

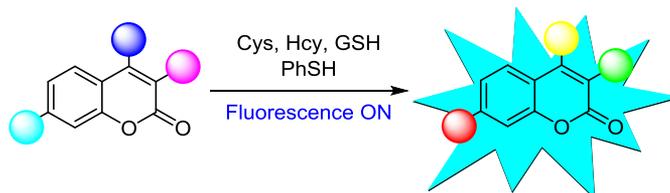
Флуоресцентные зонды на основе производных кумарина для определения биогенных тиолов и тиофенолов

Дмитрий И. Бугаенко¹, Александр В. Карчава¹,
Зумруд А. Юнусова², Марина А. Юровская^{1*}

¹ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Ленинские горы, д. 1, стр. 3, Москва 119992, Россия; e-mail: yumar@org.chem.msu.ru

² Филиал Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова в городе Баку,
ул. Университетская, 1, п. Ходжасан, Бинагадинский район, Баку AZ 1144, Азербайджан
e-mail: zumrudy@bk.ru

Поступило 18.03.2019
Принято 8.04.2019



В мини-обзоре рассмотрены принципы действия флуоресцентных зондов на основе производных кумарина для обнаружения биогенных тиолов (цистеина, гомоцистеина, глутатиона) и тиофенолов. Проанализирована литература последних 5 лет.

Ключевые слова: биогенные тиолы, глутатион, гомоцистеин, кумарин, тиофенол, цистеин, флуоресцентный зонд.

Биогенные тиолы низкомолекулярной природы – цистеин (Cys), гомоцистеин (Hcy) и глутатион (GSH) – играют важную роль в физиологических процессах (рис. 1). GSH, являясь самым распространенным в клетках небелковым тиолом, обладает восстановительными свойствами и представляет собой мощный антиоксидант, предохраняющий клетку от оксидативного стресса путем захватывания свободных радикалов.¹ Изменение количества клеточного GSH связано со многими заболеваниями и симптомами, такими как повреждение печени, потеря лейкоцитов, псориаз, рак и ВИЧ-инфекция. По этой причине эффективные методы селективного обнаружения биогенных тиолов в биологических системах важны для биомедицинских исследований и диагностики различных заболеваний.²

Флуоресцентные зонды, благодаря простоте их структуры, высокой чувствительности, возможности визуализации физиологических процессов в реальном времени и неразрушающему действию по отношению к клетке, являются наиболее эффективными молекулярными инструментами для определения следовых количеств важных биомолекул в биологических системах. Такие молекулярные инструменты состоят из

двух взаимосвязанных ключевых фрагмента, один из которых представляет собой флуоресцентный краситель, отвечающий за проявления наблюдаемого свойства, а другой – реакционный центр зонда, отвечающий за связывание с определяемой молекулой. Ковалентное связывание реакционного центра зонда с обнаруженной молекулой влечет за собой изменение в распределении электронной плотности в молекуле, что, в свою очередь, вызывает отклик флуоресцентного фрагмента. Флуоресцентные зонды такого принципа действия создаются на основе различных классов органических соединений, проявляющих флуоресцентные свойства. Одно из первых мест среди них занимают производные кумарина, выбор которых для создания флуоресцентных зондов обусловлен их синтетической доступностью, широкими возможностями для их химической модификации, малой токсичностью.

Флуоресцентные зонды являются объектом многочисленных исследований, о чем свидетельствуют

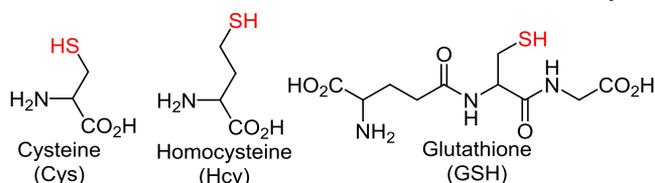


Рисунок 1. Биогенные тиолы.

* Здесь и далее в номере фамилия автора, с которым следует вести переписку, отмечена звездочкой.

недавние публикации ряда обзорных статей.³ Вышедший в 2015 г. обзор⁴ по стратегии создания флуоресцентных зондов для селективного определения биогенных тиолов, наряду с описанием соединений различных классов, содержит и сведения по производным кумарина, опубликованным по 2014 г. Появление за последние годы ряда новых интересных работ по флуоресцентным зондам кумариновой природы и стремление изучить соединения этого класса более подробно побудило нас представить читателям настоящий обзор.

