



УДК 547.782

КЕТОПРОИЗВОДНЫЕ АРИЛИДЕН-ИМИДАЗОЛОНОВ КАК ФЛУОРОГЕННЫЕ КРАСИТЕЛИ¹

© 2022 г. А. И. Соколов*, **, А. А. Горшкова*, Н. С. Балеева*, **, #, М. С. Баранов*, **

*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 12.04.2022 г.

После доработки 22.04.2022 г.

Принята к публикации 24.04.2022 г.

Синтезированы четыре (*Z*)-2-ацетил-4-бензилиден-1-метил-1*H*-имидазол-5(4*H*)-она, характеризующиеся значительным варьированием интенсивности флуоресценции в различных средах. Установлено, что введение 2-ацетильной группы позволяет значительно сместить положение спектральных максимумов в длинноволновую область. Показано, что полученные кетопроизводные арилиден-имидазолонов могут использоваться для окрашивания эндоплазматического ретикулума во флуоресцентной микроскопии.

Ключевые слова: арилиден-имидазолы, эндоплазматический ретикулум, флуоресценция

DOI: 10.31857/S0132342322060240

ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентные белки – самый распространенный тип генетически кодируемых флуоресцентных меток. Такие белки способны автокаталитически из собственных аминокислотных остатков формировать внутренние ароматические структуры – хромофоры, которые представляют собой различные арилиден-имидазолы. На сегодняшний день во флуоресцентной микроскопии применяется множество разноцветных флуоресцентных белков, имеющих хромофоры разного строения [1]. Среди них отдельное место занимают белки, содержащие в своем составе хромофоры с ацильной группой во втором положении имидазольного цикла, например, белок AsFP [2]. Наличие такой группы обуславливает значительное батохромное смещение максимумов поглощения и эмиссии этих белков.

Известно, что арилиден-имидазолы в свободном от белка виде флуоресцируют крайне слабо [3]. Это объясняется возможностью безызлучательного сброса энергии возбуждения из-за подвижности арилиденового фрагмента [4]. Однако благодаря таким свойствам арилиден-имидазоло-

ны можно использовать в качестве флуорогенов красителей, например, для окрашивания белков и нуклеиновых кислот, а также отдельных клеточных органелл [5–9].

Ранее было показано, что некоторым арилиден-имидазолам свойственно заметное варьирование интенсивности флуоресценции в разных средах [10–13]. Такое свойство позволило применять эти соединения в роли своего рода флуоресцентных “сенсоров полярности” и использовать для окрашивания эндоплазматического ретикулума и других органелл. Было установлено, что к подобной группе относятся арилиден-имидазолы, имеющие одновременно два электронно-донорных заместителя в *мета*- и *орто*-положениях арилиденового фрагмента (схема 1, соединения (I)) [11, 14, 15]. Позднее мы показали, что введение во второе положение имидазольного цикла этих соединений стирольных заместителей позволяет сохранить такое варьирование [14, 15]. Введение стирольных групп – важная модификация в химии красителей, которая позволяет увеличить размер π-системы и, как следствие, приводит к батохромному сдвигу спектральных максимумов. Подобные красители особо востребованы во флуоресцентной микроскопии, т.к. длинноволновое излучение наименее токсично для живых тканей.

¹ Дополнительные материалы к этой статье доступны по doi 10.31857/S0132342322060240 для авторизованных пользователей.

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

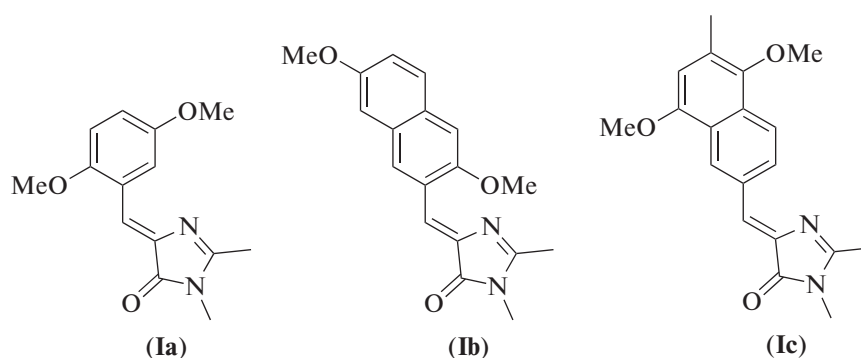


Схема 1. Строение соединений (I).

