



УДК 547.782

ПРОИЗВОДНЫЕ 6,7-ДИАЛКОКСИ-БЕНЗОТИОФЕНА В КАЧЕСТВЕ ОСНОВЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ СЕНСОРОВ НА АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА

© 2020 г. Я. В. Болт*, А. С. Царькова*, **, Н. С. Балеева*, #

*ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10**Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова,
Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Поступила в редакцию 18.04.2020 г.

После доработки 29.04.2020 г.

Принята к публикации 02.05.2020 г.

Производное диалкокси-бензотиофена предложено в качестве основы для создания флуоресцентных сенсоров на активные формы кислорода. Синтезирован соответствующий диоксид, который потенциально будет образовываться при детектировании. Показано, что благодаря заметному смещению максимумов поглощения и испускания, происходящему при окислении, подобные производные бензотиофена могут быть успешно использованы для создания флуоресцентных сенсоров.

Ключевые слова: редокс-процессы, активные формы кислорода, флуоресцентные сенсоры, бензотиофены

DOI: 10.31857/S0132342320060032

Редокс-процессы играют ключевую роль в биологических системах. Множество биохимических реакций зависит от регуляции такого типа превращений. Для аэробных организмов важнейшим инструментом регуляции выступает кислород и его активные формы (АФК). Синтез и перемещение АФК строго контролируется клеткой, так как такие реакционноспособные молекулы могут вызвать окислительные повреждения и привести к развитию патологий. В связи с этим АФК и их функции являются объектом детальных исследований многих научных коллективов [1–6]. Для детектирования АФК в живых системах сейчас доступны хроматографические и спектрофотометрические методы [7], люминесцентные индикаторы [8], электрохимические [8] и генетически кодируемые биосенсоры [9–12], а также флуоресцентные сенсоры [13, 14].

Среди флуоресцентных сенсоров на АФК очевидным образом стали распространены структурные модификации классических красителей, которые включают фрагменты, чувствительные к различным АФК. В подобной роли используются, например, производные цианина, флуоресцеина,

кумарина, резорурфина или бензотиазола [15–18]. Как правило, взаимодействие подобных сенсоров с детектируемым объектом происходит необратимо, в результате либо образуются новые химические связи, либо разрушаются существующие. Это приводит к резкому изменению оптических свойств сенсора, например, к потере флуоресценции или наоборот приобретению интенсивной эмиссии, или же к заметному смещению положений максимумов поглощения и испускания.

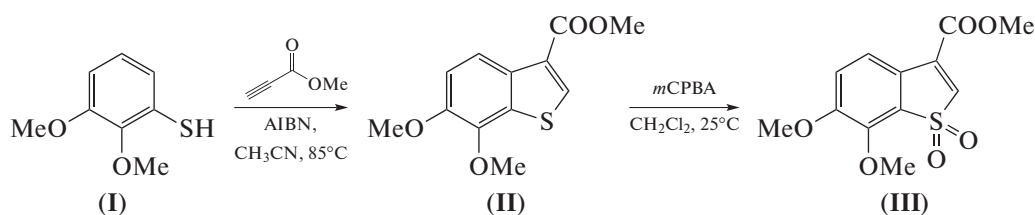
В данной работе мы предложили в качестве основы для создания подобного типа сенсоров производное бензотиофена (II). Необходимое соединение (II) было получено при взаимодействии диметоксифенилтиола (I) с метилпропиолатом в присутствии азобисизобутиронитрила (схема 1). Затем под действием *мета*-хлорнадбензойной кислоты из бензотиофена (II) был получен соответствующий диоксид (III). Последний в свою очередь предположительно будет образовываться из исходного соединения (II) под воздействием АФК. Мы установили, что превращение производного (II) в диоксид (III) легко происходит под действием водного раствора пероксида натрия, а также при выдерживании его раствора на воздухе, что говорит о высокой перспективности использования его как сенсора на АФК в живых системах.

Сокращения: АФК – активные формы кислорода; *n*-BuLi – *n*-бутиллитий; AIBN – азобисизобутиронитрил; *m*CPBA – *мета*-хлорнадбензойная кислота.

Автор для связи: (тел.: +7 (926) 704-13-72; эл. почта: ns-baleeva@gmail.com).