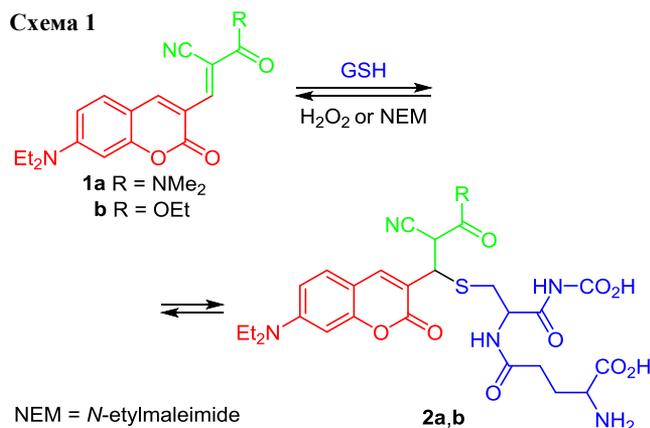
Сконструированные с учетом химических особенностей тиолов зонды позволяют селективно определять тиолы в присутствии других биомолекул. Эти химические свойства тиолов состоят, прежде всего, в известной нуклеофильности групп SH, что позволяет им легко вступать в реакции Михаэля⁵ и нуклеофильного замещения, расщеплять сульфонамиды, сульфонатные эфиры⁶ и связи S–S.⁷ Именно по принципу использования этих реакций и будет построена классификация материала обзора. В обзоре мы подробно рассматриваем принципы действия флуоресцентных зондов на основе производных кумарина, методы синтеза обсуждаемых соединений при этом опущены и могут быть найдены читателями в цитированной литературе.

Использование реакции Михаэля

Для синтеза флуоресцентных зондов, принцип действия которых основан на использовании тиореакции Михаэля, необходимо введение в молекулу зонда фрагмента α,β -непредельного карбонильного соединения (акцептора Михаэля). Присоединение тиолов по активированной двойной связи приводит к насыщенному фрагменту и появлению требуемой флуоресценции. Кроме того, часто для усиления собственной флуоресценции кумаринового фрагмента вводят донорный заместитель, например диэтиламиногруппу, в бензольный цикл кумарина.

Так, по этому принципу разработаны флуоресцентные пробы **1a,b** (схема 1) для количественного мониторинга клеточного GSH.² Проба способна специфично и обратимо взаимодействовать с GSH с константой диссоциации (K_d 2.59 мМ) и быстрым ответом ($t_{1/2}$ 5.28 с).

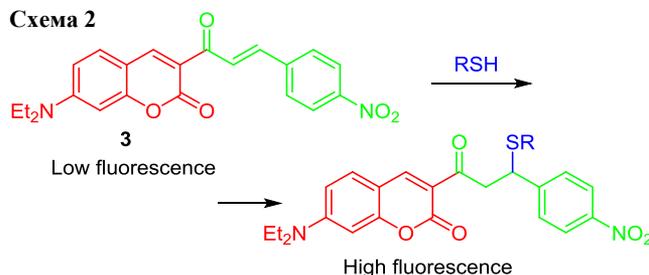
Схема 1



Введение сильной электроноакцепторной группы CN повышает реакционную способность молекулы по отношению к тиолам и, кроме того, повышает CN-кислотность β -атома водорода в аддуктах **2a,b** (схема 1), способствует быстрой обратимой реакции присоединения–элиминирования. Элиминирование в клетке происходит под действием H₂O₂ или *N*-этил-малеимида.

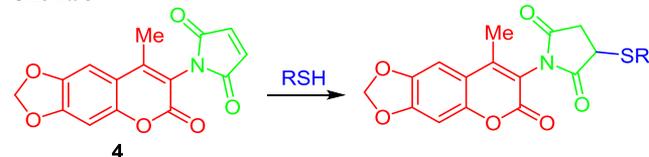
Флуоресцентный зонд **3** (схема 2) с аналогичной структурой не проявляет специфичности по отношению к GSH, а служит для определения всех трех основных биотиолов, проявляя сильную зеленую флуоресценцию в их присутствии. Молекула **3** характеризуется высокой чувствительностью по отношению к Cys, Hcy и GSH, низкие пределы обнаружения которых составляют 3.16, 0.19 и 5.15 мкМ соответственно, и отличается отсутствием цитотоксичности.⁸

Схема 2



Также универсальным для быстрого обнаружения всех трех биотиолов является водорастворимое производное кумарина **4** (схема 3), содержащее малеимидный фрагмент.⁹ После присоединения тиолов молекула проявляет сильное увеличение флуоресценции (более чем в 22 раза), тогда как присоединение аминокислот, не содержащих сульфгидрильной группы, вызывает только слабые изменения: предел обнаружения ниже 7.41 нМ для Cys, 6.06 нМ для GSH и 7.73 нМ для Hcy. Применение пробы **4** для селективного определения тиолов было успешно продемонстрировано на живых клетках.

