

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

БУГЕРА Олександра Ігорівна



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

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

02.00.03 – органічна хімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата хімічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі органічної хімії хімічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України.

Науковий керівник: доктор хімічних наук, професор
Пивоваренко Василь Георгійович,
Київський національний університет
імені Тараса Шевченка МОН України,
професор кафедри органічної хімії.

Офіційні опоненти: доктор хімічних наук, професор
Дорошенко Андрій Олегович
Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна,
завідувач кафедри органічної хімії;

доктор хімічних наук, професор
Ковтун Юрій Петрович
Інститут органічної хімії НАН України, м. Київ,
старший науковий співробітник відділу кольору і будови.

Захист дисертаційної роботи відбудеться «11» грудня 2018 р. о 14.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.25 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 01601, м. Київ, вул. Льва Толстого, 12, хімічний факультет, ауд. 518.

З дисертацією можна ознайомитися в науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 58, зал №12.

Автореферат розісланий «26» жовтня 2018 року.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради, д.х.н.



Л.О. Вретік

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Аденозин 5'-трифосфат (АТФ) є важливою та багатофункціональною складовою усіх організмів. У клітині він продукується кількома шляхами, головним з яких є окисне фосфорилування в мітохондріях еукаріот. Це не лише основна енергетична валюта у більшості клітинних процесів, наприклад, у діленні клітин, скороченні м'язів, мембранному транспорті та біосинтетичних реакціях. Він є також учасником сигнальних процесів, зокрема - фосфорилування білків та утворення циклічного аденозин монофосфату (цАМФ). Зменшення концентрації АТФ викликає аномальні реакції та має відношення до патогенезу у багатьох захворюваннях, таких як гіпоглікемія, ішемія та хвороба Паркінсона. 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. Зміна концентрації АТФ грає вирішальну роль у багатьох фізіологічних процесах. Співвідношення АТФ:АДФ вказує на життєздатність клітин, апоптоз та некроз, тоді як співвідношення АТФ:АМФ регулює активність ферментів у гомеостазі АТФ. 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 його участі.

Значне число методів було розроблено для визначення усередненого рівня АТФ клітинних лізатів. Найпоширеніший метод аналізу базується на АТФ - залежній люциферин - люциферазній реакції, 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), капілярний електрофорез (КЕ) та спектроскопію 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, цитотоксичність або погану сумісність з живими клітинами. Біоломінесцентний 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

раціометричного 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 афінітету, селективності та меж детекції АТФ для синтезованих сполук.

Завдання дослідження:

1. Встановити взаємозв'язок структура – ефективність у визначенні АТФ для серії синтезованих флуоресцентних барвників класів 3-гідроксифлавонів, бісфлавонолів та 3-гідроксихінолонів. Синтезувати катіонні та цвіттер-іонні похідні 3-гідроксифлавонолу з метою збільшення афінітету 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 афінітету та селективності до АТФ. Дослідити їх флуоресцентні властивості при зв'язуванні з АТФ та іншими нуклеозидфосфатами.
3. Синтезувати флуоресцентні молекулярні пінцети та дослідити їх афінітет 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. Встановлено, що 30 із досліджених тридцяти трьох флавонолів, біс-флавонолів, 3-гідроксихромонів та 3-

гідроксихінолонів можуть служити зондами АТФ у водних розчинах, у тому числі – при нейтральних значеннях рН, у межах фізіологічних концентрацій АТФ та Mg^{2+} у 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 афінитет 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. Вказані 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-діазатридекан-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-ацетиламідобутану, 1,4-біс-[2-(4-(диметиламіно)феніл)-3-гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-6-ілокси]ацетиламідобутану, 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. Матеріали роботи обговорювалися 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 на наукових конференціях.

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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність роботи, сформульовано мету та задачі досліджень, охарактеризовані наукова новизна та практична цінність роботи.

У **першому розділі «Огляд літератури»** систематизовано дані літератури та зосереджено увагу на флуоресцентних зондах для детекції АТФ. Серед проаналізованих показників показано, що малі органічні люмінесцентні хемосенсиори мають переваги - високу продуктивність та швидку 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, а інші не можуть дати чіткий сигнал, або селективність не є ідеальною. 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.

У другому розділі «Скринінг хромонів та хінолонів для вимірювання концентрації аденозинтрифосфату в широкому діапазоні» вивчено взаємозв'язок структура-ефективність у визначенні АТФ для серії 33 флуоресцентних барвників класів 3-гідроксифлавонів, бісфлавонолів та 3-гідроксихінолонів. 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 проаналізовано їх флуоресцентну відповідь та чутливість до АТФ, концентраційний діапазон детекції АТФ та стехіометричні характеристики комплексів. 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 $3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$.

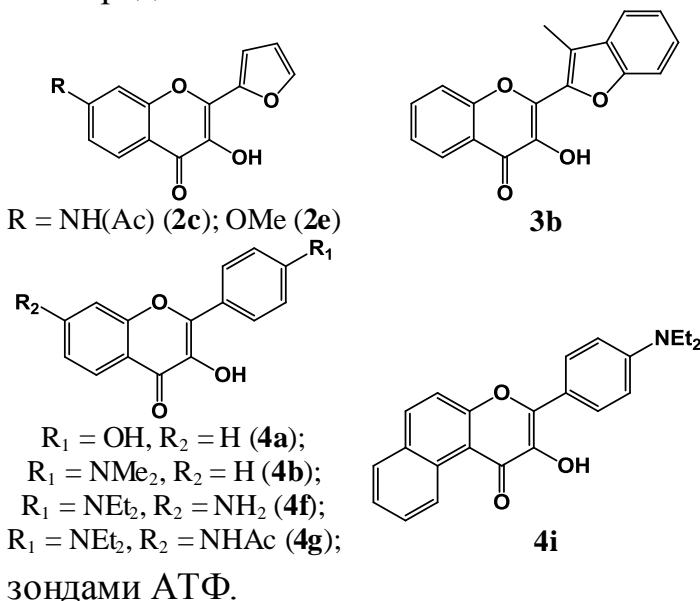
Барвник	Концентрація ($\times 10^{-6} \text{ M}$)	K [a] (10^3 M^{-1})	λ_{abs} (нм)	λ_{fb} (нм)	ΔS (cm^{-1})
1a	2.5	2.7 ± 0.7	401	453	2860
2a	2.5	0.35 ± 0.1	410	464	2840
4a	2.5	0.90 ± 0.2	412	471	3130
4b	3.0	2.2 ± 0.4	448	557	4340
4e	3.0	0.30 ± 0.06	450	550	4040
4k	3.5	1.3 ± 0.4	437	593	5410

[a] Константи стійкості були отримані за допомогою апроксимації кривих титрування вивчених барвників з АТФ.

Таблиця 1. Константи стабільності K , положення максимумів поглинання та флуоресценції та Стоксів зсув комплексів декількох барвників з АТФ.

серій 1–6, окрім випадку комплексу з АТФ. Цей зсув було пояснено електрохромним ефектом зарядженої частини АТФ.

Послідовне утворення кількох типів комплексів зонд-АТФ розширює діапазон виявлення 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.