В настоящей работе изучено влияние другой модификации, которая может привести к смещению максимумов поглощения и испускания в длинноволновую область. Проведенные нами ранее исследования показали, что введение кетогруппы во второе положение имидазолонового кольца разных арилиден-имидазолонов часто приводит к батохромному сдвигу спектральных максимумов на 50–100 нм [16, 17]. Поэтому целью данной работы стали синтез кетопроизводных арилиден-имидазолонов (I) и изучение влияния кетогруппы в структуре на оптические свойства этих красителей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первой стадии синтеза из различных ароматических альдегидов (II) были получены соответствующие арилимины, из которых без дополнительной очистки с помощью [3+2]циклоприсоединения были синтезированы арилиден-имидазолы (III) (схема 2). Затем арилиден-имидазолы (III) под действием диоксида селена были окислены до соответствующих кетопроизводных (IV) (схема 2).

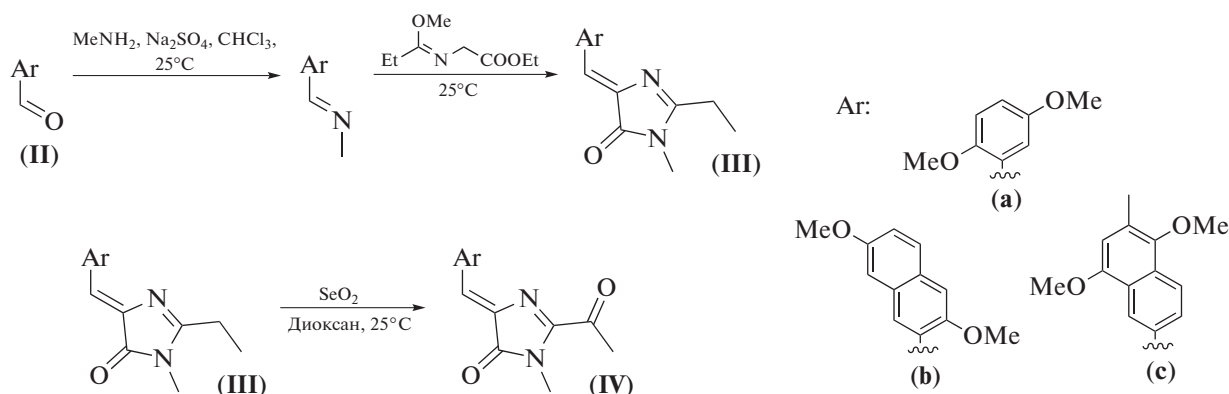


Схема 2. Синтез соединений (III) и (IV).

На следующем этапе работы были изучены оптические свойства полученных кетонов (IV). Установлено, что максимумы абсорбции находятся в области 410–450 нм, а максимумы эмиссии – в области 560–630 нм (табл. 1). Сравнение этих результатов с данными, известными для соединений (I), показывает, что введение кетогруппы приводит к батохромному сдвигу максимумов на 50–100 нм (отмечено на рис. 1 стрелками) и заметно увеличению стоксового сдвига (разница между максимумами эмиссии и абсорбции) (рис. 1). Выбранная нами модификация также привела к небольшому снижению интенсивности флуоресценции. Так, квантовый выход флуоресценции кетонов (IV) в диоксане составляет 1.2–4.2%, в то

время как соединения (I) флуоресцируют в этом растворителе с квантовым выходом 6–40% [14, 15]. Однако новые производные (IV), так же как и соединения (I), характеризовались выраженным варьированием величины квантового выхода (табл. 1), что говорит о перспективности их использования в роли “сенсоров полярности” для живых систем.