Схема 3



Акцептором Михаэля в молекуле зонда может служить фрагмент акрилата,¹⁰ как, например, в молекуле **5** (схема 4), применяемой для определения Cys с высокой селективностью и чувствительностью. В присутствии Cys проявляются два флуоресцентных пика эмиссии при 525 и 650 нм. Более того, молекула **5** обладает малой цитотоксичностью и может быть успешно использована для флуоресцентной визуализации Cys в живых клетках. Молекула **5** представляет собой сложную кумариновую спиросструктуру. Однако флуоресценцию вызывает не первичное присоединение Cys по

Схема 4

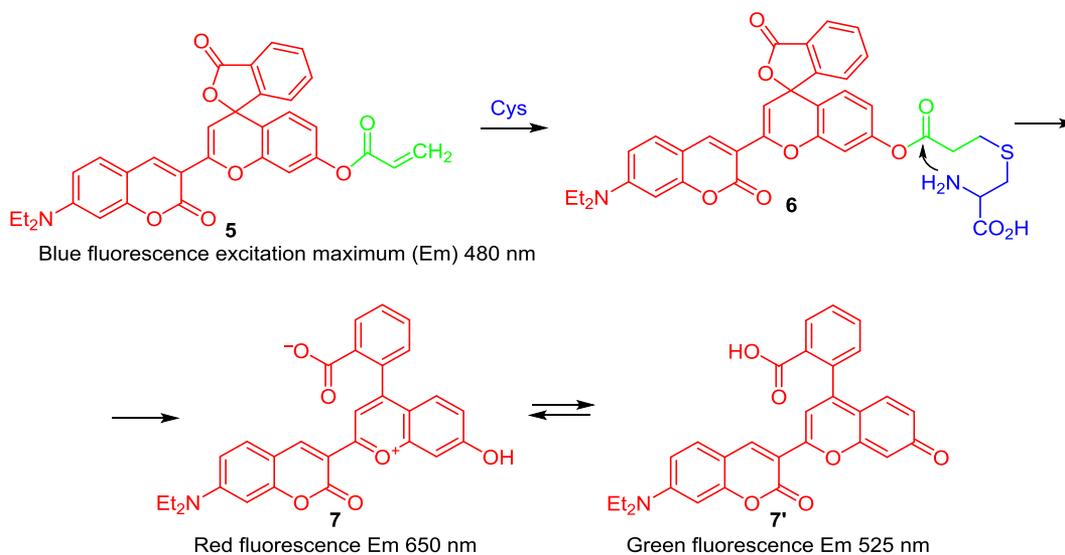
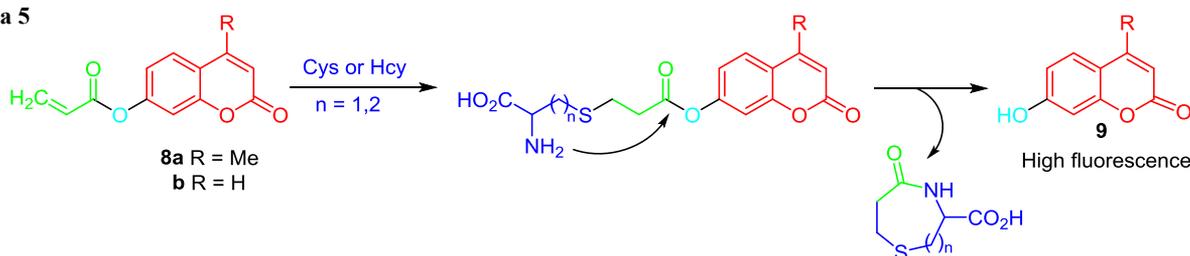


Схема 5

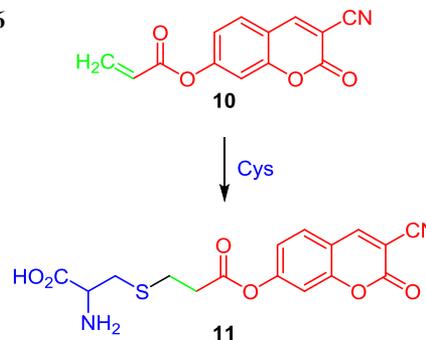


Михаэлю (соединение **6**), а последующее превращение с расщеплением сложного эфира в аддукте **6** с участием аминогруппы цистеина. Наличие таутомерного прототропного равновесия фенольной (соединение **7**) и хиноидной форм (соединение **7'**) обуславливает два пика эмиссии.