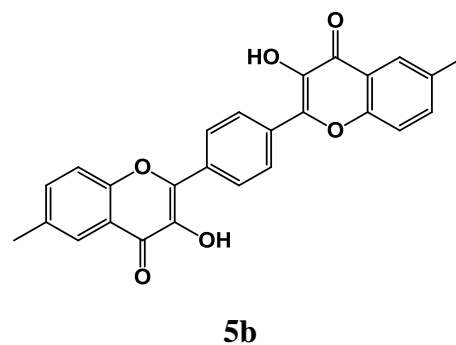


Крім того, амплітуда відповіді досліджених барвників у інтенсометричному та ратіометричному режимах настільки ж висока, як і у кращих із описаних зондів, а значний зсув поглинання комплексу барвник – АТФ у червону ділянку спектру дозволяє проводити його вибіркоче збудження у присутності вільного барвника. Таким чином встановлено, що більшість із досліджених барвників можуть бути

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 $40\text{--}70 \text{ нм}$ або $3000\text{--}6000 \text{ cm}^{-1}$). Такий сильний червоний зсув ніколи не спостерігався для вивчених барвників

Серед усіх барвників **2с, е, 3b, 4a, f, g, і** 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.

У третьому розділі «Дизайн та синтез флуоресцентних зондів на основі 3-гідрокси-флавону для визначення аденозин-5'-трифосфату» обговорюється синтез катіонних та цвіттер-іонних флуоресцентних сенсорів, модифікованих в положенні 4' амінофлавонолів, молекулярних пінцетів з довгим та коротким лінкером.



Синтез катіонних та цвіттер-іонних флуоресцентних сенсорів

3-Гідроксифлавоноли **5-7** було одержано за класичною схемою: конденсація альдегіду **3** з 2-гідроксиацетофеноном з наступною окисною гетероциклізацією за Алгаром – Фліном – Оямадою. Для інсталяції катіонної або цвіттеріонної групи на останній стадії було проведено алкілювання аміногрупи сполуки **5** метилйодидом або пропансульфоном.

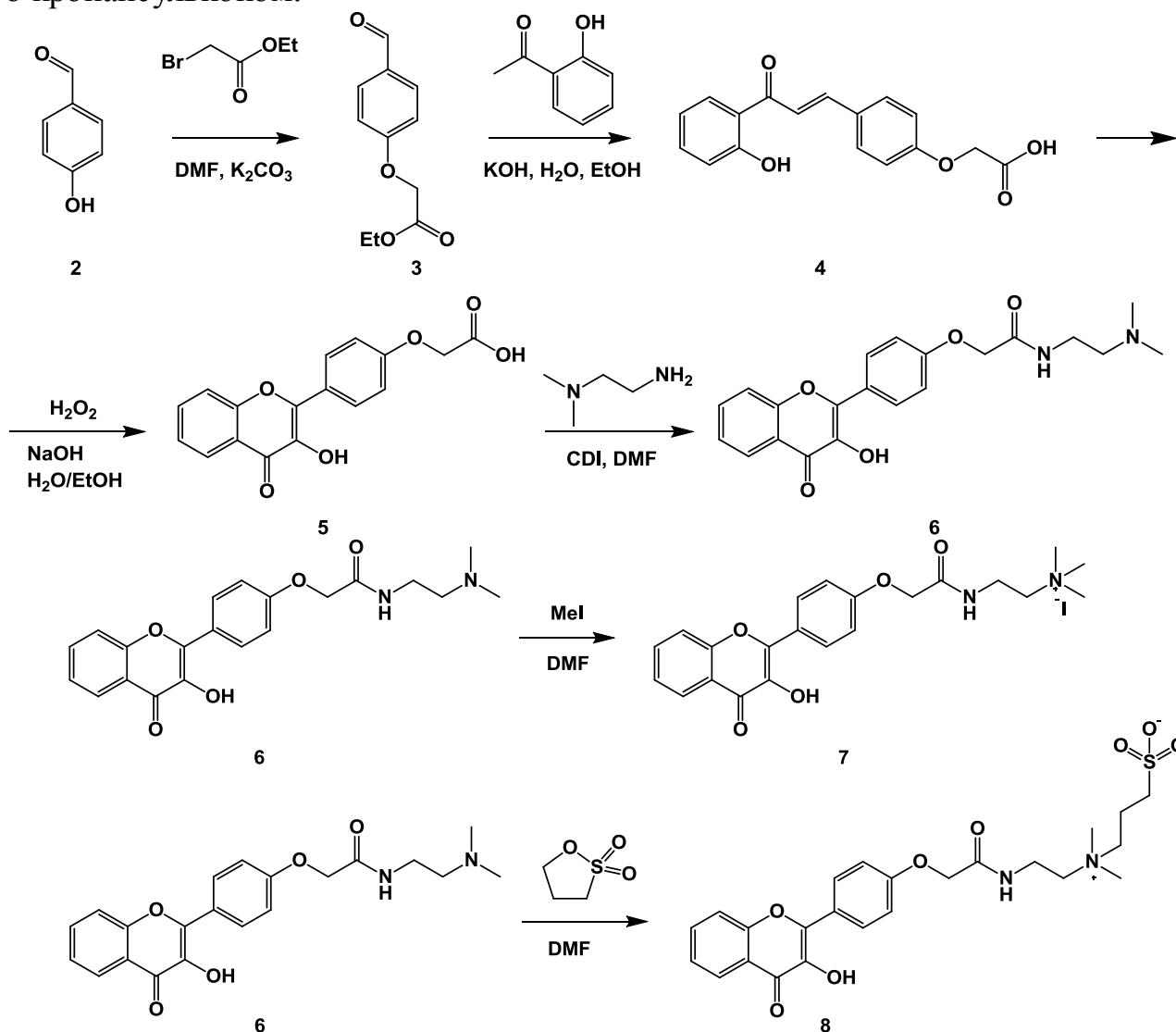


Схема 1. Синтез катіонних та цвіттер-іонних флуоресцентних сенсорів **5-8**.

Модифіковані в положенні 4' амінофлавоноли

Було розроблено стратегію та синтезовано ряд сполук, структура яких дозволяє збільшити кількість міжмолекулярних взаємодій, а саме стекінгу (сполуки **18** та **21**, схема 3), водневих зв'язків (сполуки **13** та **18**, схема 2 та 3 відповідно) та іон-дипольних взаємодій (сполуки **16** та **21**, схема 2 та 3 відповідно).