Таблица 1. Оптические свойства соединений (II) и (III) в разных растворителях

Соединение	Растворитель	Максимум поглощения, нм	Максимум эмиссии, нм	Коэффициент молярного поглощения, $M^{-1} cm^{-1}$	Квантовый выход флуоресценции, %
(II)	Этанол	302	473	6500	17
	Ацетонитрил	300	444	6500	32
	Диоксан	302	421	6500	40
(III)	Этанол	358	497	4500	27
	Ацетонитрил	356	487	5000	31
	Диоксан	355	471	4500	28

**Схема 1.** Схема синтеза производных (II) и (III).

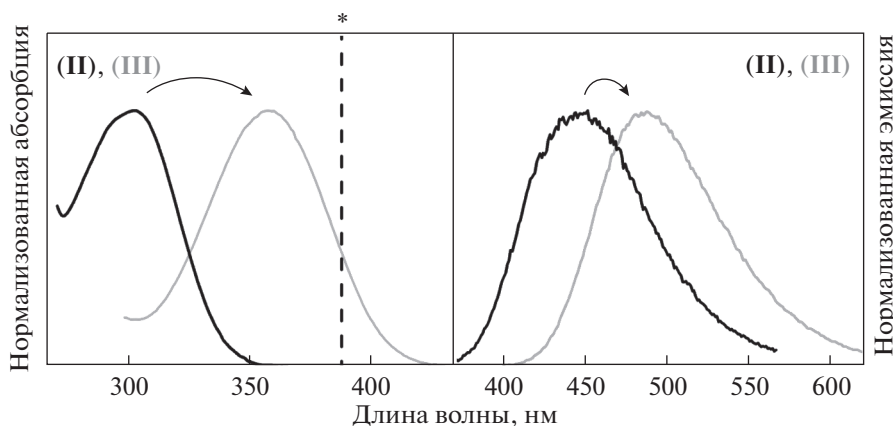
Сравнение оптических свойств полученных соединений показало, что при переходе к окисленной форме (III) в спектрах абсорбции и эмиссии наблюдается заметное батохромное смещение положений максимумов (примерно на 40–60 нм) (табл. 1, рис. 1). Стоит отметить, что столь существенная разница позволит детектировать флуоресценцию диоксида, не наблюдая при этом сигнала исходного бензотиофена (например, при использовании лазера с длиной волны 388 нм, на рис. 1 отмечено*, а также фильтров DAPI или в двухфотонном режиме). Было установлено, что превращение исходного соединения (II) в диоксид (III) не оказывает влияния на другие оптические свойства – величины квантового выхода флу-

оресценции и коэффициента молярного поглощения практически не изменяются (табл. 1).

Полученные результаты позволяют заключить, что использование диалкокси-бензотиофена в качестве основы для создания флуоресцентных сенсоров на АФК представляется перспективным направлением для дальнейшей работы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР (δ , м.д.; J , Гц) зарегистрированы на приборе Bruker Fourier 300 (300 МГц, США) и Bruker Avance III (700 МГц, США) при 303 К в $CDCl_3$ и $DMSO-d_6$ (внутренний стандарт – Me_4Si). Спектры поглощения в УФ и видимом диапазоне

**Рис. 1.** Нормализованные спектры поглощения и испускания соединений (II) (черный) и (III) (серый) в ацетонитриле. (* Отмечена длина волны лазера, используемого в микроскопии.)

регистровали на спектрофотометре Varian Cary 100 Bio (США); спектры флуоресценции — на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (США). Температуры плавления определены на приборе SMP 30 (Великобритания) и не исправлены. Масс-спектры высокого разрешения записаны на приборе Bruker micrOTOF II, ионизация электро-распылением.