Аналогичными причинами (дальнейшими химическими превращениями после присоединения по Михаэлю) обусловлена и флуоресценция специфичных для Cys и Hcy зондов, в которых акрилоильный фрагмент находится в бензольной части молекул кумаринов **8a**¹¹ и **8b**¹² (схема 5). В этих молекулах кумариновый фрагмент выступает как флуорофор, а акриловый фрагмент представляет собой одновременно гаситель флуоресценции и электрофильную платформу для связывания с тиолом. Первоначально биогенные тиолы присоединяются к активированной двойной связи, а последующая циклизация приводит к отщеплению флуоресцентного соединения – 7-гидроксикумарина **9**. Эти соединения позволяют селективно определять Cys и Hcy при физиологическом значении pH в присутствии глутатиона и других аминокислот, дают быстрый отклик в течение 30 мин и проявляют низкие пределы обнаружения: 47.7 нМ (соединение **8a**) и 65 нМ (соединение **8b**) для Cys и 79 нМ (соединение **8b**) для Hcy. Кроме того, соединения **8a,b** обладают низкой цитотоксичностью. Хотя авторы¹¹ говорят о специфичности пробы **8a** только по отношению к Cys, в работе¹² аналогичный зонд **8b** был использован для обоих тиолов – Cys и Hcy.

Простой по строению и эффективный зонд **10** (схема 6) представляет собой 2-оксо-3-циано-2*H*-хромон-7-ил-акрилат,¹³ способный определять Cys в присутствии других биотиолов, таких как Hcy и GSH. Примечательно, что присоединение биогенных тиолов к двойной связи увеличивает интенсивность флуоресценции молекулы **10** при 450 нм в 125 раз с возбуждением при 413 нм и временем инкубации 5 мин. Молекула **10** проявляет предел обнаружения в 80 нМ и демонстрирует хорошую линейную зависимость между интенсивностью флуоресценции и концентрацией Cys в интервале от 0 до 100 мкМ. Одновременно молекула **10** малотоксична и может быть использована для визуализации в живых клетках. В отличие от изложенного выше, по мнению авторов статьи,¹³ взаимодействие молекулы **10** с биотиолом приводит к образованию продукта **11**, отвечающего за проявление флуоресценции.

Схема 6

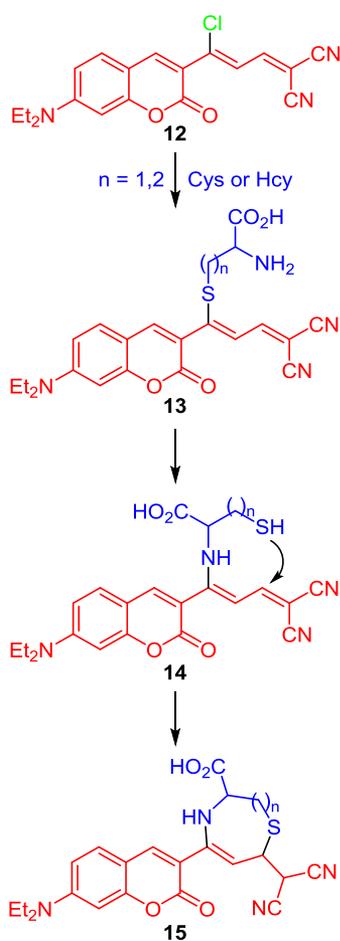


Нуклеофильное замещение биогенными тиолами

В основе флуоресцентного детектирования биогенных тиолов зондами с использованием реакции нуклеофильного замещения лежит известная высокая нуклеофильность сульфгидрильных групп и их способность легко замещать уходящие группы различной природы.

Так, молекула **12** (схема 7), содержащая атом хлора, создана для селективного определения GSH в присутствии Cys и Hcy.¹⁴ Атом хлора в этой молекуле может легко замещаться по механизму нуклеофильного замещения. Однако в случае Cys и Hcy продукт замещения **13** подвергается дальнейшим превращениям с образованием соединения **14** и затем соединения **15**, не обладающих флуоресцентными свойствами.

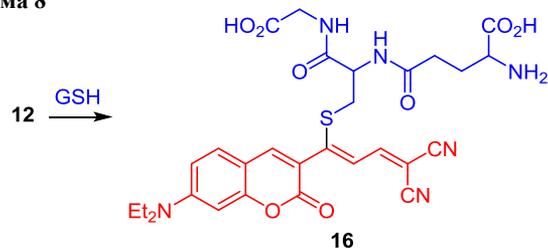
Схема 7



В случае GSH образуется только флуоресцирующий продукт **16** (схема 8) в результате замещения атома хлора тиолом. Существенное различие в механизмах действия позволяет определять GSH в присутствии Cys и Hcy путем флуоресцентного распознавания. Использование зонда позволяет определять GSH в живых клетках.