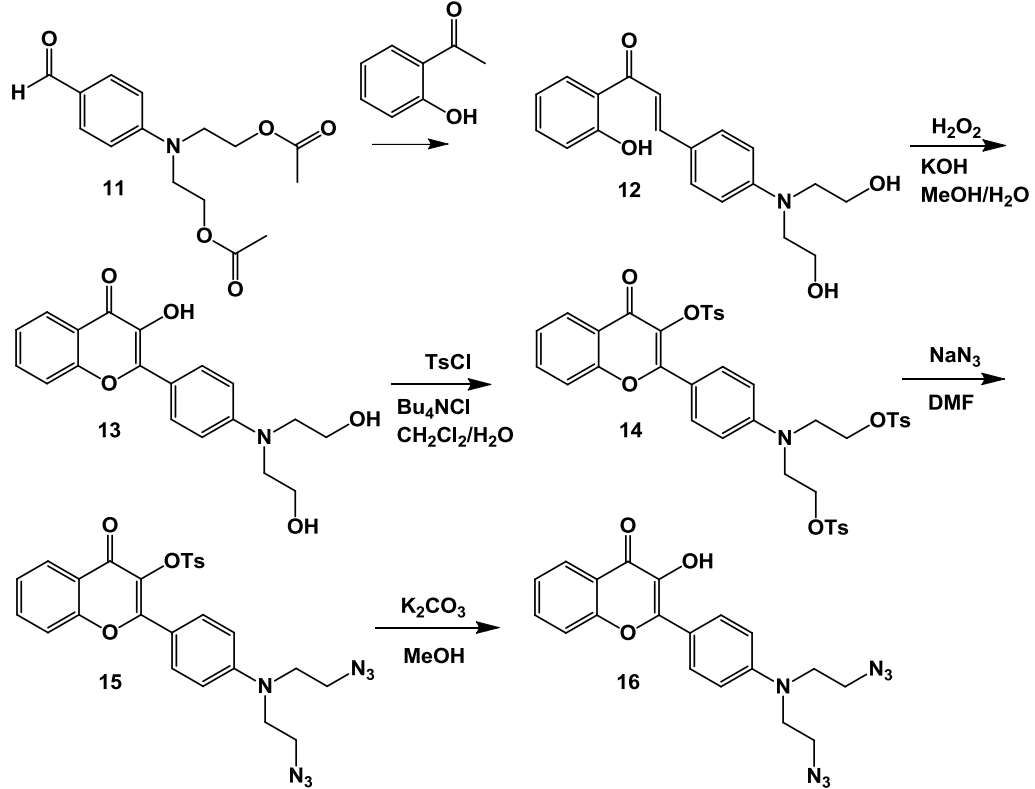


Схема 2. Синтез модифікованих в положенні 4' амінофлавонолів **13-16**.

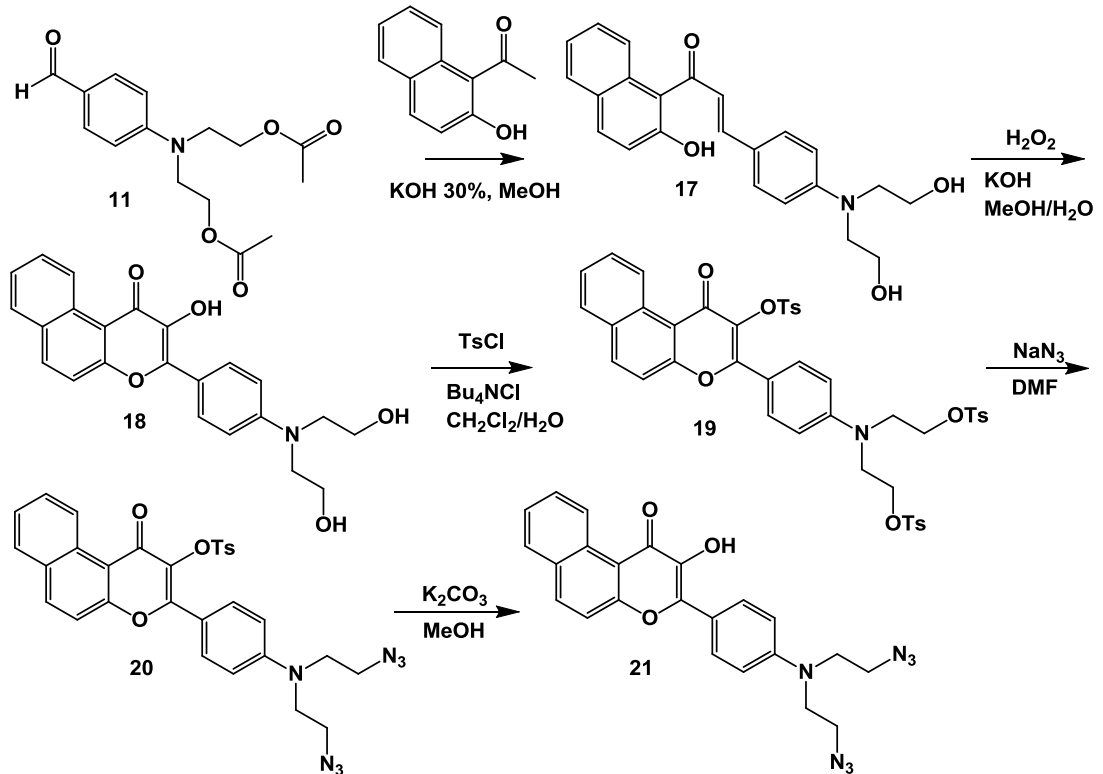


Схема 3. Синтез модифікованих в положенні 4' амінофлавонолів **18-21**.

Синтез молекулярних пінцетів з довгим лінкером

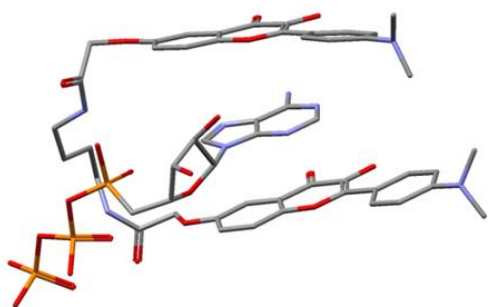


Рис. 1. ММ+ модель просторової будови комплексу пінцет – АТФ (атоми Гідрогену не вказані).

З метою покращення параметрів флуоресцентної відповіді зондів на АТФ, зокрема збільшення афінитету та селективності зв'язування, було запропоновано молекулярні пінцети, що складаються з двох флавонольних фрагментів, з'єднаних активним лінкером. NH-амідні 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. 1). Ключовою стадією синтезу даних сполук є утворення флавонольної частини, яка надалі слугує активним елементом АТФ-рецептора типу пінцет. Пінцет **30** синтезували за схемою 4. Синтезований діалкіламінобензальдегід **24b** конденсували з 2-гідроксиацетофеноном і окиснювальною циклізацією отриманий халкон перетворювали у флавонол **27**. При використанні CDI, у диметилацетаміді при 100°C було синтезовано пінцет **30**.