В связи с тем, что квантовый выход соединений (IV) варьируется, на заключительном этапе данной работы мы решили исследовать возможность их использования для окрашивания клеточных культур. Было установлено, что при добавлении растворов кетонов (IV) к клеткам линии

Таблица 1. Оптические свойства соединений (IV) в разных растворителях

Соединение		MeOH	CH ₃ CN	EtOAc	Диоксан
(IVa)	Максимум поглощения, нм	447	444	444	444
	Коэффициент экстинкции, М ⁻¹ см ⁻¹	18000	20500	20500	20500
	Максимум эмиссии, нм	599	603	570	561
	Квантовый выход флуоресценции, %	<0.5	1.9	2.9	3.2
(IVb)	Максимум поглощения, нм	412	413	415	416
	Коэффициент экстинкции, М ⁻¹ см ⁻¹	25500	27500	27500	27000
	Максимум эмиссии, нм	~600	~570	623	612
	Квантовый выход флуоресценции, %	<0.5	<0.5	0.7	1.2
(IVc)	Максимум поглощения, нм	449	448	449	446
	Коэффициент экстинкции, М ⁻¹ см ⁻¹	–	14500	15500	15000
	Максимум эмиссии, нм	~620	~630	620	590
	Квантовый выход флуоресценции, %	<0.5	<0.5	1.2	4.2

Примечание: прочерк – соединение плохо растворимо в данном растворителе.

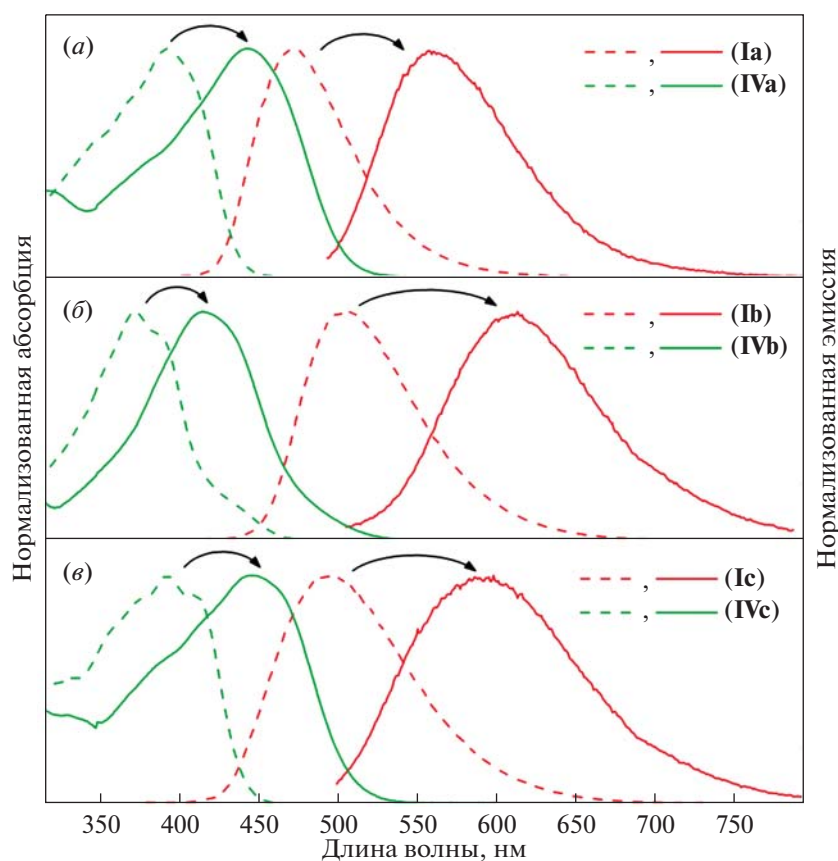


Рис. 1. Спектры поглощения (зеленый) и эмиссии (красный) соединений (I) (пунктир) и кетопроизводных (IV) (сплошная) в диоксане; (а) – соединения (Ia) и (IVa), (б) – соединения (Ib) и (IVb), (в) – соединения (Ic) и (IVc).