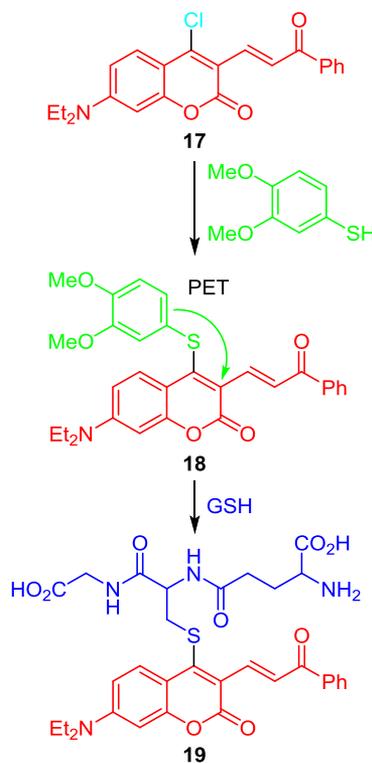
Уходящая группа может быть расположена как в боковой цепи, так и в кумариновом фрагменте. Так, замещенный 3,4-диметокситиофенолом кумариненон

Схема 8



18 (схема 9), полученный на основе хлорзамещенной кумариновой платформы **17**, использован в качестве флуоресцентного зонда для определения GSH.¹⁵ В молекуле **18** 3,4-диметокситиофенольная группа служит не только гасителем флуоресценции за счет фотоиндуцированного переноса электрона (PET – photoinduced electron transfer), чтобы обеспечить низкую фоновую флуоресценцию, но и активным центром для связывания биогенных тиолов. Зонд проявляет сильную флуоресценцию в присутствии GSH с длиной волны эмиссии 600 нм и стоксовым сдвигом 100 нм. Показана селективность зонда в отношении GSH в присутствии Cys и Hcy и других аминокислот. Зонд может быть использован в почечных клетках карциномы человека SiHa. Причина селективности пробы такая же, как и в предыдущем случае, – образование только продукта **19** нуклеофильным замещением глутатионом хорошо уходящей диметоксифенильной группы.

Схема 9



На основе 4-хлоркумарина создана флуоресцентная проба **20** (схема 10) для селективного определения Cys на фоне других тиолов и аминокислот при pH 7.2 в водных средах.¹⁶ В этом случае механизм реакции

Схема 10

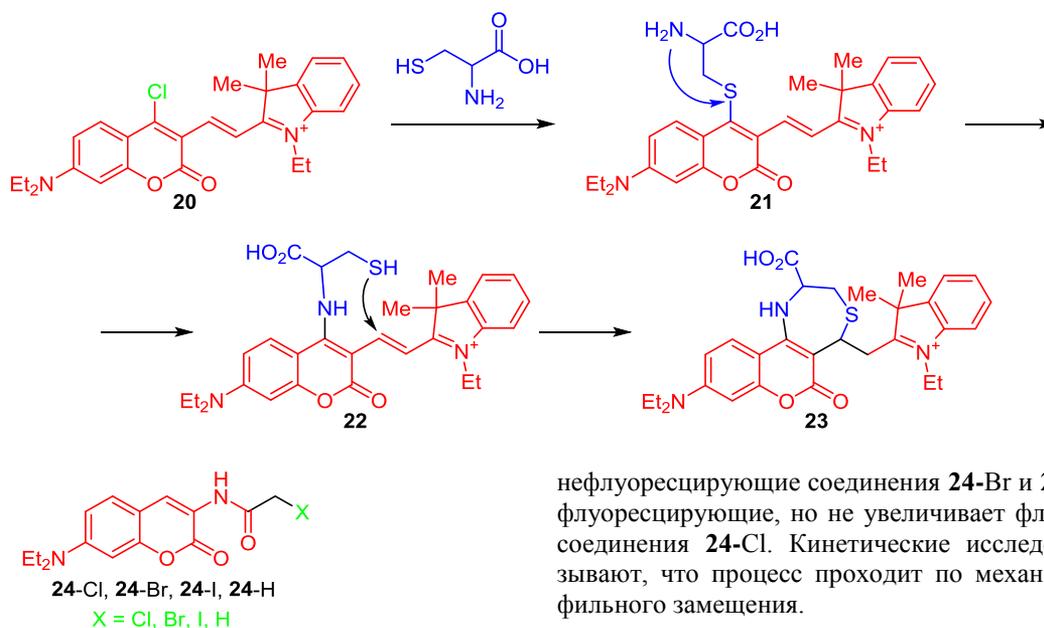


Рисунок 2. Флуоресцентные зонды, построенные по типу гашения флуоресценции.