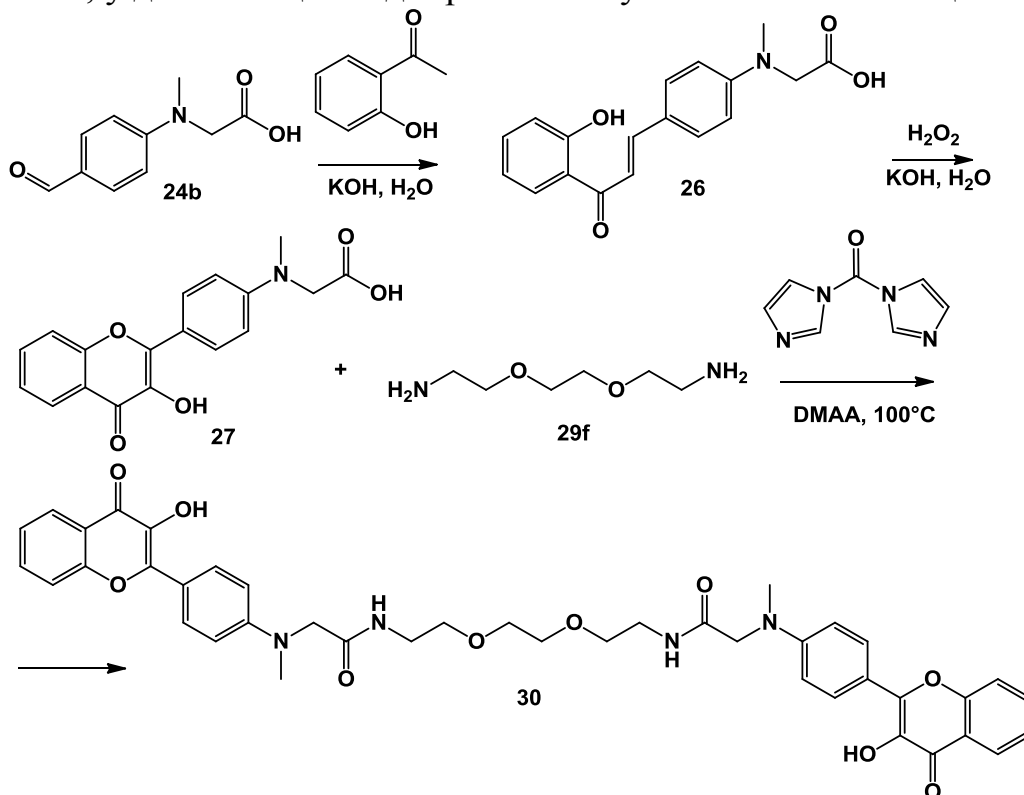


Схема 4. Синтез молекулярного пінцету **30**.

Синтез молекулярного пінцету **35** складався з чотирьох послідовних стадій (схема 5).

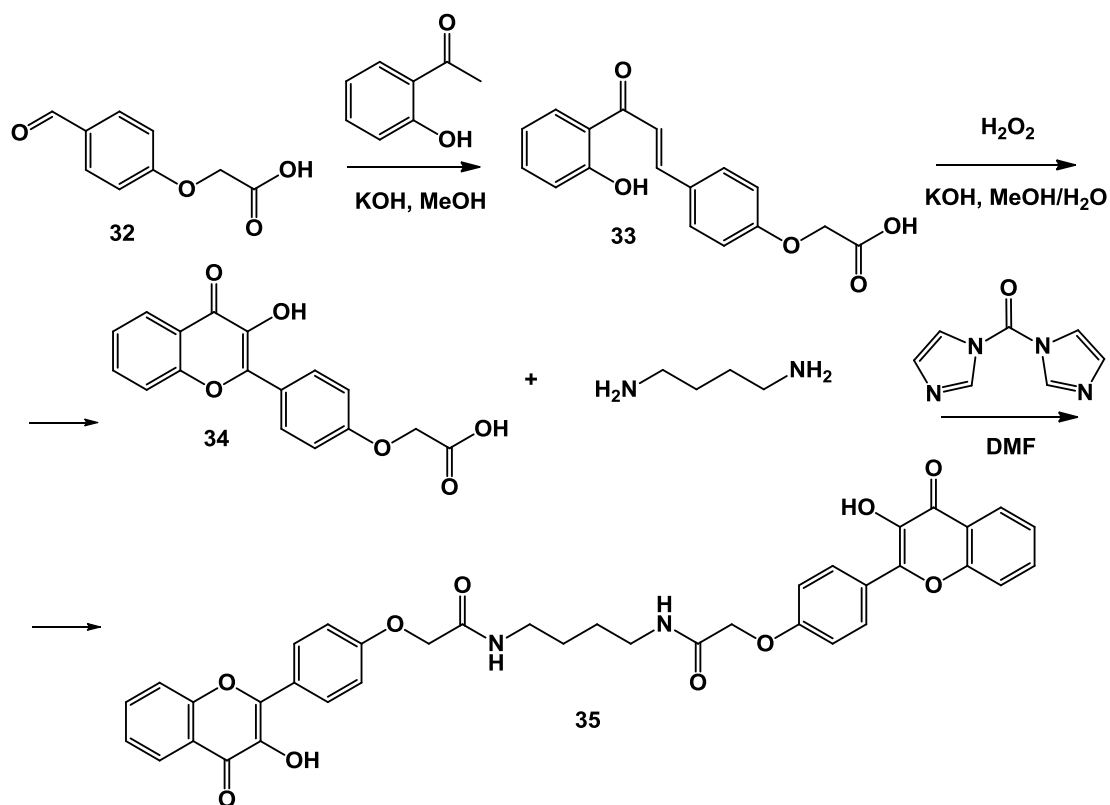


Схема 5. Синтез молекулярного пінцету **35**.

Синтез пінцету **40** проводили з використанням тієї ж чотирьохстадійної схеми (схема 6). Конденсацію отриманого ацетофенону з 4-диметиламінобензалдегідом не вдалося провести за класичною методикою синтезу халконів.

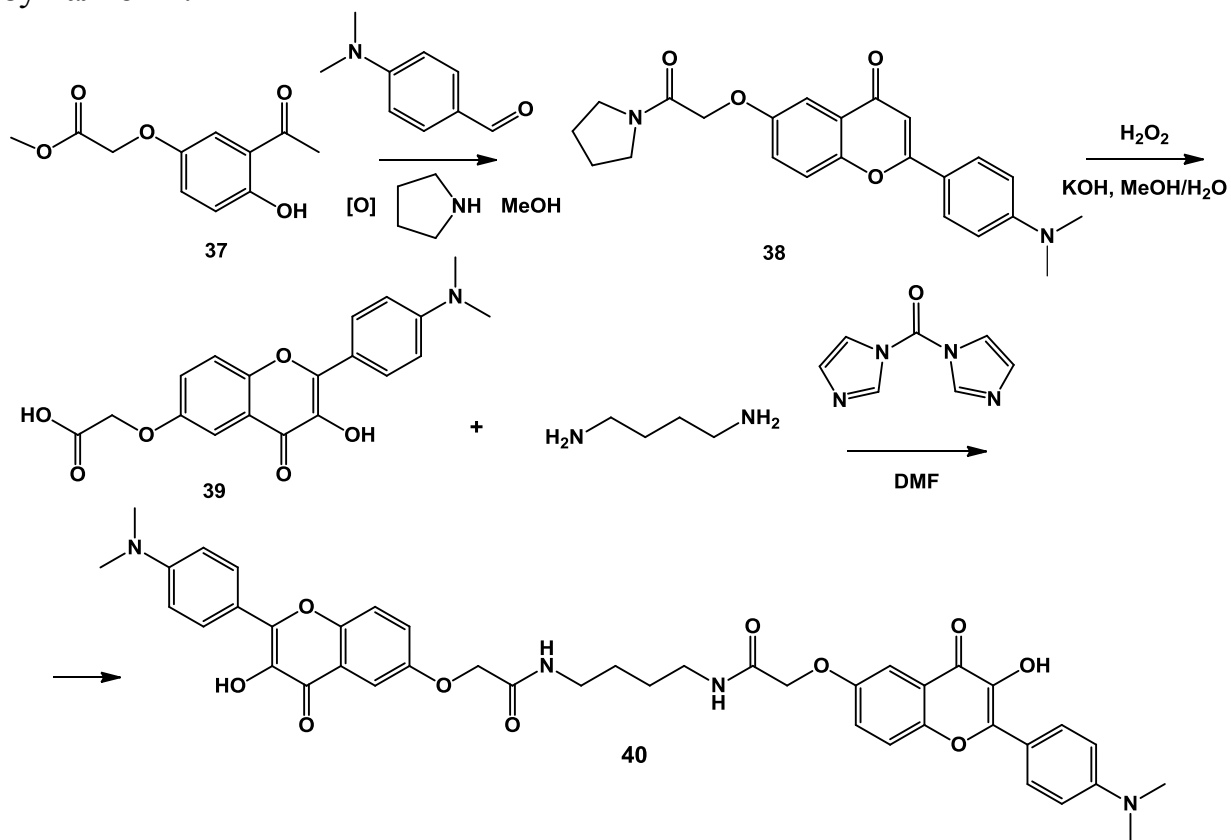


Схема 6. Синтез молекулярного пінцету **40**.

