

На правах рукописи



**Шахматов Владимир Викторович**

**ФОТОХИМИЧЕСКИЕ И ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА  
ПРОИЗВОДНЫХ ГИДРИРОВАННЫХ ФУРО- И ТИЕНИЛХИНОЛИНОВ  
И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ТИМИНОВЫМИ ОСНОВАНИЯМИ ДНК**

1.4.4. Физическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

**Научный** **Некипелова Татьяна Дмитриевна**

**руководитель:** доктор химических наук

**Официальные** **Мельников Михаил Яковлевич**

**оппоненты:** доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой химической кинетики Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

**Фёдорова Ольга Анатольевна**

доктор химических наук, профессор, заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук

**Ведущая** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт  
**организация:** «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук

Защита диссертации состоится «\_\_» октября 2022 г. в 12:00 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.038.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук по адресу: 119991, г. Москва, Ленинский проспект, д. 38 и на вебсайте: <https://biochemphysics.ru/ru/odissertacii/> Диссертация Шахматова Владимира Викторовича

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета 24.1.038.01

кандидат химических наук



Мазалецкая Лидия Ивановна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Возбужденные триплетные состояния органических веществ характеризуются повышенной энергией по сравнению с основным состоянием и временами жизни на микросекундной шкале времени. Это объясняет их высокую реакционную способность и открывает возможность для протекания многих химических реакций, невозможных в основном состоянии, в том числе реакции с триплетной молекулой кислорода с образованием реакционноспособного синглетного кислорода и реакции [2+2]-фотоциклоприсоединения между двойной связью триплета и двойной связью другого соединения с образованием ковалентного циклобутанового цикла.

Настоящая работа посвящена исследованию фотохимических и фотофизических свойств новых фууро- и тиенил-замещенных гидрированных хинолинов и их реакциям с тиминовыми основаниями ДНК. Аннелирование фуранового кольца к фенильному циклу известных нетоксичных антиоксидантов из числа дигидрохинолинов приводит к резкому увеличению выхода триплетного состояния этих соединений и появлению новых направлений реакций фотовозбужденных состояний, в том числе и реакции [2+2]-фотоциклоприсоединения. Известно, что реакции [2+2]-фотоциклоприсоединения играют важную роль в ПУВА-терапии кожных заболеваний с использованием фурокумаринов (псораленов).

Среди множества существующих заболеваний человека, большой дискомфорт и снижение качества жизни пациента вызывают аутоиммунные, дерматологические заболевания. Наиболее распространенными кожными заболеваниями во всем мире являются псориаз, склеродермия, витилиго, морфея, атопический дерматит, экзема и другие. Псориаз в своей хронической форме с проявлением поражений кожи встречается приблизительно у 2 % населения всего земного шара. Большое внимание среди медиков и ученых к вопросу кожных заболеваний также вызвано ростом их числа в крупных городских агломерациях. В этой связи, снижение количества пациентов с проявлениями кожных патологий представляется весьма актуальной задачей.

Широкое медикаментозное применение в лечении кожных заболеваний нашел метод фотохимиотерапии называемый ПУВА-терапия. Название метода произошло от сочетания начальных английских букв, используемой комбинации фотосенсибилизирующего вещества, как правило, это линейные псоралены (например, 8-метоксипсорален), и ультрафиолетового излучения УФ-А диапазона (320–400 нм). Псоралены представляют собой линейные трициклические ароматические соединения класса кумаринов, состоящие из фуранового пятичленного цикла, конденсированного с кумариновым бициклом, содержащим

гетероатомы кислорода. В настоящее время в фармакопею входят псораленсодержащие лекарственные средства как растительного (например, препарат Аммифурин производства ЗАО Фармцентр ВИЛАР), так и синтетического происхождения (препараты Оксорален и Меланоцил, Franco-Indian Pharmaceuticals Pvt Ltd). В литературе подробно описан механизм терапевтического воздействия псораленов на клетки кожи больного человека, который связан в основном с образованием продукта [2+2]-фотоциклоприсоединения между триплетом псоралена и тиминовым основанием ДНК.

Как побочный эффект от ПУВА-терапии развивается эритема (солнечный ожог), сухость кожи, сопровождающаяся зудом, отеком, вплоть до развития буллезных поражений. К отдаленным побочным эффектам относят фотостарение кожи, формирование катаракты и др. В результате длительного терапевтического применения псораленов был обнаружен их фотоцитотоксичный эффект, который может приводить к точечным мутациям и раковым заболеваниям. Полагают, что именно способность псораленов при фотовозбуждении образовывать ковалентные связи (кросс-сшивки) между двумя пиримидиновыми основаниями, расположенными на противоположных нитях ДНК, является причиной нарушения клеточной пролиферации с возможным дальнейшим развитием онкологических заболеваний. При использовании 8-метоксипсоралена (8-MOP) в качестве фотосенсибилизатора в ПУВА-терапии наблюдается увеличение в 16 раз вероятности плоскоклеточного рака для пациентов с 1-м типом кожи, что ограничивает применение этого метода в фотомедицине и особенно при лечении дерматологических заболеваний (псориаз, витилиго).

Предположено, что азотсодержащие гетероциклические соединения, являющиеся производными гидрированных фууро- и тиенохинолинов, могут потенциально стать аналогами применяемых в настоящий момент псораленов. Известно, что эти соединения проявляют выраженные антиоксидантные свойства. В то же время, важным критерием замены псораленов на аналоги является способность потенциального препарата поглощать свет в диапазоне 320–400 нм, так как, во-первых, указанный спектр светового излучения проникает в наиболее глубокие слои дермы, а во-вторых, наименее фототоксичен для клеток кожи человека. Также потенциальный препарат должен образовывать фотовозбужденное триплетное состояние. Эта способность вызывает повышенный интерес, так как именно из этого состояния псорален, предварительно интеркалированный в макромолекулу ДНК в темновой фазе, взаимодействует своей двойной связью с тиминовым основанием ДНК по механизму реакции [2+2]-фотоциклоприсоединения с образованием ковалентно связанного циклобутанового кольца. Исходные дигидрохинолины (ДГХ) имеют низкий квантовый выход триплетного состояния, именно поэтому было предложено увеличить электронное

сопряжение в ароматическом гетероцикле посредством добавления тиенильного или фуранового кольца к системе. Введение аннелированного пятичленного кольца с двойной связью в структуру ДГХ должно приводить к увеличению  $\pi$ -электронной системы, т.к. двойная связь в аннелированном пятичленном фурановом кольце сопряжена с бензольным кольцом хинолинового фрагмента (образуется общая  $\pi$ -электронная система), что увеличивает S–T расщепление и понижает возбужденный триплетный уровень. В результате у молекул фуро- и тиенилпроизводных гидрированных хинолинов нижним возбужденным состоянием становится  $\pi$ - $\pi^*$ -триплетное состояние, реакционная способность которого на много порядков выше основного синглетного состояния и это приводит к возможности реакции фотоциклизации с образованием циклобутанового фрагмента при взаимодействии с соединениями, имеющими двойную связь.

**Целью настоящей диссертационной работы** является исследование фотохимических и фотофизических свойств новых соединений: фуро- и тиенилпроизводных гидрированных хинолинов, механизма взаимодействия триплетов этих соединений с тиминовыми основаниями ДНК и оценка возможности дальнейшего исследования этих соединений для потенциального применения в фотомедицине на основе метода ПУВА-терапии.

Для выполнения этой цели были **поставлены следующие задачи**:

1. исследование оптических и флуоресцентных свойств фуро- и тиенилпроизводных гидрированных хинолинов в различных растворителях;
2. исследование фотопревращений указанных соединений под действием УФ-А света на воздухе и в отсутствие кислорода с анализом продуктов превращения;
3. исследование методами импульсного фотолиза триплетного состояния исследуемых соединений;
4. исследование методами импульсного и стационарного фотолиза взаимодействия триплетов с тиминовыми основаниями ДНК и анализ продуктов этого взаимодействия методами HPLC и ESI-MS;
5. определение темновой и фотоцитотоксичности фуродигидрохинолинов.