представляет собой замещение S_NAg атома хлора на Cys (соединение 21) с последующими перегруппировкой (соединение 22) и внутримолекулярной циклизацией (соединение 23). При взаимодействии с Cys наблюдается заметное (~ в 20 раз) увеличение интенсивности флуоресценции. Молекула проявляет зеленую флуоресценцию при определении Cys в клетках цитоплазмы. По-видимому, проявление флуоресценции в этом случае обязано наличию циклического иминного заместителя в положении 4 кумарина.

Совершенно другой принцип, основанный на гашении флуоресценции, используется при применении серии флуоресцентных зондов 24 (рис. 2) с галоген-ацетиламидной группой в положении 3 кумарина для определения как эндогенных, так и экзогенных биотиолов.¹⁷

Флуоресценция самих этих молекул эффективно гасится тяжелыми атомами галогена (Br и I, но не Cl), что может быть с успехом использовано для селективного определения биогенных тиолов (Cys > GSH > Hcy) с чувствительностью намного большей, чем для тиолсодержащих протеинов. Кумариновые производные 24-Br и 24-I проявляют очень слабую флуоресценцию (квантовый выход 0.066 и 0.073 соответственно). Присоединение тяжелых атомов Br и I к кумарину приводит к заметной потере эмиссии флуоресценции. Добавление Cys быстро превращает

нефлуоресцирующие соединения 24-Br и 24-I в сильно флуоресцирующие, но не увеличивает флуоресценцию соединения 24-Cl. Кинетические исследования показывают, что процесс проходит по механизму нуклеофильного замещения.

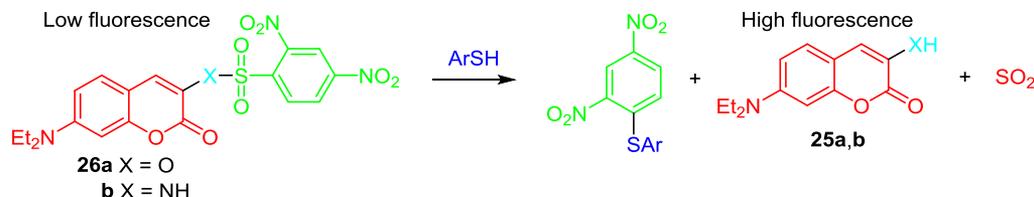
Реакции расщепления тиофенолами и биогенными тиолами сульфонамидов, сульфонатных эфиров и дисульфидов

Тиофенолы широко используются в органическом синтезе в качестве исходных соединений, но они обладают очень высокой токсичностью¹⁸ и считаются одними из самых сильных загрязнителей окружающей среды. В связи с этим проблема флуоресцентного детектирования соединений этого класса представляется весьма актуальной.

Химизм действия зондов для определения тиофенолов основан на их способности расщеплять амидные и сульфонатные связи в соответствующих производных кумарина с высвобождением сильнофлуоресцирующих гидрокси- и аминопроизводных 25a,b (схема 11). Так, были разработаны флуоресцентные зонды 26a,b для определения тиофенолов, содержащие комбинацию 3-гидрокси-7-диэтиламинокумарина в качестве флуорофора и 2,4-динитробензолсульфоната в качестве электрофильного фрагмента.¹⁹ Зонды характеризуются большим стоксовым сдвигом (113 нм) и проявляют высокую селективность и чувствительность при определении тиофенолов. Биотиолы, алифатические тиолы, включая биогенные и другие нуклеофилы, не препятствуют определению тиофенолов. Предел обнаружения тиофенола – 7.3 нМ в буферном водном растворе (pH 7.4) с добавлением ТГФ как соразтворителя.

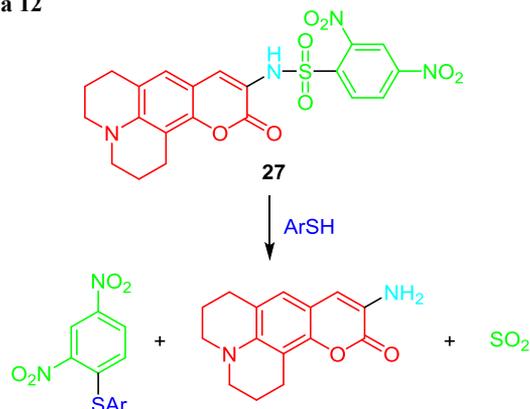
Флуоресцентный зонд для определения тиофенолов на основе конденсированной системы кумарин–