Тому була застосована методика, в якій замість неорганічної основи застосовували органічну, а саме – піролідин. Утворення флавонолу **38** відбулося з досить високим виходом (84%) у порівнянні з класичними умовами. Наступною стадією став гідроліз амідного зв'язку з утворенням цільового флавонолу **39**.

Ацилювання діамінобутану, проводилося в умовах, що були підібрані для пінцету **35**. Характерною особливістю проведення цієї взаємодії був значний (5:1) надлишок більшого за молекулярною масою реагенту (флавонолу **39**) у порівнянні з низькомолекулярним діаміном.

Синтез молекулярних пінцетів з коротким лінкером

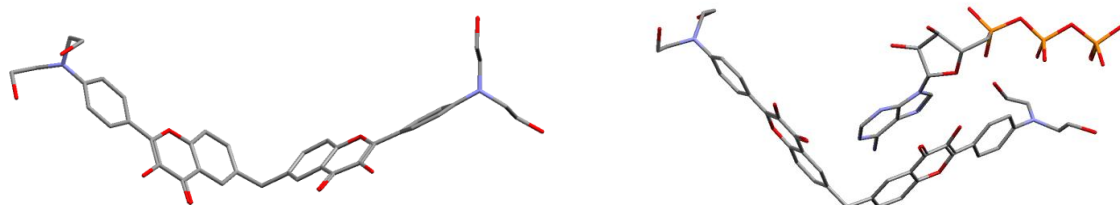


Рис. 2. MM+ моделі просторової будови пінцету **44** (а) та його комплексу з АТФ (б) (атоми Гідрогену не вказані).

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 (Рис. 2). Були розроблені ретросинтетичні схеми синтезу молекулярних пінцетів **44** та **48** на основі 3-гідроксифлавонолу.

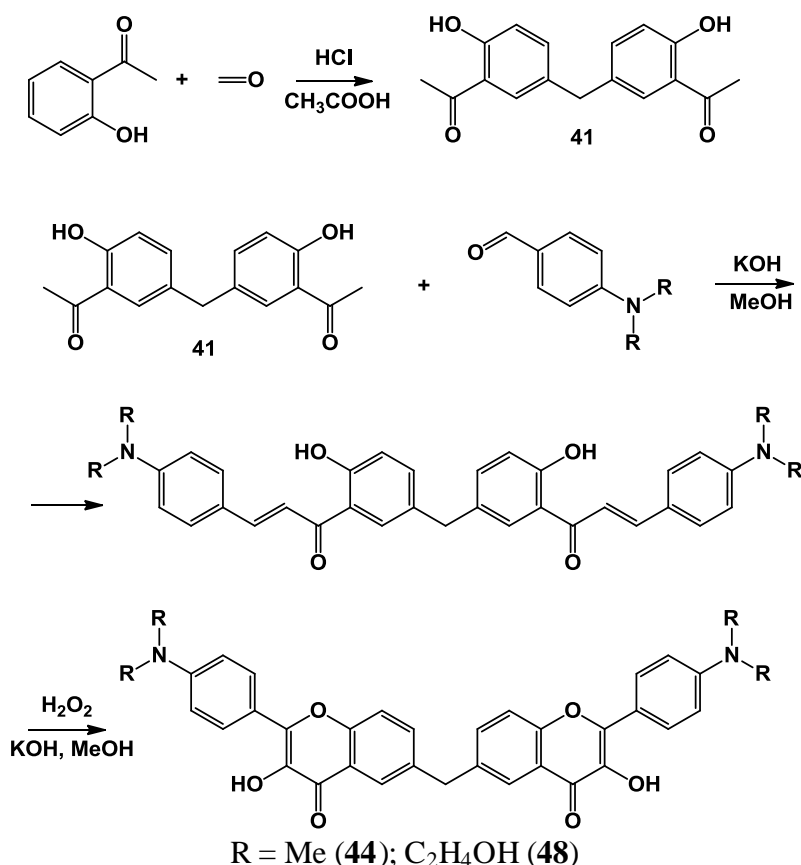


Схема 7. Синтез молекулярних пінцетів **44** та **48**.

Ключовою стадією у синтезі цільових сполук є одержання біс-(3-ацетил-4-гідроксифеніл)метану **41** (схема 7). Отримані зразки було очищено за допомогою методу ВЕРХ. Виходи цільових сполук **44** та **48** складали 26% та 62% відповідно.

У четвертому розділі, «Електрофлуорохромний вплив аніона АТФ на флуоресценцію катіонних та цвіттер-іонних флавонолів» досліджено електро-статичний вплив замісників у 4' положенні флавонолу на міцність комплексу флавонол – АТФ.

У спектрах поглинання, на відміну від барвника **1**, заряджені похідні **6–8** у присутності АТФ демонструють незначне (5–10%) збільшення поглинання замість гіпохромного ефекту. 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**.

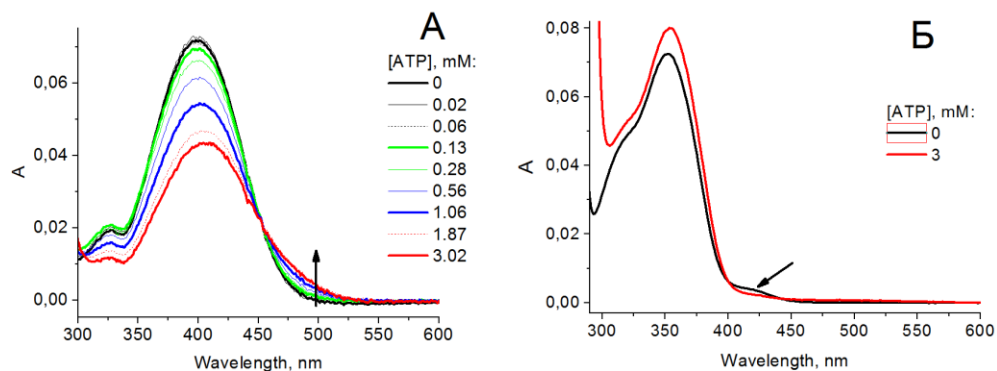


Рис. 3. Зміни у спектрах поглинання барвника **1** при збільшенні концентрації АТФ (А), $\lambda_{em} = 558$ нм. Спектри поглинання барвників **6** (Б) у відсутності та присутності АТФ.