2,3-Диметоксифенилтиол (I). К раствору 1,2-диметоксифенилтиола (5.77 г, 41.7 ммоль) в ТГФ (100 мл) в атмосфере аргона при -78°C прикапывали раствор *n*-BuLi в гексане (1 М, 39.1 мл, 62.6 ммоль), перемешивали при -78°C в течение 10 мин, затем нагревали до комнатной температуры и выдерживали 30 мин. Реакционную смесь охлаждали до -78°C , прибавляли S_8 (5.01 г, 5.0 ммоль) и нагревали до 0°C в течение 1 часа. Через 30 мин к реакционной смеси добавляли водный раствор соляной кислоты (1 М, 100 мл), экстрагировали этилацетатом (3×50 мл), промыли водой (3×50 мл) и насыщенным раствором хлорида натрия (3×50 мл), высушили над безводным Na_2SO_4 и упарили в вакууме. Продукт очищали методом колоночной хроматографии (элюент — гексан—этилацетат, 100 : 3). Желтоватая жидкость (4.34 г, 61%); ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3): 6.94 (т, J_2 7.9, 1H), 6.86 (дд, J_2 7.9, 1.7, 1H), 6.71 (дд, J_2 8.0, 1.6, 1H), 3.87 (с, 3H), 3.86 (с, 3H) [19].

3-Метоксикарбонил-6,7-диметоксифенилтиофен (II). К раствору 2,3-диметоксифенилтиола (I) (2.60 г, 15.27 ммоль) в ацетонитриле (250 мл) в атмосфере аргона добавляли метилпропионат (13.6 мл, 152.7 ммоль) и азобисизобутиронитрил (0.50 г, 3.1 ммоль). Полученный раствор перемешивали при кипении в течение 2 часов. Ацетонитрил и избыток метилпропионата упаривали в вакууме. Полученный продукт очищали методом колоночной хроматографии (элюент — гексан—этилацетат, 50 : 1). Затем продукт дополнительно очищали с помощью кристаллизации из пентана. Белый порошок (1.35 г, 35%); т. пл. около 260°C с разложением; ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3): 8.24 (д, J_2 8.6, 1H), 8.23 (с, 1H), 7.19 (д, J_2 8.9, 1H), 4.05 (с, 3H), 3.98 (с, 3H), 3.95 (с, 3H); ^{13}C -ЯМР (75 МГц, CDCl_3): 163.2, 148.7, 142.7, 135.3, 134.7, 133.6, 132.1, 127.2, 120.0, 113.7, 60.6, 56.9, 51.6; HRMS (ESI) m/z : найдено М 253.0538, рассчитано для $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{S}^+$, $[M + H]^+$ 253.0529.

3-Метоксикарбонил-6,7-диметоксифенилтиофен-1,1-диоксид (III). Раствор 3-метоксикарбонил-6,7-диметоксифенилтиофена (II) (100 мг, 0.39 ммоль) и *мета*-хлорнадбензойной кислоты (67 мг, 0.78 ммоль) в 2 мл сухого дихлорметана перемешивали при комнатной температуре в течение 8 ч. Затем реакционную смесь промывали насыщенным раствором гидрокарбоната натрия (3×1 мл), водой (3×1 мл) и насыщенным раство-

ром хлорида натрия (3×50 мл). Полученный раствор сушили над безводным Na_2SO_4 и упаривали в вакууме. Полученный продукт очищали методом колоночной хроматографии (элюент — хлороформ—метанол, 10 : 1). Бесцветное масло (84 мг, 75%); т. пл. около 260°C с разложением; ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 7.88 (с, 1H), 7.72 (д, J_2 8.4, 1H), 7.34 (д, J_2 8.6, 1.9, 1H), 3.96 (с, 3H), 3.91 (с, 3H), 3.88 (с, 3H); ^{13}C -ЯМР (176 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 162.1, 154.7, 145.2, 135.1, 132.6, 128.9, 121.2, 120.6, 117.4, 61.6, 56.7, 52.9; HRMS (ESI) m/z : найдено М 285.0431, рассчитано для $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{O}_6\text{S}^+$, $[M + H]^+$ 285.0427.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-33-70266.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Liu H., Colavitti R., Rovira I.I., Finkel T. // *Circ. Res.* 2005. V. 97. P. 967–974. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000188210.72062.10>
- Hidalgo C., Bull R., Behrens M.I., Donoso P. // *Biol. Res.* 2004. V. 37. P. 539–552. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602004000400007>
- Tang X.D., Santarelli L.C., Heinemann S.H., Hoshi T. // *Annu. Rev. Physiol.* 2004. V. 66. P. 131–159. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.041002.142720>
- Winterbourn C.C., Hampton M.B. // *Free Radic. Biol. Med.* 2008. V. 45. P. 549–561. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.004>
- Ray P.D., Huang B.W., Tsuji Y. // *Cell Signal.* 2012. V. 24. P. 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
- Forrester S.J., Kikuchi D.S., Hernandez M.S., Xu Q., Griendling K.K. // *Circ. Res.* 2018. V. 122. P. 877–902. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311401>
- Zhang Y., Dai M., Yuan Z. // *Anal. Methods.* 2018. V. 10. P. 4625–4638. <https://doi.org/10.1039/C8AY01339J>
- Chen X., Wang F., Hyun J.Y., Wei T., Qiang J., Ren X., Shin I., Yoon J. // *Chem. Soc. Rev.* 2016. V. 45. P. 2976–3016. <https://doi.org/10.1039/C6CS00192K>