Схема 11



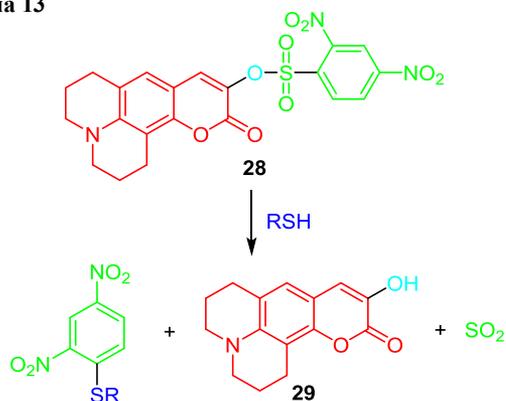
бензхинолизин – соединение **27** (схема 12) – проявляет превосходные флуоресцентные свойства, что обусловлено предотвращением вращения диэтиламинного фрагмента за счет включения его в циклическую систему.²⁰ Этот зонд позволяет определять тиофенолы с хорошей селективностью при увеличении эмиссии интенсивности флуоресценции в 700 раз при пределе обнаружения в 4.5 нМ. Зонд пригоден для определения тиофенолов в водных образцах и живых клетках.

Схема 12



Флуоресцентный зонд **28** (схема 13) аналогичный предыдущему, но используется для определения биотиолов, создан на основе гидроксикумаринового флуоресцентного красителя **29** в качестве флуорофора и 2,4-динитрофенилсульфонильного фрагмента как блока распознавания и гасителя флуоресценции. Зонд **28** проявляет высокую селективность и чувствительность к Cys, Hcy и GSH²¹ в присутствии других аминокислот и других соединений в физиологических условиях. Механизм действия заключается в вызываемой тиолами реакции S_NAr . Пределы обнаружения биотиолов составляют 17.1 нМ для Cys, 14.5 нМ для GSH и 40 нМ для Hcy. Кроме того, зонд обладает низкой цитотоксичностью и был успешно использован для визуализации биотиолов в живых клетках.

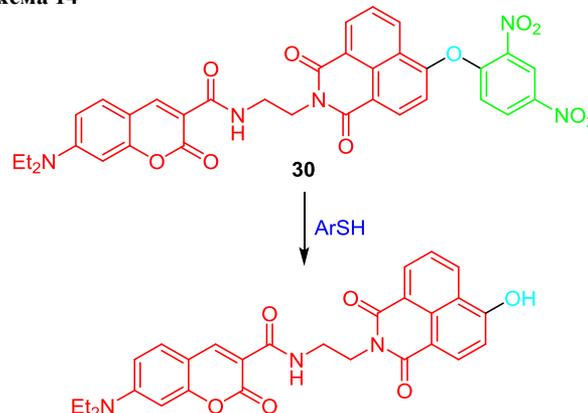
Схема 13



Зонд **30** (схема 14) для определения тиофенолов создан на основе кумариннафталимида, так же как платформы для флуоресцентного резонансного пере-

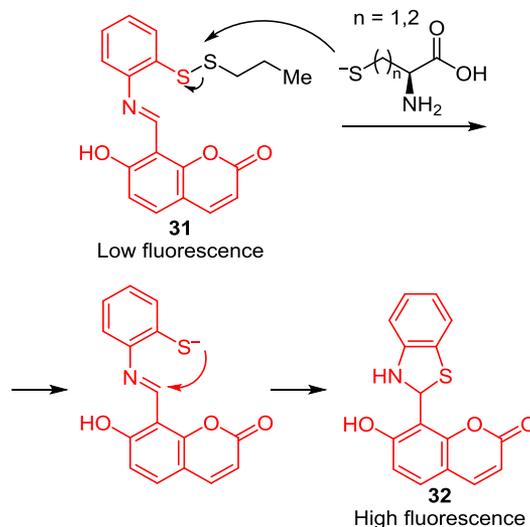
носа энергии, и динитрофенильного эфира в качестве блока распознавания.²² Зонд характеризуется высокой селективностью и чувствительностью по отношению к тиофенолам, быстрым процессом детектирования, мягкими условиями и заметным увеличением эмиссии флуоресценции (приблизительно в 340 раз).

Схема 14



Способность тиолов расщеплять связи S–S также используется при создании флуоресцентных зондов для определения биотиолов. Так, молекула **31** (схема 15) на основе кумарина содержит бисульфидную группу, расщепление этой группы биотиолами и последующая внутримолекулярная циклизация в 2,3-дигидробензтиазол (**32**) приводит к возникновению флуоресценции.²³ Проба пригодна для живых клеток и проявляет отличную селективность к Cys и Hcy с пределом обнаружения соответственно 0.8 и 0.5 мкМ в присутствии GSH и других аминокислот.

Схема 15



Литературный материал последних лет наглядно свидетельствует о перспективах практического применения производных кумарина для создания селективных, чувствительных, нетоксичных флуоресцентных зондов для определения биогенных тиолов, в том

числе и в живых клетках. Не менее важной представляется возможность использования таких кумариновых флуоресцентных сенсоров для обнаружения токсичных тиофенолов.