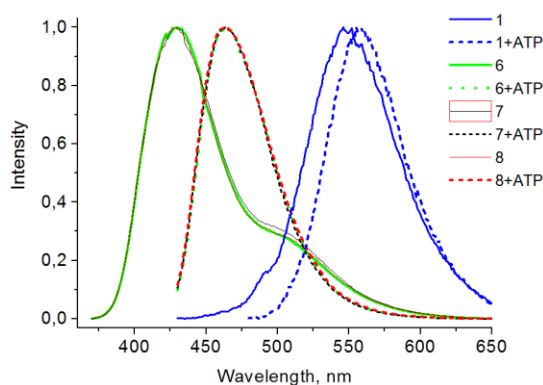


Рис. 4. Нормалізовані спектри емісії вивчених барвників у відсутності (суцільні лінії) і у присутності АТФ (пунктирні лінії). Спектри вільних барвників: $\lambda_{ex} = 420$ нм (**1**) та 355 нм (інші барвники). Для комплексів АТФ: $\lambda_{ex} = 462$ нм (**1**) 400 нм (**6, 7**) і 405 нм (**8**). $C_{ATP} = 3$ мМ.

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**. У спектрах флуоресценції барвника **1** максимум знаходиться при 550 нм, а для барвників **6–8** – при 430 нм (Рис. 4). Флуоресценція таутомерної форми може бути зафіксована для барвників **6–8** як плече при 510 нм. Цікаво, що спектри флуоресценції барвників **6–8** добре співпадають за формою та положенням у спектрі як за відсутності, так і в присутності АТФ.

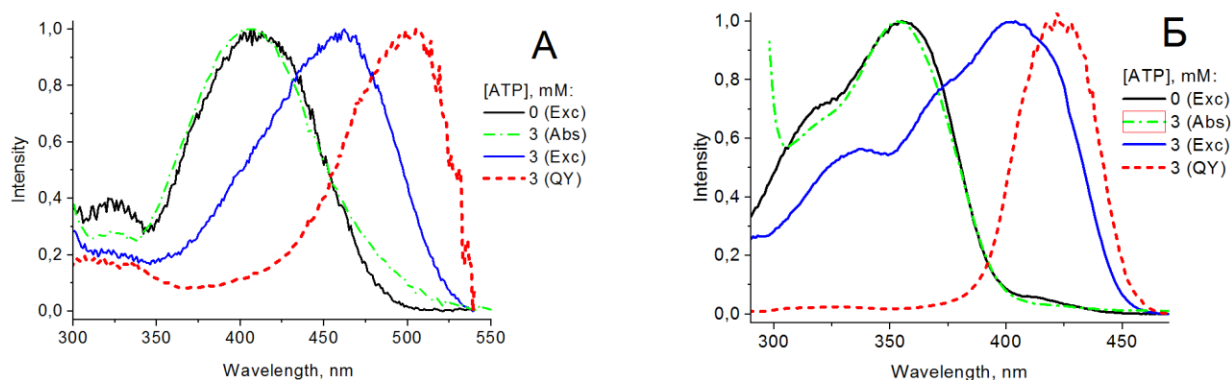


Рис. 5. Нормалізовані спектри збудження досліджуваних барвників у відсутності (чорні суцільні лінії) і у присутності АТФ (сині суцільні лінії): барвник **1** (А), **6** (Б). Для порівняння представлені спектри поглинання в присутності АТФ (штрих-пунктир). Червоний штрих: нормовані криві залежності відносного квантового виходу від довжини хвилі збудження $\phi_R = f(\lambda_{ex})$.

Для вивчення виявленого спектрального ефекту було отримано спектри збудження флуоресценції барвників. Їх реєстрацію проводили на максимумі смуги емісії комплексу АТФ. 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.

Така різниця є додатковим доказом структурної неоднорідності утворених АТФ-комплексів та показує, що окрема їх популяція має набагато вищий квантовий вихід флуоресценції, ніж інші. На основі даних спектрів збудження та поглинання барвників у присутності АТФ ми розрахували для них функцію $\varphi_R = f(\lambda_{ex})$. Отримані залежності демонструють значне збільшення квантового виходу φ_R при переході від точки максимуму поглинання комплексу барвник-АТФ до червоного краю його спектра збудження. Амплітуда квантового виходу збільшується 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.

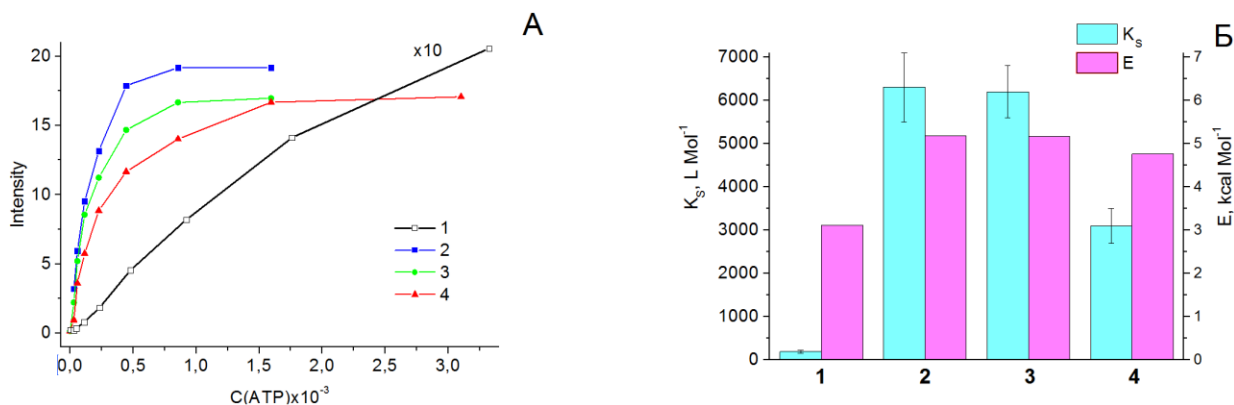


Рис. 6. Залежність інтенсивності флуоресценції барвників **1** та **6–8** від концентрації АТФ (А).

Ефективні константи стійкості та енергії зв'язку, розраховані для їх комплексів з АТФ (Б). $\lambda_{ex} = 462$ нм (барвник **1**), 400 нм (барвники **6** і **7**) і 405 нм (барвник **8**). $\lambda_{em} = 558$ 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**) $\cdot 10^{-6}$ моль \cdot л⁻¹.

Обчислили ефективні константи стійкості комплексів барвник -АТФ у наближенні, що утворені комплекси мають стехіометрію 1:1. Згідно з отриманими результатами для заряджених барвників **6–8** константи стійкості лежать в діапазоні $3,1 - 6,3 \cdot 10^3$ л \cdot моль⁻¹, тоді як константа стійкості для нейтрального флавонолу **1** має на один порядок нижче значення $1,9 \cdot 10^2$ л \cdot моль⁻¹. Найбільш стійкі комплекси утворюють катіонні барвники **6** і **7**. Таким чином, катіонний заряд в положенні 4' флавонолу значно підвищує стійкість комплексу.

У п'ятому розділі «Підвищення афінитету та зміна селективності флуоресцентних сенсорів АТФ шляхом хімічної модифікації їх будови» викладено результати дослідження ефектів взаємодії синтезованих 4'-амінофлавонолів з АТФ, та з аніонами близької структури: АДФ, АМФ та ГТФ.