9. *Belousov V.V., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Staroverov D.B., Shakhbazov K.S., Terskikh A.V., Lukyanov S.* // *Nat. Methods* 2006. V. 3. P. 281–286.
<https://doi.org/10.1038/nmeth866>
10. *Gutscher M., Sobotta M.C., Wabnitz G.H., Ballikaya S., Meyer A.J., Samstag Y., Dick T.P.* // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 31532–31540.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.059246>
11. *Zhao Y., Jin J., Hu Q., Zhou H.M., Yi J., Yu Z., Xu L., Wang X., Yang Y., Loscalzo J.* // *Cell Metab.* 2011. V. 14. P. 555–566.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.09.004>
12. *Pak V.V., Ezeriņa D., Lyublinskaya O.G., Pedre B., Tyurin-Kuzmin P.A., Mishina N.M., Thauvin M., Young D., Wahni K., Martínez Gache S.A., Demidovich A.D., Ermakova Y.G., Maslova Y.D., Shokhina A.G., Eroglu E., Bilan D.S., Bogeski I., Michel T., Vriz S., Messens J., Belousov V.V.* // *Cell Metab.* 2020. V. 31. P. 642–653.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.02.003>
13. *Hyman L.M., Franz K.J.* // *Coord. Chem. Rev.* 2012. V. 256. P. 2333–2356.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.009>
14. *Gomes A., Fernandes E., Lima J.L.* // *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2005. V. 65. P. 45–80.
<https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.10.003>
15. *Wu L., Sedgwick A.C., Sun X., Bull S.D., He X.-P., James T.D.* // *Acc. Chem. Res.* 2019. V. 52. P. 2582–2597.
<https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00302>
16. *Liu F., Wu T., Cao J., Zhang H., Hu M., Sun S., Song F., Fan J., Wang J., Peng X.* // *Analyst.* 2013. V. 138. P. 775–778.
<https://doi.org/10.1039/C2AN36030F>
17. *Odyniec M.L., Gardiner J.E., Sedgwick A.C., He X.-P., Bull S.D., James T.D.* // *Front. Chem. Sci. Eng.* 2020. V. 14. P. 117–121.
<https://doi.org/10.1007/s11705-018-1785-9>
18. *Odyniec M.L., Sedgwick A.C., Swan A.H., Weber M., Tang T.M.S., Gardiner J.E., Zhang M., Jiang Y.-B., Kociok-Kohn G., Elmes R.B.P., Bull S.D., He X.-P., James T.D.* // *Chem. Commun.* 2018. V. 54. P. 8466–8469.
<https://doi.org/10.1039/C8CC04316G>
19. *Aebischer D., Brzostowska E.M., Mahendran A., Greer A.* // *J. Org. Chem.* 2007. V. 72. P. 2951–2955.
<https://doi.org/10.1021/jo062677w>

6,7-Dialcoxy-Benzothiophene Derivatives as the Basis for Synthesis of Fluorescent Sensors for Reactive Oxygen Species

Ya. V. Bolt*, A. S. Tsarkova*, **, and N. S. Baleeva*., #

Phone: +7 (926) 704-13-72; e-mail: nsbaleeva@gmail.com

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

**Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia

We suggest the use of the 6,7-dialcoxy-benzothiophene derivatives as the basis for synthesis of fluorescent sensors for reactive oxygen species. The corresponding dioxide – a potential product of oxidation, that might be generated during ROS detection, was synthesized. We have established that benzothiophene derivatives could be successfully used for synthesis of fluorescent sensors, due to the noticeable shift of the absorption and emission maxima that occurs during oxidation.

Keywords: redox reaction, reactive oxygen species, fluorescent sensors, benzothiophenes