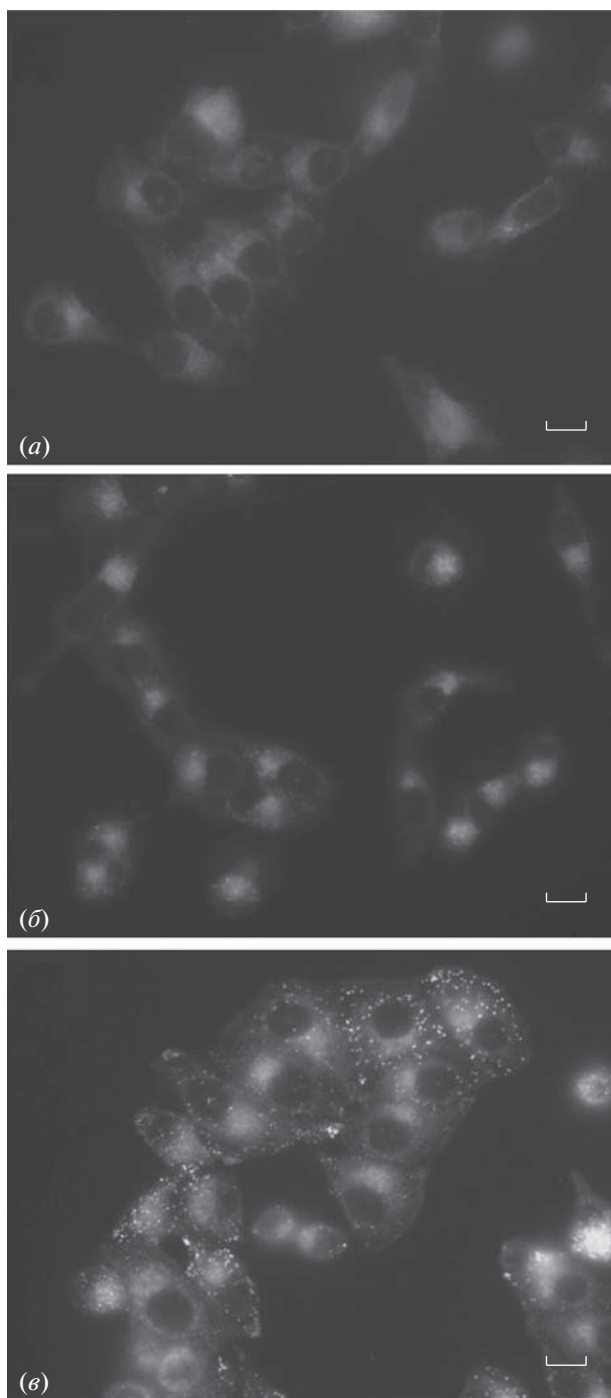


Рис. 2. Окрашивание эндоплазматического ретикулума кетопроизводными (**IV**) в живых клетках линии HeLa Kyoto; (а) – соединение (**IVa**), (б) – соединение (**IVb**), (в) – соединение (**IVc**). Конечная концентрация соединений – 10 мкМ. Масштабный отрезок – 10 мкм.

HeLa Kyoto в конечной концентрации 10 мкМ появляется выраженная флуоресценция, ассоциированная со структурами эндоплазматического ретикулума (рис. 2). Наиболее яркая флуоресценция наблюдалась для производного (**IVc**), однако

окрашивание в этом случае было наименее селективным, т.к. помимо флуоресценции структур эндоплазматического ретикулума наблюдалось формирование ярких флуоресцентных капелек, вызванное вероятной агрегацией красителя. Аналогичным поведением характеризовалось производное (**IVb**), хотя формирование агрегатов в этом случае было менее выражено. Вероятно, наличие нафталинового фрагмента в структуре этих двух соединений снижает их растворимость в воде и облегчает формирование агрегатов. Наилучший же результат был достигнут для производного (**IVa**), имеющего наименьший размер.

Таким образом, мы установили, что кетоны (**IV**), как и арилиден-имидазолы (**I**), способны окрашивать эндоплазматический ретикулум и могут найти свое применение во флуоресцентной микроскопии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование. Спектры ЯМР (δ , м.д.; J , Гц) регистрировали на приборах Bruker Fourier 300 (300 МГц; Bruker, США), Bruker Avance III NMR (700 МГц; Bruker, США) и Bruker Avance III NMR (800 МГц; Bruker, США), оснащенных 5-мм криодатчиком TXI, в $DMSO-d_6$ и $CDCl_3$ (внутренний стандарт – Me_4Si). Спектры поглощения в УФ- и видимом диапазоне регистрировали на спектрофотометре Varian Cary 100 Bio (Varian, США), спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (Varian, США). Температуры плавления определяли на приборе SMP30 (Stuart Scientific, Великобритания) и не исправляли. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на приборе TripleTOF 5600+ (AB Sciex, США) с ионизацией методом электроспрея (ESI). Напряжение на капилляре 5.5 кВ в режиме регистрации положительных ионов, 4.5 кВ в режиме регистрации отрицательных ионов. Поток газ-носителя – 15 Arb, газа-распылителя – 25 Arb. Пробы вводили с помощью шприцевого насоса со скоростью потока 20 мкл/мин.