**Объектом** исследования являлись производные гидрированных фуро- и тиенилхинолинов и их фотоаддукты с тиминовыми основаниями ДНК.

**Предмет исследования:** спектрально-кинетические характеристики возбужденных состояний исследуемых веществ в органических растворителях и воде, их фотопревращений и анализ фотоаддуктов с тиминовыми основаниями ДНК.

**Научная новизна работы** заключается в том, что были определены спектрально-кинетические характеристики серии новых соединений производных гидрированных фуро- и

тиенилхинолинов. Определены процессы и реакции, протекающие в растворах при фотовозбуждении исследуемых веществ. Обнаружено их возбужденное триплетное состояние и установлен диапазон энергии низшего триплетного уровня. Получены и охарактеризованы фотоаддукты взаимодействия исследуемых веществ с тиминовыми основаниями ДНК, оценена их темновая и фотоцитотоксичность на культуральных клетках.

**Теоретическая и практическая значимость работы** заключается в том, что впервые были изучены спектрально-люминесцентные свойства производных гидрированных фууро- и тиенилхинолинов, оценены квантовые выходы флуоресценции исследуемых веществ в различных растворителях. Были охарактеризованы процессы и фотохимические реакции, протекающие в растворах исследуемых веществ. Оценен вклад возбужденного триплетного состояния исследуемых соединений в радикальные реакции. Показано образование моноаддуктов в результате их присоединения к тиминовым основаниям ДНК в ходе фотохимической реакции, без образования диаддуктов. Установлена низкая темновая цитотоксичность и высокая фотоцитотоксичность с гибелью клеток на модельной линии клеток НСТ116 и МСF-7.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Фууро- и тиенилпроизводные гидрированных хинолинов при фотовозбуждении светом УФ-А диапазона образуют триплетные состояния с высоким квантовым выходом.
2. Триплетные возбужденные состояния фууродигидро- и фууротетрагидрохинолинов (ФДГХ, ФТГХ) играют определяющую роль в фотохимических реакциях в различных растворителях, в том числе в реакциях образования аминильных радикалов.
3. Триплетные состояния ФДГХ взаимодействуют с тиминовыми основаниями ДНК по механизму [2+2]-циклоприсоединения с образованием моноаддуктов без образования диаддуктов.
4. Все исследованные соединения не обладают темновой цитотоксичностью, ФДГХ проявляют фотоцитотоксичность при облучении светом УФ-А диапазона. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего исследования ФДГХ в качестве препаратов для ПУВА-терапии.

**Методология и методы исследования.** В настоящей диссертационной работе использовали методы спектрофотометрии, флуориметрии, стационарного фотолиза, импульсного лампового и лазерного фотолиза, масс-спектрометрии, хроматографии и другие. Это позволило всесторонне и полно описать исследуемые явления.

**Личный вклад автора.** Все использованные в диссертационной работе результаты были получены либо автором лично, либо при его непосредственном участии. Автор участвовал во всех этапах исследования от постановки задач и цели до адаптации

использованных методов, получения экспериментальных данных, проведения обработки и интерпретации результатов и написания статей.

**Результаты работы** были представлены на 13-м Европейском симпозиуме по органической реакционной способности ESOR-2011 (г. Тарту, Эстония, 10–17 сентября 2011 г.), XXIV IUPAC Symposium on Photochemistry (г. Коимбра, Португалия, 15–20 июля 2012 г.), XII Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» (г. Москва, Россия, 29–31 октября 2012 г.), XV Conference on Heterocycles in Bio-organic Chemistry (г. Рига, Латвия, 27–30 мая, 2013), XXXI Симпозиуме «Современная химическая физика» (г. Туапсе, Россия, 16–25 сентября 2019 г.).

**Связь работы с научными программами и проектами.** Работа выполнена в рамках программы «Биомолекулярная и медицинская химия» отделения «Химия и наука материалов» фундаментальных исследований Российской Академии наук, «Фундаментальные науки медицине» и при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, ГК № 16.512.11.2138.

**Степень достоверности полученных результатов** подтверждена достаточным объемом данных, а также использованием при проведении научной работы современных методов исследования и статистического анализа.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 10 работ: из них 5 статей в российских журналах из списка ВАК, индексируемых в базах данных Web-of-Science и Scopus, и 5 публикаций в сборниках тезисов докладов научных конференций.

**Структура и объем работ:** диссертационная работа состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 120 страницах и включает 2 таблицы, 12 схем и 49 рисунков.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснованы актуальность темы работы, выбор объектов исследования, сформулирована основная цель и задачи, обозначена научная новизна, практическая значимость и положения, выносимые на защиту.

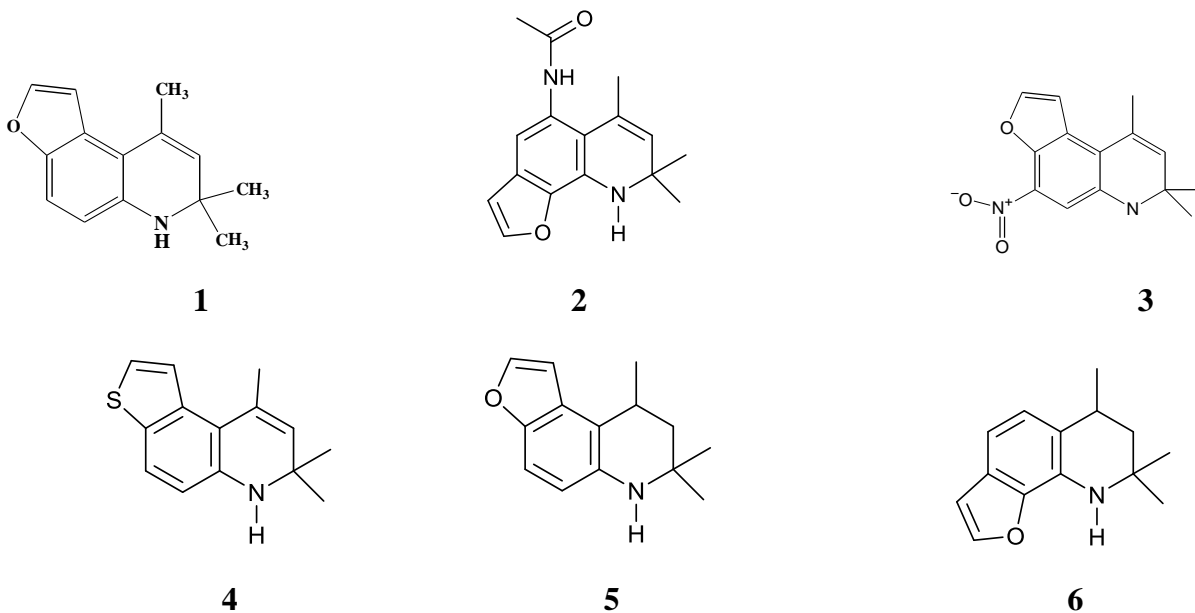
### Глава 1. Обзор литературы

Обзор литературы состоит из двух частей. В первой затронуты вопросы терапии распространенных кожных заболеваний, таких как псориаз, атопический дерматит, витилиго с использованием метода ПУВА-терапии. Представлены современные представления о фотофизических и фотохимических свойствах псораленов и роли триплетного состояния в фототерапии кожных заболеваний. Выявлена актуальность поиска новых лекарственных соединений, аналогов псораленов. Определены требования к потенциальным препаратам.

Во второй части, освещены современные направления поиска новых фотосенсибилизаторов для ПУВА-терапии. В заключении литературного обзора высказано предположение о перспективности исследования новых фуру- и тиенилпроизводных дигидро- и тетрагидрохинолинов в качестве потенциальных препаратов для ПУВА-терапии.

## Глава 2. Материалы и методы

В ходе изучения возможности использования производных гидрированных фуру- и тиенохинолинов в качестве фотосенсибилизаторов был разработан и впервые осуществлен синтез 6 соединений: производных фурудигидрохинолинов **1–3** (ФДГХ), тиенодигидрохинолина **4** (ТДГХ) и фурутетрагидрохинолинов **5** и **6** (ФТГХ).



