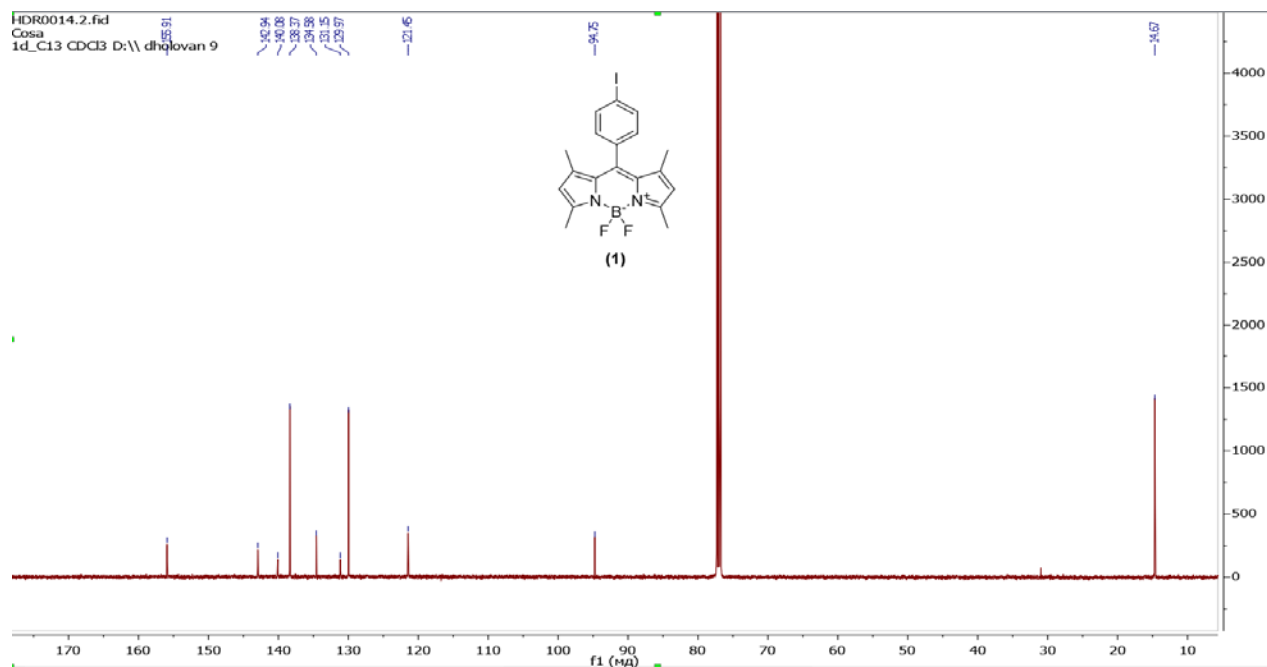
- [9] Agmon, E.; Solon, J.; Bassereau, P.; Stockwell, B. R. Modeling the Effects of Lipid Peroxidation during Ferroptosis on Membrane Properties. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 5155. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23408-0>.
- [10] Porter, N. A. A Perspective on Free Radical Autoxidation: The Physical Organic Chemistry of Polyunsaturated Fatty Acid and Sterol Peroxidation. *Journal of Organic Chemistry*. April 19, 2013, pp 3511–3524. <https://doi.org/10.1021/jo4001433>.
- [11] Karászi, É.; Jakab, K.; Homolya, L.; Szakács, G.; Holló, Z.; Telek, B.; Kiss, A.; Rejtő, L.; Nahajevszky, S.; Sarkadi, B.; Kappelmayer, J. Calcein Assay for Multidrug Resistance Reliably Predicts Therapy Response and Survival Rate in Acute Myeloid Leukaemia. *Br J Haematol* **2001**, *112* (2), 308–314. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2001.02554.x>.
- [12] Ai, L.; Wang, J.; Li, T.; Zhao, C.; Tang, Y.; Wang, W.; Zhao, S.; Jiang, W.; Di, Y.; Fei, X.; Luo, H.; Li, H.; Luo, W.; Yu, Y.; Lin, W.; He, R.; Tong, Z. A Rapid and Sensitive Fluorescence Method for Detecting Urine Formaldehyde in Patients with Alzheimer's Disease. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine* **2019**, *56* (2), 210–218. <https://doi.org/10.1177/0004563218812986>.
- [13] Greene, L. E.; Lincoln, R.; Cosa, G. Rate of Lipid Peroxyl Radical Production during Cellular Homeostasis Unraveled via Fluorescence Imaging. *J Am Chem Soc* **2017**, *139* (44), 15801–15811. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b08036>.
- [14] Demchenko, A. P. Basic Principles of Fluorescence. In *Introduction to Fluorescence Sensing*; Springer International Publishing: Cham, 2015; pp 1–37. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20780-3_1.
- [15] Wang, L.; Li, B.; Jiang, C.; Sun, R.; Hu, P.; Chen, S.; Wu, W. A BODIPY Based Fluorescent Probe for the Rapid Detection of Hypochlorite. *J Fluoresc* **2018**, *28* (4), 933–941. <https://doi.org/10.1007/s10895-018-2255-y>.