Обзор подготовлен при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 18-33-01100).

Список литературы

1. Estrela, J. M.; Ortega, A.; Obrador, E. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2006**, 43, 143.
2. Liu, Z.; Zhou, X.; Miao, Y.; Hu, Y.; Kwon, N.; Wu, X.; Yoon, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, 56, 5812.
3. (a) Specht, E. A.; Braselmann, E.; Palmer, A. E. *Annu. Rev. Physiol.* **2017**, 79, 93. (b) Suganya, S.; Naha, S.; Velmathi, S. *ChemistrySelect* **2018**, 3, 7231. (c) Chan, J.; Dodani, S. C.; Chang, C. J. *Nat. Chem.* **2012**, 4, 973. (d) Wu, D.; Sedgwick, A. C.; Gunnlaugsson, T.; Akkaya, E. U.; Yoon, J.; James, T. D. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46, 7105.
4. Niu, L.-Y.; Chen, Y.-Z.; Zheng, H.-R.; Wu, L.-Z.; Tung, C.-H.; Yang, Q.-Z. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 6143.
5. Ros-Lis, J. V.; García, B.; Jiménez, D.; Martínez-Mañes, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Gonzalvo, F.; Valdecabres, M. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 4064.
6. (a) Bouffard, J.; Kim, Y.; Swager, T. M.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. *Org. Lett.* **2008**, 10, 37. (b) Ji, S.; Guo, H.; Yuan, X.; Li, X.; Ding, H.; Gao, P.; Zhao, C.; Wu, W.; Wu, W.; Zhao, J. *Org. Lett.* **2010**, 12, 2876.
7. Le, M.; Means, G. E. *Anal. Biochem.* **1995**, 229, 264.
8. Liu, M.; Jiang, Q.; Lu, Z. Huang, Y.; Tan, Y.; Jiang, Q. *Luminescence* **2015**, 30, 1395.
9. Guo, L.; Yang, D.; Xia, L.; Qu, F.; Dou, Y.; Qu, F.; Kong, R. J.; You, J. *New J. Chem.* **2017**, 41, 15277.
10. Jia, X.; Niu, C.; He, Y.; Sun, Y.; Liu, H. *J. Fluoresc.* **2018**, 28, 1059.
11. Zeng, R.-F.; Lan, J.-S.; Li, X.-D.; Liang, H.-F.; Liao, Y.; Lu, Y.-J.; Zhang, T.; Ding, Y. *Molecules* **2017**, 22, 1618.
12. Wei, L.-F.; Thirumalaivasan, N.; Liao, Y.-C.; Wu, S.-P. *Spectrochim. Acta, Part A* **2017**, 183, 204.
13. Qiao, H.; Meng, Y.; Zhang, Y.; Sun, J.; Wang, T.; Zhang, X.; Wang, F.; Kang, Y. F. *Chem. Pap.* **2018**, 72, 1461.
14. Lia, X.; Huo, F.; Yue, Y.; Zhang, Y.; Yin, C. *Sens. Actuators, B* **2017**, 253, 42.
15. Liu, X.; Lv, J.; Liu, J.; Sun, Y.-Q.; Guo, W. *Chem.–Eur. J.* **2015**, 21, 4747.
16. Yang, Y.; Wang, H.; Wei, Y.-L.; Zhou, J.; Zhang, J.-F.; Zhou, Y. *Chin. Chem. Lett.* **2017**, 28, 2023.
17. Ji, W.; Ji, Y.; Jin, Q.; Tong, Q.; Tang, X. *Analyst* **2015**, 140, 4379.
18. (a) Hathaway, G. J.; Proctor, N. H. *Proctor and Hughes' Chemical Hazards of the Workplace*; Wiley-Interscience, 2014. (b) Juneja, T. R.; Gupta R. L.; Samanta, S. *Toxicol. Lett.* **1984**, 21, 185.
19. Wang, X.-B.; Zhou, J.; Zhang, D.; Wang, B. *Anal. Methods* **2016**, 8, 6916.
20. Sun, Q.; Yang, S.-H.; Wu, L.; Yang, W.-C.; Yang, G.-F. *Anal. Chem.* **2016**, 88, 2266.
21. Wang, X.-B.; Zhang, D. *Sens. Actuators, B* **2017**, 241, 327.
22. Zhai, Q.; Yang, S.; Fang, Y.; Zhang, H.; Feng, G. *RSC Adv.* **2015**, 5, 94216.
23. Liu, S.-R.; Chang, C.-Y.; Wu, S.-P. *Anal. Chim. Acta* **2014**, 849, 64.