Исследование фотохимических и фотофизических свойств соединений **1–6** и их взаимодействия с тимидин монофосфатом (ТМР) проводили методами спектрофотометрии, флуориметрии, импульсного лазерного и лампового фотолиза. Анализ продуктов фотолиза проводили методом аналитической ВЭЖХ. Продукты выделяли методом препаративной ВЭЖХ. Фотолизат до разделения продуктов и выделенные продукты анализировали методом масс-спектрометрии. Темновую и фотоцитотоксичность исследовали в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

## Глава 3. Фотохимические и фотофизические свойства фуру- и тиено-производных гидрированных хинолинов

Глава 3 посвящена исследованию спектральных свойств исследуемых соединений и их фотохимических и фотофизических свойств. Спектры поглощения соединений **1, 2** и **4** на основе дигидрохинолинов имеют три полосы поглощения в УФ-области спектра с максимумом длинноволновой полосы в области 340–370 нм (Рисунок 1 (а) спектры **1, 2** и **4**,



Таблица 1). Спектр поглощения соединения **3** с нитрогруппой имеет интенсивную полосу поглощения в видимой области ( $\lambda_{max} = 469$  нм). Спектры поглощения ФТГХ **5** и **6** сдвинуты в коротковолновую область и имеют длинноволновый максимум поглощения около 300 нм (Рисунок 1 (б) спектры 5 и 6, Таблица 1). Длинноволновые и коротковолновые максимумы поглощения этих соединений близки к соответствующим максимумам исходных гидрированных хинолинов. В случае соединения **6** длинноволновая полоса поглощения имеет вид плеча полосы поглощения в области 250–300 нм. Коротковолновый сдвиг этой полосы обусловлен водородной связью между кислородом фуранового цикла и водородом группы NH. Максимумы поглощения в области 250–300 нм являются характерными для соединений с аннелированными фуру-группами.

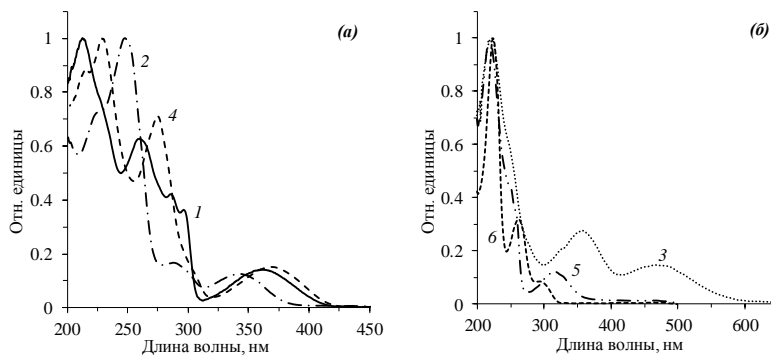


Рисунок 1 – Нормированные по коротковолновой полосе спектры поглощения соединений в метаноле (нумерация спектров соответствует номерам соединений) (а): 1 (сплошная линия), 2 (пунктир-точка), 4 (пунктир); в этаноле (б): 3 (точки), 5 (пунктир-две точки), 6 (квадратные точки)

Таблица 1 – Спектрально-люминесцентные свойства соединений **1–6**

| Вещество | Растворитель | $\lambda_{max}$ , нм | $\epsilon$ , $M^{-1}cm^{-1}$ | $\lambda_{фл}$ , нм | $\phi^f$ | Стоксов сдвиг, $cm^{-1}$<br>(нм) |
|----------|--------------|----------------------|------------------------------|---------------------|----------|----------------------------------|
| <b>1</b> | EtOH         | 362                  | 3160                         | 438                 | 0.27     | 5020 (76)                        |
|          |              | 260                  | 14140                        |                     |          |                                  |
|          |              | 213                  | 22400                        |                     |          |                                  |
| <b>2</b> | EtOH         | 341                  | 3100                         | 417                 | 0.18     | 5344 (76)                        |
|          |              | 288                  | 4250                         |                     |          |                                  |
|          |              | 248                  | 29200                        |                     |          |                                  |
| <b>3</b> | EtOH         | 469                  | 3440                         | —                   | —        | —                                |
|          |              | 356                  | 6366                         |                     |          |                                  |
|          |              | 222                  | 24000                        |                     |          |                                  |
| <b>4</b> | MeOH         | 368                  | 2500                         | 436                 | 0.2      | 4240 (68)                        |
|          |              | 275                  | 11700                        |                     |          |                                  |
|          |              | 229                  | 16500                        |                     |          |                                  |
| <b>5</b> | EtOH         | 315                  | 2430                         | 380                 | 0.18     | 5430 (76)                        |
|          |              | 220                  | 21760                        |                     |          |                                  |
| <b>6</b> | EtOH         | 295                  | 2180                         | 411                 | 0.12     | 9570 (116)                       |
|          |              | 262                  | 8125                         |                     |          |                                  |
|          |              | 225                  | 26240                        |                     |          |                                  |

Квантовые выходы флуоресценции для соединений **1**, **2**, **4** и **5** (Таблица 1) близки между собой и сопоставимы с квантовыми выходами флуоресценции изученных ранее дигидрохинолинов. Для соединения **6** квантовый выход флуоресценции несколько ниже, при этом наблюдается относительно большой Стоксов сдвиг, что обусловлено особенностями его строения. Соединение **3** с нитрогруппой аналогично нитрозамещенным дигидрохинолинам не флуоресцирует. Для соединений **1**, **2**, **4–6** наблюдается характерный для соединений такого рода батохромный сдвиг полосы эмиссии и гипсохромный сдвиг полосы возбуждения флуоресценции при переходе от неполярного гексана к полярным протонным растворителям (Рисунок 2). При этом исчезает колебательная структура спектра эмиссии в гексане. Величина Стоксова сдвига для **1** увеличивается от гексана к метанолу от  $3360\text{ см}^{-1}$  до  $5400\text{ см}^{-1}$ . Кроме увеличения полярности среды, в этом явлении может играть роль также возможность образования водородных связей с протонным растворителем.

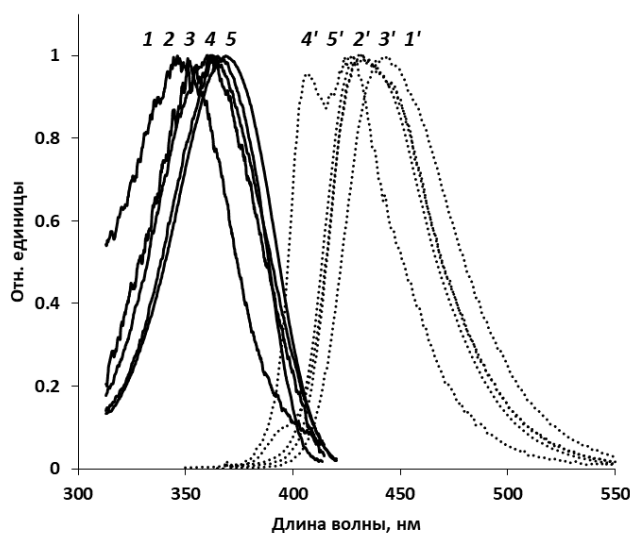


Рисунок 2 – Нормированные спектры флуоресценции (точки) и спектры поглощения (сплошные линии) соединения **1** в различных растворителях: *1, 1'* – вода; *2, 2'* – метанол; *3, 3'* – этанол; *4, 4'* – гексан; *5, 5'* – ацетонитрил

Исследование фотохимических превращений соединений **1–6** методом стационарного фотолиза при облучении растворов светом УФ-А диапазона показало, что эти превращения протекают различными путями и зависят как от строения самого соединения и растворителя, так и от наличия кислорода в реакционной кювете. Для ФДГХ **1**, **2** и ТДГХ **4** процесс стационарного фотолиза протекает аналогично. В метаноле реакция фотолиза **1** заканчивается в течение 120 мин в отсутствие кислорода, в то время как на воздухе продолжается более трех часов, что указывает на то, что относительный квантовый выход фотолиза **1** выше в отсутствие  $\text{O}_2$  (Рисунок 3). При этом он существенно ниже, чем в случае производных ДГХ, для которых при аналогичных условиях реакция завершается практически полностью менее чем за 30 мин. Наличие изобестических точек означает, что в результате фотолиза образуется либо один продукт, либо несколько продуктов образуются в параллельных реакциях, и соотношение между этими продуктами не меняется в процессе

фотолиза. В апротонных растворителях главным образом образуются димерные продукты, спектры поглощения которых близки к спектрам поглощения исходных соединений, так как структура димера состоит из двух фрагментов исходного вещества, а в протонных растворителях, таких как вода и спирты образуются аддукты присоединения растворителя по двойной связи гетероцикла.