- [16] Tang, Y.; Kong, X.; Xu, A.; Dong, B.; Lin, W. Development of a Two-Photon Fluorescent Probe for Imaging of Endogenous Formaldehyde in Living Tissues. *Angewandte Chemie* **2016**, *128* (10), 3417–3420. <https://doi.org/10.1002/ange.201510373>.
- [17] Liu, X.; Li, N.; Li, M.; Chen, H.; Zhang, N.; Wang, Y.; Zheng, K. Recent Progress in Fluorescent Probes for Detection of Carbonyl Species: Formaldehyde, Carbon Monoxide and Phosgene. *Coord Chem Rev* **2020**, *404*, 213109. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.213109>.
- [18] Jiang, K.; Zhou, P.; Zheng, J.; Huang, C.; Hu, J.; Guo, H.; Ou, J.; Ou, S. Design of a Naphthalimide-Based Probe for Acrolein Detection in Foods and Cells. *J Hazard Mater* **2022**, *426*, 128118. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.128118>.
- [19] Loudet, A.; Burgess, K. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. *Chem Rev* **2007**, *107* (11), 4891–4932. <https://doi.org/10.1021/cr078381n>.
- [20] NAGANO, T. Development of Fluorescent Probes for Bioimaging Applications. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* **2010**, *86* (8), 837–847. <https://doi.org/10.2183/pjab.86.837>.
- [21] Song, H.; Rajendiran, S.; Kim, N.; Jeong, S. K.; Koo, E.; Park, G.; Thangadurai, T. D.; Yoon, S. A Tailor Designed Fluorescent ‘Turn-on’ Sensor of Formaldehyde Based on the BODIPY Motif. *Tetrahedron Lett* **2012**, *53* (37), 4913–4916. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.06.117>.
- [22] Chen, H.-W.; Li, H.; Song, Q.-H. BODIPY-Substituted Hydrazine as a Fluorescent Probe for Rapid and Sensitive Detection of Formaldehyde in Aqueous Solutions and in Live Cells. *ACS Omega* **2018**, *3* (12), 18189–18195. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02590>.