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. Зміна амплітуди інтенсивності флуоресценції є кращою для сполук з вільною 3-ОН групою, що свідчить про їх перспективність у зондуванні концентрації АТФ у розчинах. 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.

Побудувавши графік в координатах частка зв'язаного флавонолу (f_r) – $\log[АТР]$ було визначено константу дисоціації комплексу. Отримані дані свідчать, що сполука **13** з двома додатковими гідроксигрупами має у кілька разів кращий афінитет до АТФ, ніж інші сполуки. Це підтверджує ідею щодо утворення водневих зв'язків з АТФ гідроксигрупами замісника у положенні 4' флавонолу.

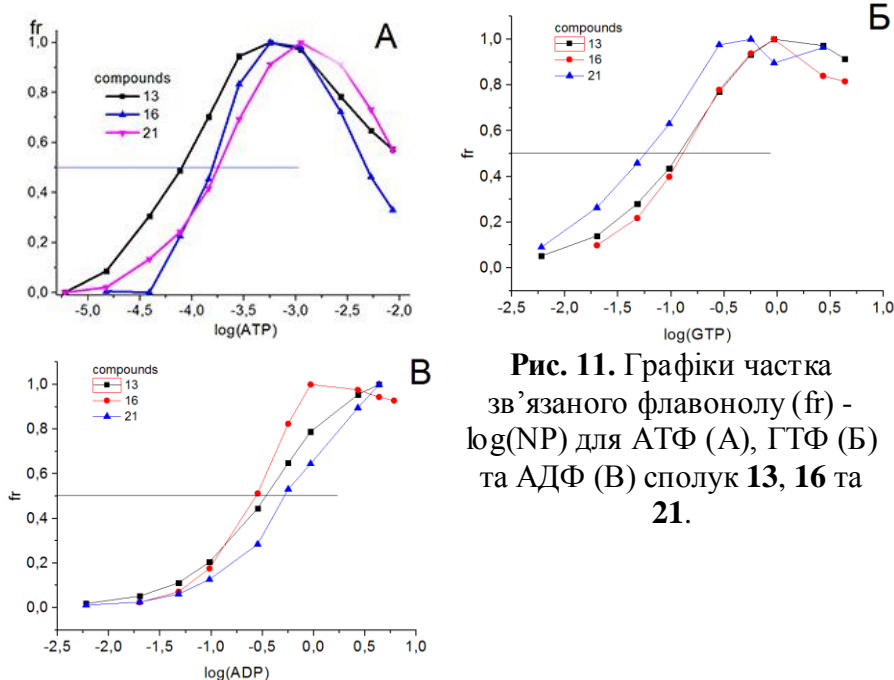


Рис. 11. Графіки частка зв'язаного флавонолу (f_r) – $\log(NP)$ для АТФ (А), ГТФ (Б) та АДФ (В) сполук **13**, **16** та **21**.

Для дослідження селективності взаємодії флавонолів з АТФ були проведені титрування сполук **13**, **16** і **21** з ГТФ, АДФ та АМФ. Для визначення селективності взаємодії похідних 3-гідроксифлавонів з нуклеозидфосфатами, були розраховані константи дисоціації комплексу досліджуваних сполук з АТФ, АДФ і ГТФ за графіками залежності (f_r) – $\log[АТР]$ (Таблиця 2).

Отримані дані свідчать, що сполука **13** має найвищий афінитет до АТФ, а сполука **21** – до ГТФ. Комплекси з АДФ для цих сполук є менш міцними, як з АТФ та ГТФ.

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

Таблиця 2. Константи дисоціації комплексів флавонолів з нуклеозидфосфатами.

У шостому розділі «Молекулярний пінцет для визначення концентрації АТФ у розчинах на основі флавонолу» досліджено взаємодію пінцету **30** з АТФ у порівнянні з FME зондом. Значні відмінності у флуоресцентних властивостях були встановлені для барвників FME і **30**. Флуоресценція барвника **30** в буфері у 1.5 рази яскравіша, ніж барвника FME. На додаток **30** демонструє на 2000 см^{-1} більший Стоксів зсув (Рис. 12). Ще однією відмінністю є те, що смуга флуоресценції **30** є ширшою, що демонструє більш гетерогенне оточення хромофорів барвника у збудженому стані S1, на відміну від основного стану, де оточення **30** є більш однорідним, ніж у FME.

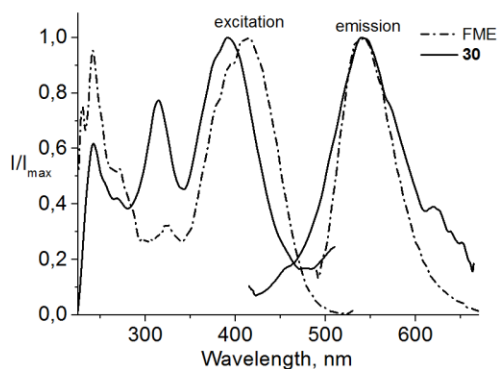


Рис. 12. Нормалізований спектр збудження та емісії флуоресценції барвників FME (штрих) та **30** (суцільна лінія) у буфері вода-ацетонітрил 9:1, рН 7.8. $C_{\text{dye}} = 1 \cdot 10^{-6}$ моль л^{-1} . $\lambda_{\text{ex}} = 460$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 560$ нм для барвника FME. $\lambda_{\text{ex}} = 390$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 544$ нм для барвника **30**.

АТФ у обох випадках при-близно однакова ~ 2 мкМ. Отже, наявність двох хромофорів у пінцеті значно розширює межі детекції АТФ.

У сьомому розділі «Флуориметрія комплексів флавонолів аденозин-5'-

трифосфатом при зміні іонної сили, рН розчину та концентрації органічного буфера» досліджено умови, у яких можливе утворення комплексів флавонолу з АТФ та їх флуориметрична реєстрація. Метою даного розділу роботи стало 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.

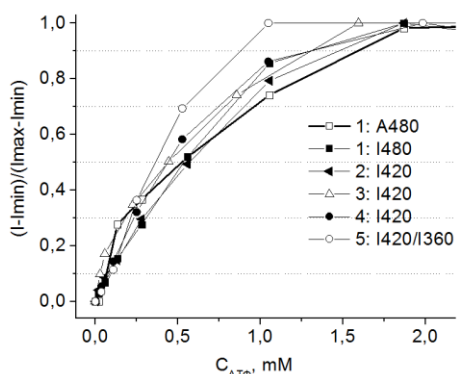


Рис. 14. Титриметричні криві в координатах частка зростання інтенсивності флуоресценції довгохвильової смуги від концентрації АТФ. Концентрації флавонолів: $2,5 \cdot 10^{-6}$ М (1), $3,4 \cdot 10^{-6}$ М (2), $5,6 \cdot 10^{-6}$ М (3), $1,3 \cdot 10^{-5}$ М (4), $1,1 \cdot 10^{-5}$ М (5).

Це спостереження може свідчити про суттєві зміни відносного розташування хромофорів **30** у збудженому стані.