Соединение **3** фотостабильно и не претерпевает изменений в процессе стационарного фотолиза при облучении светом как видимого, так и УФ-диапазона аналогично изученным ранее ДГХ с нитрогруппой.

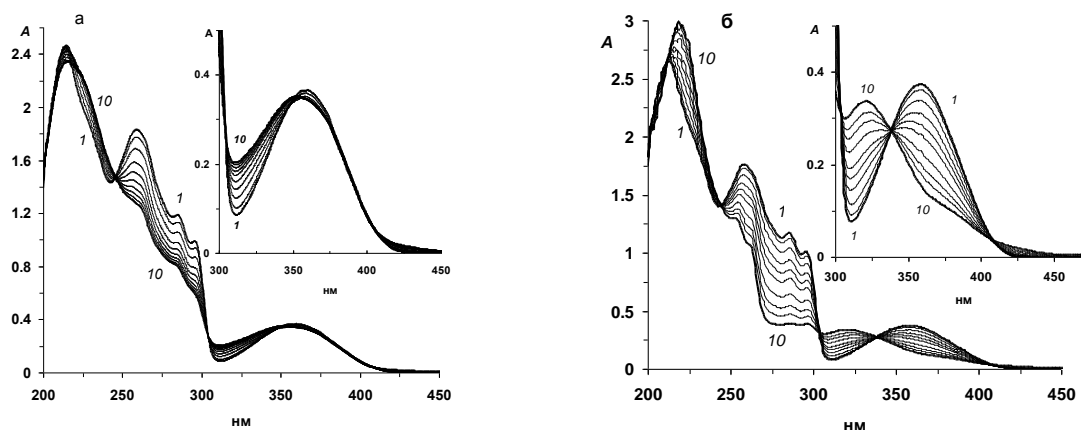


Рисунок 3 – Эволюция спектров поглощения ФДГХ **1** в процессе стационарного фотолиза в метаноле (а) в атмосфере аргона, время, мин: (1) 0, (2) 5, (3) 15, (4) 30, (5) 45, (6) 60, (7) 75, (8) 90, (9) 105, (10) 120; (б) на воздухе, время, мин: (1) 0, (2) 5, (3) 15, (4) 30, (5) 45, (6) 60, (7) 90, (8) 120, (9) 150, (10) 210

При фотолизе ФТГХ **5** и **6** наблюдали небольшие изменения спектров поглощения, которые выражаются в сдвиге максимумов поглощения на 1–2 нм и небольшом падении оптической плотности. В целом процессы, протекающие при фотовозбуждении исследуемых соединений, можно представить на примере соединения **2** (Схема 1).

При фотовозбуждении соединений **1**, **2**, **4** в протонных растворителях в нерелаксированном возбужденном состоянии  $S_1^{FC}$  происходит перенос протона через растворитель от группы NH к атому  $C_3$  с последующим образованием карбкатиона и продукта присоединения ROH (Схема 1, последовательность реакций (II)), как это происходит в случае ДГХ). Характер изменений спектров поглощения при стационарном фотолизе в метаноле и воде в присутствии кислорода показывает, что основным процессом для ФДГХ является образование продукта присоединения метанола или воды к двойной связи дигидрохинолинового фрагмента. В атмосфере аргона скорость фотолиза незначительно увеличивается, что связано с процессом образования аминильных радикалов из триплетного состояния фуродигидрохинолинов (Схема 1, реакция (III)) с их последующей

димеризацией. В ацетонитриле и гексане в атмосфере аргона фотолиз происходит существенно медленнее, чем в метаноле, и основным процессом является образование димерных продуктов из аминильных радикалов (Схема 1, реакция (III)).

Предположения по направлениям протекания фотохимических процессов в соответствии с процессами, указанными на Схеме 1, были подтверждены экспериментально. Для этого фотолизаты **1** в метаноле и воде были проанализированы методом ВЭЖХ и масс-спектрометрии. Основные продукты фотолиза в присутствии воздуха имеет молекулярную массу 245 ( $MH^+$  246.1) и 231 ( $MH^+$  232.1) в метаноле и воде соответственно, что соответствует продукту присоединения растворителя к соединению **1**. В воде наряду с продуктом присоединения определен продукт с молекулярной массой 424 ( $MH^+$  425.2), соответствующей димеру, образовавшемуся при рекомбинации двух аминильных радикалов из **1**.

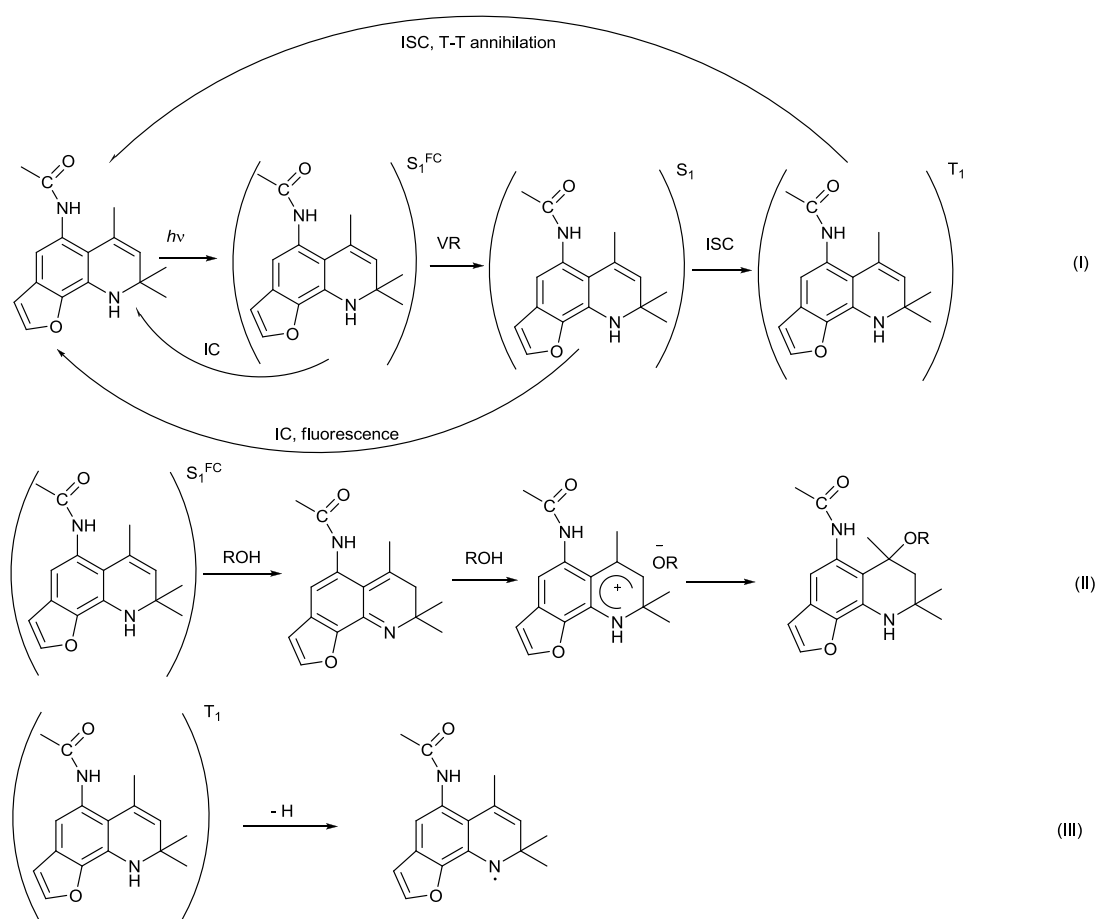


Схема 1 – Направления протекания фотохимических процессов для ФДГХ 2

Форма конечных спектров поглощения, полученных при фотолизе **1** в метаноле в присутствии и отсутствие  $O_2$  (Рисунок 3) позволяет предположить, что в присутствии  $O_2$  основным продуктом является аддукт метанола и **1**, соответствующий 9-метокси-7,7,9-триметил-6,7,8,9-тетрагидрофуро[3,2-f]хинолину, а в отсутствие  $O_2$  образуется димер. Сопоставление конечного спектра, полученного при фотолизе **1** в присутствии  $O_2$ , со