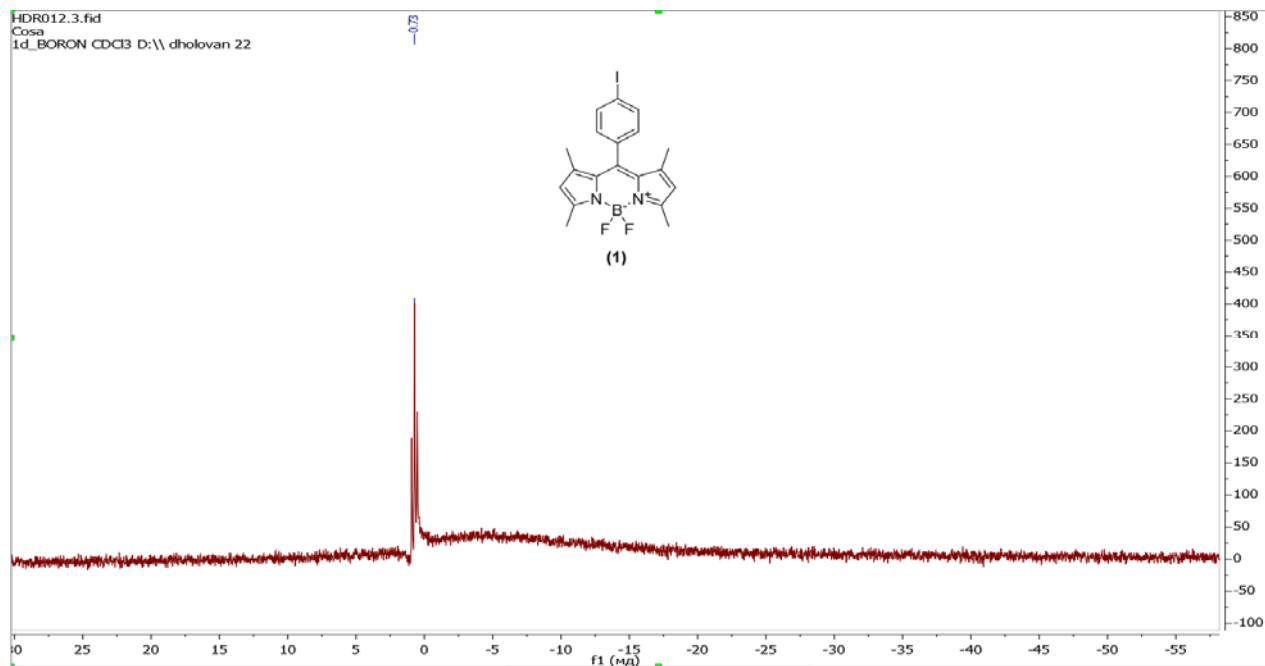
- [23] Tang, Y.; Ma, Y.; Xu, A.; Xu, G.; Lin, W. A Turn-on Fluorescent Probe for Endogenous Formaldehyde in the Endoplasmic Reticulum of Living Cells. *Methods Appl Fluoresc* **2017**, *5* (2). <https://doi.org/10.1088/2050-6120/aa6773>.
- [24] Gotor, R.; Gaviña, P.; Ochando, L. E.; Chulvi, K.; Lorente, A.; Martínez-Máñez, R.; Costero, A. M. BODIPY Dyes Functionalized with 2-(2-Dimethylaminophenyl)Ethanol Moieties as Selective OFF–ON Fluorescent Chemodosimeters for the Nerve Agent Mimics DCNP and DFP. *RSC Adv.* **2014**, *4* (31), 15975–15982. <https://doi.org/10.1039/C4RA00710G>.
- [25] Togashi, M.; Terai, T.; Kojima, H.; Hanaoka, K.; Igarashi, K.; Hirata, Y.; Urano, Y.; Nagano, T. Practical Fluorescence Detection of Acrolein in Human Plasma via a Two-Step Tethering Approach. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (95), 14946–14948. <https://doi.org/10.1039/C4CC02578D>.
- [26] Joseph R Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Lakowicz, J. R., Ed.; Springer US: Boston, MA, 2006. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.
- [27] Furche, F.; Rappoport, D. Density Functional Methods for Excited States: Equilibrium Structure and Electronic Spectra; 2005; pp 93–128. [https://doi.org/10.1016/S1380-7323\(05\)80020-2](https://doi.org/10.1016/S1380-7323(05)80020-2).
- [28] Lathey, D. C. Fluorescence Prediction through Computational Chemistry, Marshall University, 2005.
- [29] Slater, J. C. Atomic Shielding Constants. *Physical Review* **1930**, *36* (1), 57–64. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.36.57>.
- [30] Amat, A.; Miliani, C.; Romani, A.; Fantacci, S. DFT/TDDFT Investigation on the UV-Vis Absorption and Fluorescence Properties of Alizarin Dye. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2015**, *17* (9), 6374–6382. <https://doi.org/10.1039/C4CP04728A>.

- [31] Guido, C. A.; Knecht, S.; Kongsted, J.; Mennucci, B. Benchmarking Time-Dependent Density Functional Theory for Excited State Geometries of Organic Molecules in Gas-Phase and in Solution. *J Chem Theory Comput* **2013**, *9* (5), 2209–2220. <https://doi.org/10.1021/ct400021c>.
- [32] Wang, E.; Qiao, H.; Zhou, Y.; Pang, L.; Yu, F.; Zhang, J.; Ma, T. A Novel “Turn-on” Fluorogenic Probe for Sensing Hypochlorous Acid Based on BODIPY. *RSC Adv* **2015**, *5* (89), 73040–73045. <https://doi.org/10.1039/C5RA14118D>.
- [33] Telitel, S.; Blanchard, N.; Schweizer, S.; Morlet-Savary, F.; Graff, B.; Fouassier, J.-P.; Lalevée, J. BODIPY Derivatives and Boranil as New Photoinitiating Systems of Cationic Polymerization Exhibiting a Tunable Absorption in the 400–600 Nm Spectral Range. *Polymer (Guildf)* **2013**, *54* (8), 2071–2076. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2013.02.013>.
- [34] Röhr, H.; Trieflinger, C.; Rurack, K.; Daub, J. Proton- and Redox-Controlled Switching of Photo- and Electrochemiluminescence in Thiophenyl-Substituted