Синтез 2-этил-1-метил-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов (II). К раствору ароматического альдегида (5 ммоль, 1 экв.) в хлороформе (50 мл) добавляли 40%-ный водный раствор метиламина (2.2 мл, 25 ммоль, 5 экв.), после чего в колбу вносили безводный сульфат натрия до исчезновения водного слоя в реакционной смеси. Колбу закрывали пробкой и выдерживали при комнатной температуре в течение 96 ч. Далее суспензию отфильтровывали и сушили над безводным сульфатом натрия. Сушитель отфильтровывали, а раствор упаривали при пониженном давлении. К остатку после упаривания добавляли карбоксимидат (1.13 г, 6.5 ммоль, 1.3 экв.). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение

ние 96 ч. Целевой продукт выделяли и очищали методом флеш-хроматографии (элюент – хлороформ и этанол, 100 : 3).

Синтез 2-этил-1-метил-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов (III). К раствору 2-этил-1-метил-1*H*-имидазол-5(4*H*)-она (0.4 ммоль, 1 экв.) в диоксане (8 мл) добавляли диоксид селена(IV) (88 мг, 0.8 ммоль, 2 экв.). Полученную смесь выдерживали в масляной бане при 100°C в течение 30 мин. Затем смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли этилацетатом (80 мл) и перенесли в делительную воронку, где смесь последовательно промывали насыщенным раствором карбоната калия (100 мл) и насыщенным раствором хлорида калия (3 × 100 мл). Органическую фазу отделяли, сушили над безводным сульфатом натрия. Осушитель отфильтровывали, а раствор упаривали при пониженном давлении. Целевые соединения выделяли из остатка после упаривания с помощью флеш-хроматографии (элюент – этилацетат и гексан, 1 : 2).

Выходы реакций, температуры плавления и спектральные характеристики синтезированных соединений (II) и (III) приведены в дополнительных материалах.