спектром поглощения **5** показывает совпадение длинноволновой ( $\lambda_{\max}=320$  нм) и коротковолновой ( $\lambda_{\max}=220$  нм) полос поглощения этих соединений. В промежуточной области (240–275 нм) в спектре **1** появляется колебательная структура, которая четко выражена в спектре поглощения **5**. В отсутствие кислорода основным продуктом является димер, спектр которого имеет длинноволновый и коротковолновый максимумы поглощения, близкие к максимумам поглощения **1**, а также поглощение в видимой области. Изменение состава продуктов фотолиза с одновременным увеличением квантового выхода реакции при переходе от воздушно-насыщенного раствора, где эффективно протекает процесс тушения триплетных состояний кислородом к раствору, насыщенному аргоном (в отсутствие кислорода), свидетельствует об участии триплетных состояний в реакции образования продуктов. Незначительные изменения в спектрах ФТГХ **5** и **6** при фотолизе независимо от растворителя означают, что для этих соединений, процесс происходит по реакциям (I) и (III) (Схема 1) через образование аминильных радикалов.

Методом лампового импульсного фотолиза вакуумированных растворов соединений **1**, **2** и **5** с возбуждением длинноволновой полосы поглощения во всех растворителях было зарегистрировано образование короткоживущего промежуточного продукта со спектром поглощения с  $\lambda_{\max} = 620\text{--}640$  нм и временем жизни  $\sim 200$  мкс. Этот интермедиат не наблюдали при фотовозбуждении на воздухе, что является важным доводом в пользу предположения о том, что это триплетное состояние. Максимальный выход триплетного состояния наблюдали в MeOH и минимальный в гексане.

Для доказательства триплетной природы интермедиата были проведены опыты по переносу триплетной энергии с донора на соединение **1** (Схема 2) и с **1** на акцептор триплетной энергии (Схема 3).

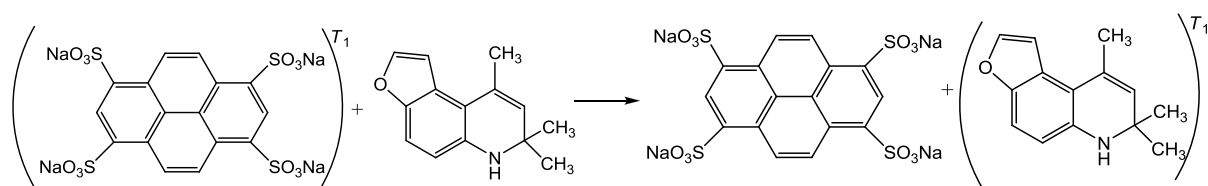


Схема 2 – Перенос триплетной энергии с донора на ФДГХ **1**

В качестве донора триплетной энергии использовали тетранатриевую соль сульфобенз(а)пирена (**SBP**), триплетное состояние которой имеет время жизни около 100 мкс. Фотовозбуждение водных растворов, содержащих **1** и **SBP**, проводили с использованием фильтра УФС-5, с максимумом пропускания 360–365 нм. Поскольку оба соединения поглощают в области пропускания светофильтра, то под действием светового импульса происходит возбуждение как **1**, так и **SBP**.

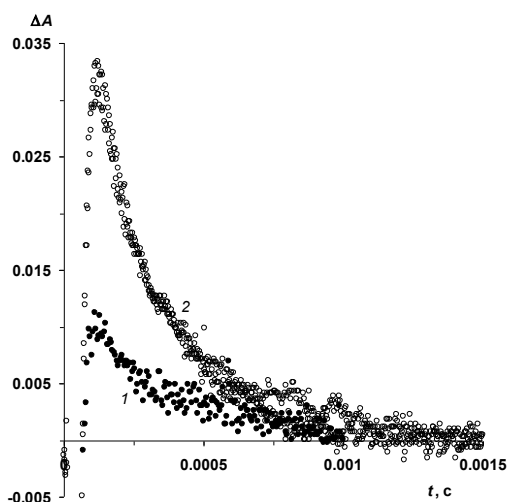


Рисунок 4 – Гибель промежуточного поглощения при возбуждении вакуумированного водного раствора ФДГХ **1** (1) без добавок и (2) в присутствии сульфобензпирена; ламповый импульсный фотолиз,  $\lambda_{\text{возб}}$  300–400 нм,  $\lambda_{\text{рег}}$  660 нм

В водном растворе в присутствии SBP триплет-триплетное поглощение в области 600–660 нм увеличилось почти в три раза (Рисунок 4, 2). Это увеличение поглощения не может быть отнесено к вкладу триплет-триплетного поглощения SBP, поскольку его спектр триплет-триплетного поглощения имеет максимум около 460 нм.

В качестве акцептора триплетной энергии использовали 3,3'-диэтил-2,2'-тиакарбоцианин йодид (Краситель №20, Схема 3,  $\lambda_{\text{max}} = 550$  нм,  $\epsilon = 1.5 \times 10^5$  л моль<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>). На рисунке 5 представлена кривая выцветания в максимуме поглощения красителя при импульсном фотовозбуждении вакуумированного раствора, содержащего соединение **1** и краситель в метаноле. Возбуждение проводили светом  $\lambda_{\text{возб}}$  в области 300–400 нм, в которой краситель не поглощает. Отчетливо видно выцветание поглощения красителя за счет образования триплетного состояния с последующей регенерацией красителя.

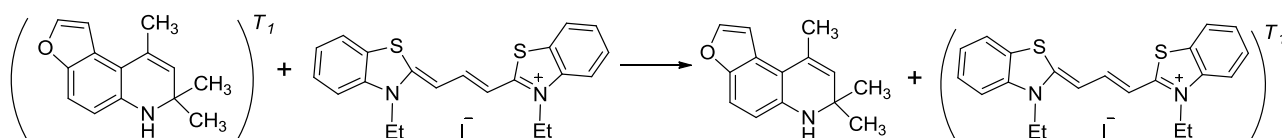


Схема 3 – Перенос триплетной энергии с ФДГХ **1** на акцептор

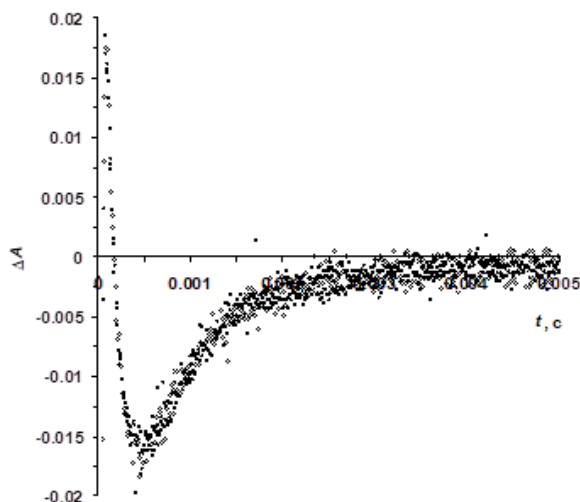


Рисунок 5 – Выцветание цианинового красителя ( $8.6 \times 10^{-5}$  моль/л) на длине волны 550 нм в вакуумированном растворе метанола с ФДГХ **1** ( $10^{-3}$  моль/л) после импульсного возбуждения в области 300–400 нм

Таким образом, прямое фотовозбуждение **1**, а также опыты с переносом триплетного

возбуждения с **1** на акцептор и с донора триплетной энергии на **1** однозначно свидетельствуют о том, что наблюдаемое поглощение в области 600–700 нм относится к триплетному состоянию **1**. Уровни триплетной энергии цианинового красителя и SBP составляют  $14700 \text{ см}^{-1}$  и  $19000 \text{ см}^{-1}$  соответственно. Следовательно, энергия триплетного состояния **1** находится в этом интервале значений, что сопоставимо с величиной энергии первого триплетного уровня ДГХ, для которых эта величина составляет  $\sim 16000 \text{ см}^{-1}$ .