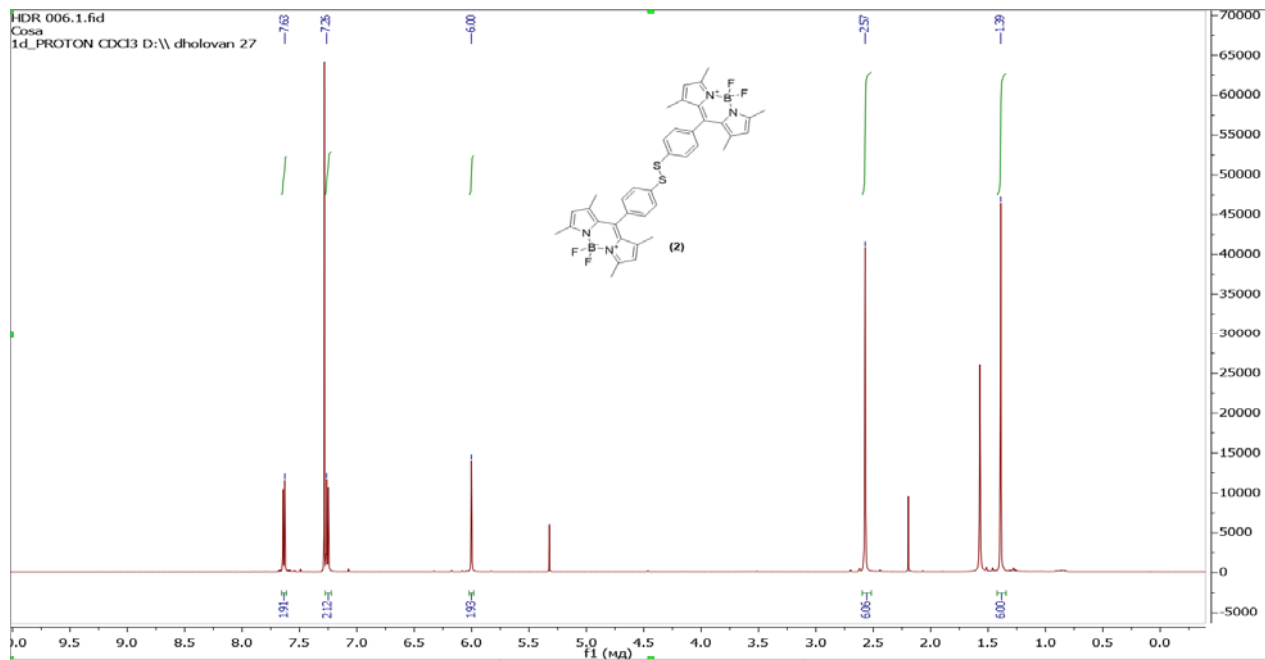
Додатки

 ^1H NMR of (1) ^{13}C NMR of (1)