Флуоресцентная микроскопия. Скрининг соединений проводили с использованием живых клеточных культур HeLa Kyoto (ATCC). Соединения добавляли к клеткам HeLa Kyoto в концентрациях 1–10 мкМ (соединения разводили из 1 мМ стокового раствора в DMSO). Изображения получали на инвертированном широкопольном флуоресцентном микроскопе BZ-9000 (Keyence, Япония) с объективом Nikon Plan Apo 60× 1.40 Oil (Nikon, США) и набором светофильтров Keyence GFP-B EX 470/40 DM 495 BA 535/50.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы четыре кетопроизводных арилиден-имидазолонов. Установлено, что введение кетогруппы не приводит к существенным изменениям оптических свойств, и для всех новых соединений, как и для оригинальных арилиден-имидазолонов, характерно варьирование величины квантового выхода флуоресценции при замене растворителя. Продемонстрировано, что синтезированные кетоны перспективны в качестве красителей во флуоресцентной микроскопии, т.к. они способны окрашивать эндоплазматический ретикулум.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации № МК-4173.2022.1.3.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Physiol. Rev.* 2010. V. 90. P. 1103–1163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009>
2. Yampolsky I.V., Remington S.J., Martynov V.I., Potapov V.K., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Biochemistry.* 2005. V. 44. P. 5788–5793. <https://doi.org/10.1021/bi0476432>
3. Deng H., Zhu X. // *Mater. Chem. Front.* 2017. V. 1. P. 619–629. <https://doi.org/10.1039/C6QM00148C>
4. Baranov M.S., Lukyanov K.A., Borissova A.O., Shamir J., Kosenkov D., Slipchenko L.V., Tolbert L.M., Yampolsky I.V., Solntsev K.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. V. 134. P. 6025–6032. <https://doi.org/10.1021/ja3010144>
5. Plamont M.A., Billon-Denis E., Maurin S., Gauron C., Pimenta F.M., Specht C.G., Shi J., Quéraud J., Pan B., Rossignol J., Moncoq K., Morellet N., Volovitch M., Lescep E., Chen Y., Triller A., Vriz S., Le Saux T., Jullien L., Gautier A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. P. 497–502. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513094113>
6. Bozhanova N.G., Baranov M.S., Klementieva N.V., Sarkisyan K.S., Gavrikov A.S., Yampolsky I.V., Zagaynova E.V., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A., Mishin A.S. // *Chem. Sci.* 2017. V. 8. P. 7138–7142. <https://doi.org/10.1039/C7SC01628J>
7. Paige J.S., Wu K.Y., Jaffrey S.R. // *Science.* 2011. V. 333. P. 642–646. <https://doi.org/10.1126/science.1207339>
8. Filonov G.S., Moon J.D., Svensen N., Jaffrey S.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. V. 136. P. 16299–308. <https://doi.org/10.1021/ja508478x>
9. Collot M., Kreder R., Tatarets A.L., Patsenker L.D., Mellya Y., Klymchenko A.S. // *Chem. Commun.* 2015. V. 51. P. 17136–17139. <https://doi.org/10.1039/C5CC06094J>
10. Chuang W.-T., Hsieh C.-C., Lai C.-H., Lai C.-H., Shih C.-W., Chen K.-Y., Hung W.-Y., Hsu Y.-H., Chou P.-T. // *J. Org. Chem.* 2011. V. 76. P. 8189–8202. <https://doi.org/10.1021/jo2012384>
11. Deng H., Yu C., Gong L., Zhu X. // *J. Phys. Chem. Lett.* 2016. V. 7. P. 2935–2944. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.6b01251>
12. Ermakova Y.G., Sen T., Bogdanova Y.A., Smirnov A.Y., Baleeva N.S., Krylov A.I., Baranov M.S. // *J. Phys. Chem. Lett.* 2018. V. 9. P. 1958–1963. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.8b00512>

13. Ermakova Y.G., Bogdanova Y.A., Baleeva N.S., Zaitseva S.O., Guglya E.B., Smirnov A.Y., Zagudaylova M.B., Baranov M.S. // *Dye Pigment*. 2019. V. 170. P. 107–110. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107550>
14. Smirnov A.Y., Perfilov M.M., Zaitseva E.R., Zagudaylova M.B., Zaitseva S.O., Mishin A.S., Baranov M.S. // *Dye Pigment*. 2020. V. 177. P. 108–111. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108258>
15. Perfilov M.M., Zaitseva E.R., Smirnov A.Y., Mikhailov A.A., Baleeva N.S., Myasnyanko I.N., Mishin A.S., Baranov M.S. // *Dye Pigment*. 2022. V. 198. P. 110–113. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.110033>
16. Sokolov A.I., Myasnyanko I.N., Baleeva N.S., Baranov M.S. // *ChemistrySelect*. 2020. V. 5. 7000–7003. <https://doi.org/10.1002/slct.202001782>
17. Zaitseva E.R., Smirnov A.Y., Myasnyanko I.N., Sokolov A.I., Baranov M.S. // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2020. V. 56. P. 116–119. <https://doi.org/10.1007/s10593-020-02634-3>

Keto-Analogues Arylidene-Imidazolones as Fluorogenic Dyes

A. I. Sokolov*, **, A. A. Gorshkova*, N. S. Baleeva*, **, #, and M. S. Baranov*, **

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

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

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

We report a series of (*Z*)-2-acetyl-4-benzyliden-1-methyl-1*H*-imidazol-5(4*H*)-ones with a pronounced solvent-dependent intensity of fluorescence variation. The introduction of the 2-acetyl group allows to shift the absorption and emission maxima to the long-wavelength region. We showed that these compounds can be used for staining of the endoplasmic reticulum in the fluorescent microscopy.

Keywords: arylidene-imidazolones, endoplasmic reticulum, fluorescence