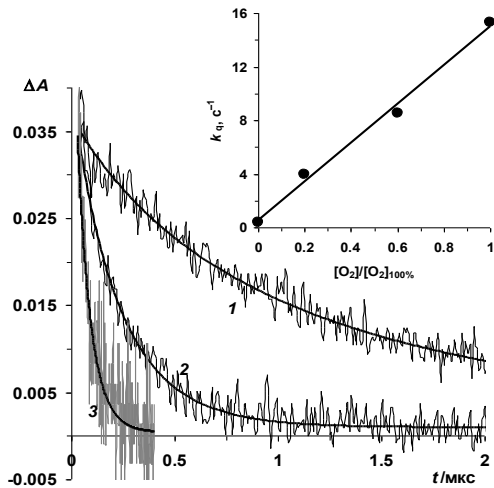


Рисунок 6 – Кривые гибели триплетного поглощения ФДГХ **1** в атмосфере аргона (1), воздуха (2) и кислорода (3), сплошные гладкие линии – результат обработки экспериментальных данных в предположении гибели триплетного состояния по реакциям первого и второго порядка; вставка: зависимость константы скорости первого порядка тушения триплетного состояния от концентрации кислорода.

Методом лазерного импульсного фотолиза была исследована зависимость скорости гибели триплетов ФДГХ **1** и **2** от концентрации кислорода (Рисунок 6). Энергия импульса в экспериментах по лазерному фотолизу существенно выше, чем в экспериментах по ламповому импульсному фотолизу, что приводит к резкому увеличению выхода триплетного состояния. Кривые гибели триплетного состояния в атмосфере аргона, на воздухе и в кислород–воздушных смесях хорошо описываются в предположении параллельной гибели по реакциям второго и первого порядка (Рисунок 6). Это означает, что существенный вклад в реакцию вносит триплет-триплетная аннигиляция. Гибель по реакции первого порядка в отсутствие кислорода может происходить в результате интеркомбинационной конверсии (ИКК) в основное состояние и фотохимической реакции с образованием аминильного радикала. Из обработки экспериментальных данных по гибели триплетного состояния была вычислена бимолекулярная константа скорости  $T-T$  аннигиляции, включающая коэффициент экстинкции на длине волны регистрации (620 нм),  $k_{T-T}/\epsilon_{620} \approx 1 \times 10^7 \text{ л см с}^{-1}$ . В предположении, что  $\epsilon_{620} \geq 10^2 \text{ мол}^{-1} \text{ см}^{-1}$ , можно утверждать, что  $T-T$  аннигиляция происходит с константой скорости, близкой по значениям к диффузионной константе.

В атмосфере кислорода гибель триплетного состояния происходит практически полностью в результате взаимодействия с кислородом по реакции первого порядка. Из зависимости константы скорости первого порядка от концентрации кислорода (Рисунок 6, вставка) была оценена бимолекулярная константа скорости взаимодействия триплетного

состояния **1** с кислородом, которая близка к диффузионной и составляет  $\sim 2.5 \times 10^9$  л моль<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup>. Взаимодействие триплетного состояния фуридигидрохинолинов с кислородом приводит к образованию синглетного кислорода, что было установлено при регистрации характерного спектра люминесценции в ближней ИК-области спектра.

#### Глава 4. Реакции ФДГХ с тиминовыми основаниями ДНК

Образование триплетных состояний ФДГХ и ФТГХ с высоким квантовым выходом позволяет предполагать, что аналогично псораленам они будут взаимодействовать с тиминовыми основаниями ДНК, и это может приводит к фототоксическим эффектам. Методом лазерного импульсного фотолиза показано, что добавление тимидин 5'-монофосфата (ТМР) в обескислороженные растворы ФДГХ **1** и **2** приводит к ускорению гибели триплетного состояния ФДГХ **1** и **2** (Рисунок 7). Из линейной зависимости констант скорости тушения  $k_{\text{ТМР}}$  от концентрации ТМР (Рисунок 7, вставки) было определено значение бимолекулярной константы скорости взаимодействия  $T^{\text{ФДГХ}}$  с ТМР, которая составляет  $1.9 \times 10^9$  и  $2.0 \times 10^9$  л моль<sup>-1</sup> с<sup>-1</sup> для **1** и **2** соответственно. Таким образом, ТМР тушит триплетное состояние **1** и **2** с константой скорости реакции близкой по значению к диффузионной константе.

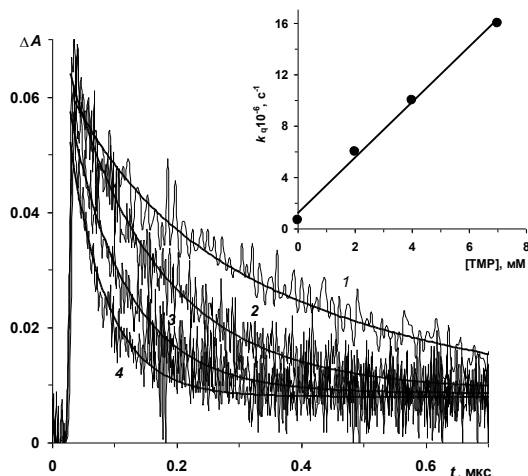


Рисунок 7 – Гибель триплетного поглощения в ФДГХ **1** (H<sub>2</sub>O–EtOH (4 : 1 по объему),  $\lambda_{\text{возб}} = 353$  нм,  $\lambda_{\text{рег}} = 620$  нм) в отсутствие (1), и в присутствии ТМР, мМ: (2) 2, (3) 4 и (4) 7; вставка: зависимость константы скорости первого порядка тушения триплетного состояния от концентрации ТМР

Для установления природы взаимодействия триплетного состояния ФДГХ с тиминовыми основаниями ДНК в атмосфере инертного газа был проведен стационарный фотолиз смеси соединения **1** с динатриевой солью тимидин-5'-монофосфата (ТМР) в водно-спиртовом растворе (EtOH 10 об.%) (Рисунок 8).



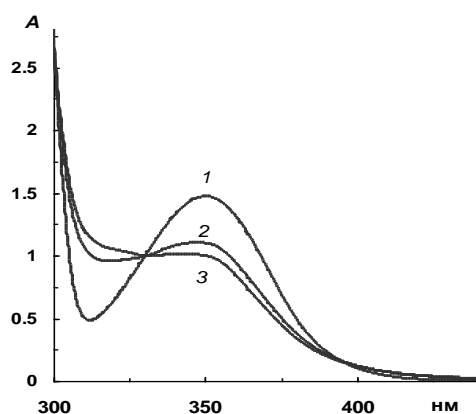


Рисунок 8 – Изменения в спектре поглощения при стационарном фотолизе смеси **1** ( $6.3 \times 10^{-4}$  М) + ТМР ( $1.2 \times 10^{-2}$  М) в растворе 10 об.% EtOH в воде в отсутствие кислорода; время фотолиза, мин: (1) 0, (2) 60 и (3) 90

Исследование смеси фотолизата методом ESI-MS до и после разделения методом ВЭЖХ показал, что в масс-спектре фотолизата наряду с минорными пиками, характерными для продуктов фотолиза **1** в воде – гидроксипроизводного фуротетрагидрохинолина ( $MH^+$  230 Да) и димера **1** ( $MH^+$  425 Да) – присутствуют пики с  $MH^+$  580, 558 и 536 Да. На хроматограмме фотолизата, кроме пиков исходных веществ и продуктов его фотолиза в воде, появляются новые 4 продукта, которые были выделены методом препаративной ВЭЖХ.