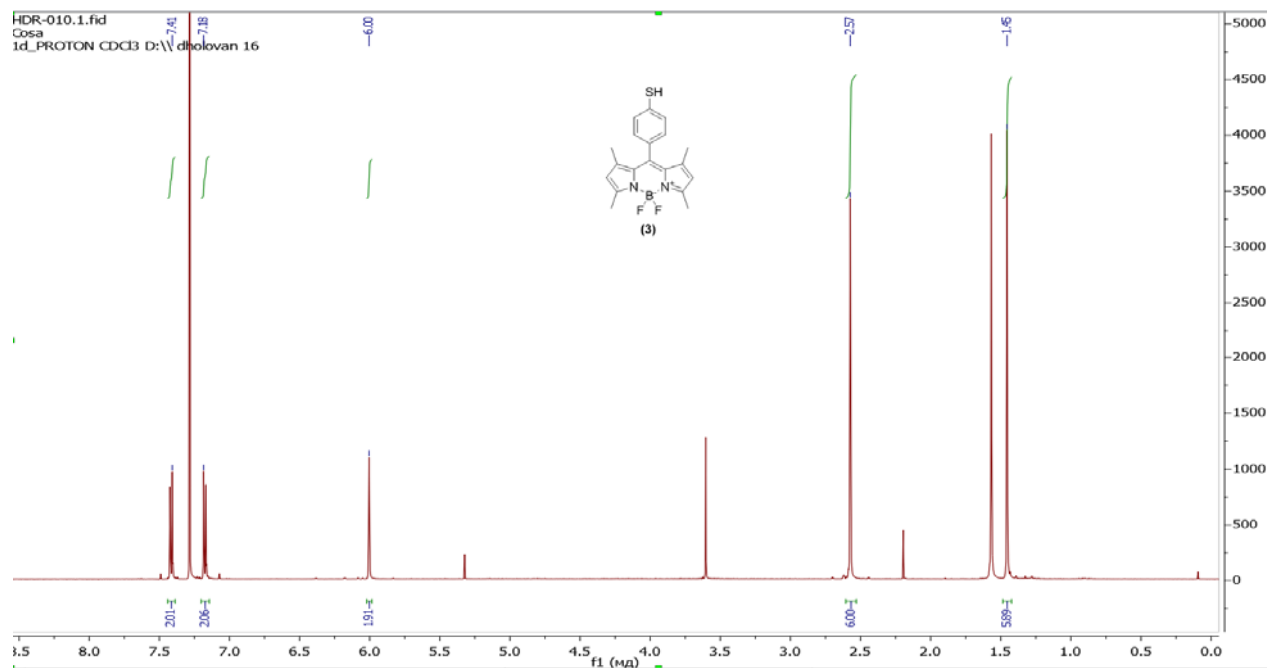
^{19}F NMR of (1)



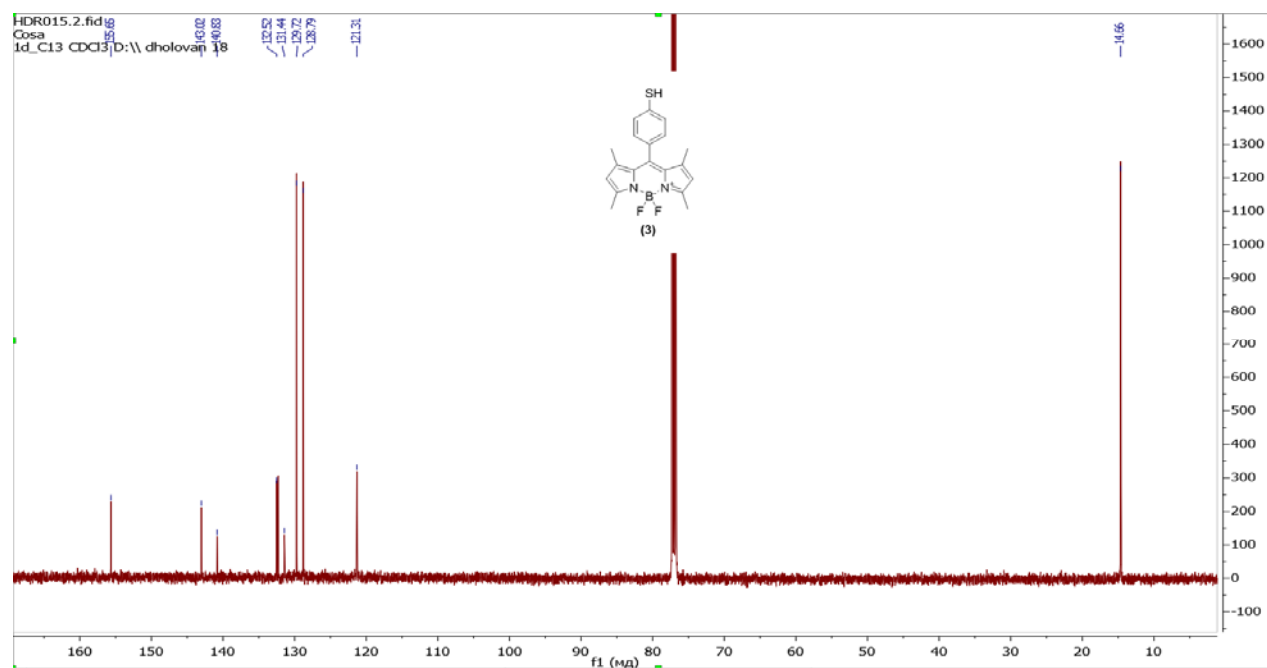
^1H NMR of (2)



^1H NMR of (3)



^{13}C NMR of (3)



^{19}F NMR of (3)