Криві титрування (Рис. 13 А, Б) 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

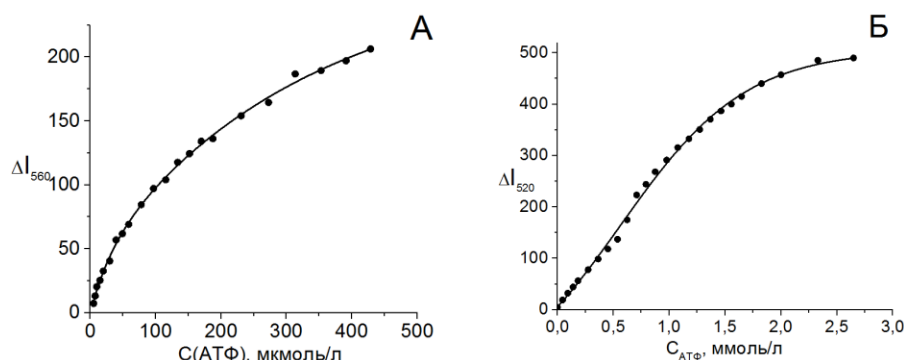
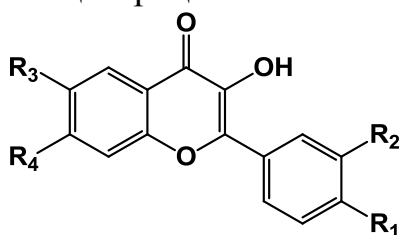


Рис. 13. Зміни інтенсивності флуоресценції барвника FME (А) та **30** (Б) при збільшенні концентрації АТФ. $C_{\text{barvnyk}} = 1 \cdot 10^{-5}$ моль л^{-1} у всіх випадках. $\lambda_{\text{ex}} = 460$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 560$ нм для барвника FME. $\lambda_{\text{ex}} = 450$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 544$ нм для барвника **30**.

Встановлено, що 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 можливості флуориметричного визначення концентрації АТФ у широких

межах рН, у присутності високих концентрацій органічних сполук у розчині та при високій іонній силі розчину.

Вивчено комплексоутворення метоксипохідних флавонолу **2** – **5** з АТФ у водному розчині, рН 7.2. Для сполук **2** і **5**, що мають найвищу гідрофобність, утворення комплексів починається на рівні мікромолярних 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 у приблизно одному й тому ж діапазоні концентрацій АТФ – близько 0.5 мМ (Рис. 14).



- 1: R₁ = NMe₂, R₂, R₃, R₄ = H;
 2: R₁ = OMe, R₂, R₃, R₄ = H;
 3: R₁, R₃ = OMe, R₂, R₄ = H;
 4: R₁, R₄ = OMe, R₂, R₃ = H;
 5: R₁, R₂ = OMe, R₃, R₄ = H;

у клітинах організмів (3-10 мМ) 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.

ВИСНОВКИ

Досліджено серію із тридцяти трьох синтезованих раніше флавонолів, біс-флавонолів, 3-гідроксикромонів 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 нуклеїновою основою за рахунок фотоперенесення електрону на флавонол. Проте при утворенні комплексу 1:2 таке гасіння блокується внаслідок компенсації електроноакцепторності флавонолу другою нуклеїновою 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.

Афінітет 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 афінітет. 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 афінітет 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.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Бугера О.І., Пивоваренко В.Г. Утворення агрегатів метоксифлавонолів з АТФ. Український хімічний журнал. 2017, 83(2), 121-128. (*Особистий внесок автора: проведення систематизації даних літератури, аналіз результатів дослідження, участь в обговоренні результатів та написанні статті*).
2. Пивоваренко В.Г., Бугера О.І. (2016). Патент України 113132 «Застосування 2-арил-3-гідроксигінолін-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 результатів 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 результатів дослідження, участь в обговоренні результатів, написання патенту).

4. 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* 2017, 2(54), 67. (*Особистий внесок автора*: проведення систематизації даних літератури, синтез молекулярного пінцету, участь в обговоренні результатів, написання статті).

5. 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 - 100. (*Особистий внесок автора*: проведення систематизації даних літератури, аналіз результатів дослідження, участь в обговоренні результатів та написанні статті.)

Статті в іноземних виданнях:

1. 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. (*Особистий внесок автора*: проведення систематизації даних літератури, аналіз результатів дослідження, участь в обговоренні результатів та написанні статті).

Тези наукових доповідей:

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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'-triphosphate. *8th International Chem. Conf. Toulouse-Kiev. Toulouse, France, 2015, 119.*

АНОТАЦІЯ

Бугера О.І. Синтез і властивості моно- та дихромофорних флуоресцентних зондів для детекції АТФ. – Рукопис.

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

Дисертаційна робота присвячена дизайну і синтезу флуоресцентних зондів для детекції АТФ на основі 3-гідроксифлавонів та вивчення взаємозв'язку структура – ефективність у визначенні АТФ методами флуоресцентної спектроскопії, дослідженню афінитету, селективності та меж детекції АТФ для синтезованих сполук.

Встановлено, що переважну більшість досліджених 3-гідроксихромонов і 3-гідроксихінолонов можна використовувати у якості флуоресцентних зондів для видначення АТФ у межах, які перевищують межі його фізіологічних концентрацій, а саме: 1 – 50000 мкМ. Внаслідок послідовного утворення кількох флуоресцентних 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. Показано, що афінитет і селективність 3-гідроксифлавонів до нуклеозид фосфатів можна регулювати шляхом зміни природи замісників та їх положення в молекулі. Знайдено, що 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.

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

АННОТАЦІЯ

Бугера А.И. **Синтез и свойства моно- и бихромофорных флуоресцентных зондов для детекции АТФ.** – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03 «Органическая химия». - Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2018.

Диссертация посвящена дизайну, синтезу флуоресцентных зондов для детекции АТФ на основе 3-гидроксифлавонов и изучению взаимосвязи структура - эффективность в определении АТФ методами флуоресцентной спектроскопии, исследованию аффинитета, селективности и границ детекции АТФ для синтезированных соединений.

Установлено, что подавляющее большинство исследованных 3-гидроксихромонов и 3-гидроксихинолонов можно использовать в качестве флуоресцентных зондов для определения АТФ в пределах, превышающих пределы его физиологических концентрации физиологических концентраций, а именно: 1 - 50000 мкм. Вследствие последовательного образования нескольких комплексов пределы определения АТФ с помощью 3-гидроксифлавонов минимум на порядок больше, чем в случае других известных зондов и составляют 3-4 порядка концентрации АТФ. Показано, что аффинитет и селективность 3-гидроксифлавонов к нуклеозид фосфатам можно регулировать путем изменения природы заместителей и их положения в молекуле. Найдено, что флуоресцентный ответ бихромофорных молекулярных пинцетов при связывании с АТФ является лучшим по параметрам интенсивности сигнала, расстояния между полосами возбуждения свободного зонда и его комплекса с АТФ и границам детекции АТФ.

Ключевые слова: флавонолы, молекулярный пинцет, флуоресцентный зонд, АТФ, АДФ, АМФ, ГТФ, спектрофотометрия, флуоресцентная спектроскопия.

SUMMARY

Bugera O.I. **Synthesis and properties of mono- and dichromophore fluorescence probes for ATP detection.** – Manuscript.

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

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.

Key words: flavonol, molecular tweezer, fluorescent probe, ATP, ADP, AMP, GTP, spectrophotometry, fluorescent spectroscopy.