Масс-спектры всех четырех продуктов идентичны и характеризуются молекулярной массой ( $MH^+$  580 Да), соответствующей сумме масс **1** и ТМР (М 213 и 366 Да). Массы  $MH^+$  558 и 536 Да относятся к последовательному замещению иона натрия на водород в условиях регистрации масс-спектров. Ион с  $MH^+$  536 Да, в котором  $Na^+$  полностью замещен на  $H^+$ , является основным. Его фрагментация дает основной ион с  $MH^+$  340 Да, который равен сумме масс **1** и тимина (М 126 Да), т.е. соответствует отщеплению сахаридного остатка от аддукта **1** + ТМР. Отсутствие при фрагментации ионов с массами, относящимися к **1** и ТМР, указывает на прочность связи между **1** и тимином в аддукте, т.е., в процессе взаимодействия между триплетным состоянием **1** и ТМР происходит образование циклобутанового цикла между двойной связью **1** и двойной связью C(5)=C(6) ТМР. Следует отметить, что в масс-спектре фотолизата отсутствуют молекулярные ионы диаддукта (**1** + 2ТМР) с массами  $MH^+$  946, 924 и 902 Да.

Анализ продуктов фотолиза смеси **1** + ТМР однозначно свидетельствует об образовании аддуктов с прочной связью между компонентами. Высокая скорость взаимодействия триплетного состояния **1** с молекулами ТМР приводит к тому, что образование аддуктов успешно конкурирует с  $T-T$  аннигиляцией и интекомбинационной конверсией в основное состояние, а также процессом образования аминильного радикала и, соответственно, димерного продукта, выход которого уменьшается в присутствии ТМР (Схема 4).

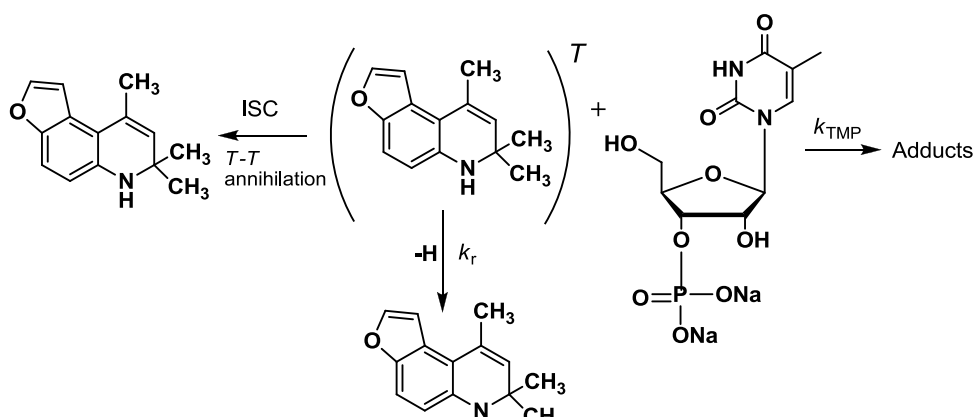
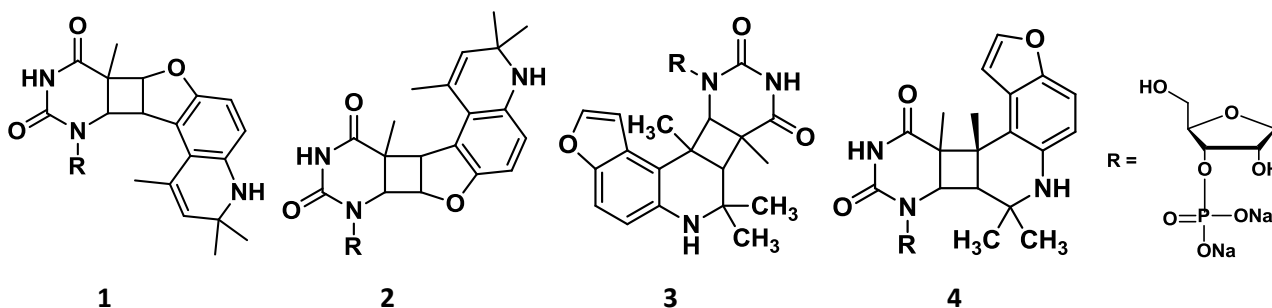


Схема 4 – Взаимодействие ФДГХ 1 и TMP

Для соединений **1**, **2** и **4** возможно образование четырех аддуктов: двух по двойной связи фуранового или тиенильного цикла и двух по двойной связи азотсодержащего гетероцикла. Квантово-химическая оценка энергии изомеров, на примере образования ковалентной связи между **1** и TMP, показывает, что наиболее стабильным является изомер **2**, далее следуют **1** и **4**, и наибольшей энергией обладает изомер **3**.



Были зарегистрированы спектры поглощения изолированных аддуктов двух типов, при этом каждому типу спектра поглощения соответствуют две фракции, выделенные методом ВЭЖХ. Характерным для этих спектров является наличие полос поглощения в области 320–420 нм и 250–300 нм. Различие проявляется в форме и положении полос. Наличие длинноволнового поглощения с максимумом 364 нм является характерным для соединений с дигидрохинолиновым циклом. Тетрагидрохинолины имеют длинноволновую полосу поглощения в области 300–320 нм, в частности длинноволновый максимум ФТГХ равен 320 нм, при этом для ФТГХ наблюдается отчетливо-выраженная колебательная структура спектра в области 250–260 нм. Эти результаты свидетельствуют о том, что образуются аддукты как по фурановому кольцу, так и по двойной связи дигидрохинолинового цикла.

Для использования ФДГХ в качестве потенциальных препаратов в фотодерматологии большое значение имеет отсутствие возможности образования диаддуктов под действием света, т.е. последовательного образования аддуктов по двум двойным связям – фуранового кольца и азотсодержащего гетероцикла. Как указывалось выше, в продуктах фотолиза смеси **1** + TMP диаддукты не обнаружены. Рассмотрение возможных структур диаддуктов

показывает, что при их образовании существуют серьезные стерические затруднения, при этом ангулярная структура **1** приводит к тому, что тимидиновые фрагменты расположены очень близко друг к другу: отдельные атомы двух фрагментов находятся на расстоянии около 2 Å. Вероятно, это приводит к тому, что при фотолизе диаддукты не образуются. Также очевидно, что это делает практически невозможным образование диаддуктов за счет кросс-сшивок в молекулах ДНК. Таким образом, при взаимодействии триплетов ФДГХ с тиминном образуются только моноаддукты с тиминным основанием ДНК и отсутствуют диаддукты, которые могут приводить к фотогенотоксичности, как это происходит при использовании 8-MOP.

Токсичность исследуемых соединений **1–6** была определена на клетках рака молочной железы MCF-7 и толстой кишки HCT116. Все соединения не проявляли темновой токсичности в концентрациях до 50 мкМ при инкубации в течение 72 час. При обработке клеток соединениями **1** и **2** в концентрации 10 мкМ с последующим облучением диодным лазером  $\lambda_{\text{итт}} = 365$  нм, дозовая мощность 15 мВт в течение 15 мин для обоих соединений наблюдали гибель клеток. Гибель клеток наблюдается только при сочетанном действии соединения и облучения. Соединение **1** обладает умеренной фототоксичностью на клетках рака толстой кишки и сильной фототоксичностью на клетках рака молочной железы MCF-7 (Рисунок 9). Наиболее ярко фототоксичность на клетках рака толстой кишки HCT116 проявилась для соединения **2**. Для этого соединения через сутки наблюдали гибель более чем 90 % клеток. Соединение **3** с нитрогруппой не обладает фототоксичностью.



Рисунок 9. Морфология клеток рака молочной железы MCF-7 до и после облучения лазером ( $\lambda = 365$  нм, 15 мин, мощность дозы  $W = 15$  мВт) в присутствии ФДГХ **1**. После облучения клетки инкубировали в полной питательной среде: (а) контроль; (б) 2 ч; (в) 24 ч.

### Заключение

В рамках представленной диссертационной работы были охарактеризованы фотохимические и фотофизические свойства новых производных гидрированных фуоро- и

тиенилхинолинов и их взаимодействие с тиминовыми основаниями ДНК. Установлено, что процессы флуоресценции, за исключением нитропроизводных, протекают с сопоставимым квантовым выходом. Наибольший квантовый выход флуоресценции наблюдался в воде, а наименьший в неполярном гексане.

Методом стационарного и импульсного фотолиза было установлено, что фотохимические реакции протекают различным путем в зависимости от наличия кислорода воздуха в реакционной среде, а также от структуры исследуемого соединения. ФДГХ **3** с нитрозаместителем является фотостабильным соединением и не подвергается превращениям под действием света. Показано, что в растворах других ФДГХ, насыщенных кислородом, преимущественно протекают процессы присоединения протонного растворителя по кратной связи дигидрохинолиновой части молекулы. В растворах, насыщенных аргоном, происходят преимущественно радикальные реакции с образованием димерных продуктов в результате вклада фотовозбужденного триплетного состояния. Выход триплетного состояния возрастает с увеличением полярности растворителя. Установлен диапазон энергии низшего триплетного уровня ФДГХ **1** и его спектр поглощения.

Установлено, что константа скорости тушения триплетного состояния ФДГХ тиминовым основанием близка к диффузионной, при этом происходит взаимодействие триплетов ФДГХ с тиминовыми основаниями по реакции [2+2]-циклоприсоединения с образованием моноаддуктов. Образование диаддуктов не было зафиксировано.

Эксперименты на культуральных клетках рака прямой кишки и молочной железы показали отсутствие цитотоксичного эффекта исследуемых соединений в темновой фазе и ярко выраженную цитотоксичность в условиях УФ-А облучения. Полученные результаты позволяют охарактеризовать исследуемые соединения в качестве потенциальных лекарственных препаратов в фотохимической терапии кожных заболеваний.

## ВЫВОДЫ

1. При прямом фотовозбуждении растворов фуродигидро- и фуротетрагидрохинолинов обнаружено образование возбужденного триплетного состояния с высоким квантовым выходом. С использованием донора триплетной энергии тетранатриевой соли сульфобенз(а)пирена и акцепторов триплетной энергии цианиновых красителей был установлен диапазон энергии низшего триплетного уровня ФДГХ в пределах  $19\ 000 > E_T > 14\ 700\ \text{см}^{-1}$ . В результате фотовозбуждения ФДГХ образуется реакционноспособное долгоживущее триплетное состояние с энергией, превышающей энергию основного состояния на  $\sim 2$  эВ.

2. Установлена определяющая роль триплетного возбужденного состояния в фотохимических реакциях ФДГХ в различных растворителях, в том числе реакциях образования аминильных радикалов. Установлено, что тушение возбужденного триплетного состояния исследуемых соединений кислородом происходит с диффузионной константой скорости и приводит к образованию синглетного кислорода. Исключение составляет ФДГХ с нитрозаместителем в дигидрохинолиновом цикле, для которого не было обнаружено образования продуктов превращения триплетов.

3. Установлено, что реакция триплетного состояния фуродигидрохинолина с тиминным основанием ДНК происходит по механизму [2+2] фотоциклоприсоединения с образованием ковалентного циклобутанового цикла между тимидин 5'-монофосфатом и двойными связями ФДГХ. Выделены четыре изомерных моноаддукта, при этом образования диаддуктов, которые могут приводить к фотогенотоксичности, не обнаружено.

4. Константы скорости реакции тушения возбужденного триплетного состояния исследуемых соединений тимидин 5'-монофосфатом близки к диффузионным константам, что обеспечивает эффективность процесса фотоциклизации с образование моноаддукта с тиминным основанием ДНК.

5. Все исследуемые соединения не обладают цитотоксичностью в контрольном темновом эксперименте, в то время как при облучении УФ-А-светом ФДГХ **1** и **2** проявляют ярко выраженный фотоцитотоксичный эффект. Таким образом, исследуемые соединения являются перспективными для дальнейших исследований с целью их использования в качестве препаратов для ПУВА-терапии.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Некипелова Т.Д. Спектрально-кинетические характеристики триплетного состояния 7,7,9-триметил-6,7-дигидрофууро[3,2-f]хинолина / Некипелова Т.Д., Лыго О.Н., Ходот Е.Н., Кузьмин В.А., **Шахматов В.В.**, Варгин В.В., Белякова А.В., Зылькова М.В. // Химия высоких энергий. 2012. Т. 46. С. 211–215.
2. Лыго О.Н. Спектрально-люминесцентные свойства и фотохимические превращения 7,7,9-триметил-6,7-дигидрофууро[3,2-f]хинолина / Лыго О.Н., Некипелова Т.Д., Ходот Е.Н., Кузьмин В.А., **Шахматов В.В.**, Волнухин В.А., Варгин В.В., Шевелев А.Б., Шibaева А.В. // Химия высоких энергий. 2012. Т. 46. С. 216–221.
3. Лыго О.Н. Реакция фотоциклоприсоединения между 7,7,9-триметил-6,7-дигидрофууро[3,2-f]хинолином и тимидин-5'-монофосфатом / Лыго О.Н., Некипелова Т.Д., Ходот Е.Н., **Шахматов В.В.**, Кононихин А.С., Николаев Е.Н., Кузьмин В.А. // Химия высоких энергий. 2012. Т. 46. С. 452–457.
4. Кузьмин В.А. Фуридогидрохинолины – новые фотосенсибилизаторы для фотохимиотерапии / Кузьмин В.А., Волнухин В.А., Егоров А.Е., Климович О.Н., Костюков А.А., Некипелова Т.Д., Ходот Е.Н., **Шахматов В.В.**, Шевелев А.Б., Шibaева А.В., Штиль А.А. // Химическая физика. 2019. Т. 38. № 12. С. 3–10.
5. **Шахматов В.В.** Спектрально-люминесцентные и фотохимические свойства производных гидрированных фууро- и тиенохинолинов / **Шахматов В.В.**, Ходот Е.Н., Некипелова Т.Д., Кузьмин В.А. // Химия высоких энергий. 2021. Т. 55. № 6. С. 446-454.

Тезисы докладов на конференциях:

1. Nekipelova T.D. Reactivity of triplet states generated in the photolysis of furodihydroquinolines / Nekipelova T.D., **Shakhmatov V.V.**, Khodot E.N., Kuzmin V.A. // Book of abstracts of the 13th European Symposium on Organic Reactivity (ESOR-2011). September 11–16. 2011. Tartu. Estonia. P. 119.
2. Nekipelova T.D. Furodihydroquinolines as potential drugs for PUVA-therapy / Nekipelova T.D., Kuzmin V.A., Khodot E.N., **Shakhmatov V.V.**, Lygo O.N., Mazaletskaya L.I. // Abstract book of the XXIVth IUPAC Symposium on Photochemistry. July 15–20. 2012. Coimbra. Portugal. P. 226.
3. **Шахматов В.В.**, Фотохимические и фотофизические свойства 7,7,9-триметил-6,7-дигидрофууро[3,2-f]хинолина / **Шахматов В.В.**, Лыго О.Н., Некипелова Т.Д., Кузьмин В.А. // «Биохимическая физика» Труды XII ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы, г. Москва, 29–31 октября 2012 г, С. 196–200.

4. Nekipelova T.D. Furodihydroquinolines – sensitizers for PUVA therapy / Nekipelova T.D., Kuzmin V.A., Khodot E.N., **Shakhmatov V.V.** // Program and abstract book of the XVth International Conference “Heterocycles in Bio-organic Chemistry”. May 27–30. 2013. Riga. Latvia. P. 197.

5. **Шахматов В.В.** Триплетные состояния фуросидгидрохинолинов в процессах фотохимиотерапии / **Шахматов В.В.**, Егоров А.Е., Кузьмин В.А., Волнухин В.А., Климович О.Н., Костюков А.А., Некипелова Т.Д., Ходот Е.Н., Шевелев А.Б., Шибеева А.В., Штиль А.А. // Сборник тезисов XXXI Симпозиума “Современная химическая физика”. Сентябрь 16–25. 2019. Туапсе. Россия. С. 273.