

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
Российской академии наук

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

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук
Некипелова Татьяна Дмитриевна

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	10
1.1. ПСОРАЛЕНА, ИХ ПРИМЕНЕНИЕ И СВОЙСТВА, ПУВА- ТЕРАПИЯ	10
1.2. МЕХАНИЗМ ФОТОРЕАКЦИЙ ПСОРАЛЕНОВ	12
1.2.1. ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПСОРАЛЕНОВ	15
1.2.2. МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ АДДУКТОВ С ОСНОВАНИЯМИ ДНК, АМИНОКИСЛОТАМИ И ЛИПИДАМИ	18
1.2.3. РЕАКЦИИ ПСОРАЛЕНОВ С ПЕРЕНОСОМ ЭЛЕКТРОНА И С КИСЛОРОДОМ	23
1.3. СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ПОИСКА НОВЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ ДЛЯ ПУВА-ТЕРАПИИ	27
1.4. ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ	31
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	33
2.1. ВЕЩЕСТВА И РЕАКТИВЫ	33
2.2. СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ И ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ	41
2.3. СТАЦИОНАРНЫЙ ФОТОЛИЗ	42
2.4. ИМПУЛЬСНЫЙ ФОТОЛИЗ	43
2.5. ИЗМЕРЕНИЕ ТЕМНОВОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ И ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПРИ ОБЛУЧЕНИИ	45
Глава 3. ФОТОХИМИЧЕСКИЕ И ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФУРО- И ТИЕНО-ПРОИЗВОДНЫХ ГИДРИРОВАННЫХ ХИНОЛИНОВ ...	47
3.1. СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЙ 1–6	47
3.2. СТАЦИОНАРНЫЙ ФОТОЛИЗ СОЕДИНЕНИЙ 1–6	55
3.3. СПЕКТРАЛЬНО-КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТРИПЛЕТНЫХ СОСТОЯНИЙ ГИДРИРОВАННЫХ ФУРОХИНОЛИНОВ ...	66
3.3.1. ФДГХ 1	67

3.3.2. ФДГХ 2	73
3.3.3. ФДГХ 3	78
3.3.4. ФТГХ 5	80
3.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ ГЛАВЫ 3	82
Глава 4. РЕАКЦИИ ФДГХ С ТИМИНОВЫМИ ОСНОВАНИЯМИ ДНК ...	84
4.1. РЕАКЦИЯ ФОТОЦИКЛОПРИСОЕДИНЕНИЯ ФДГХ 1 и 2 С ТМР ...	84
4.2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФДГХ 2 С ОЛИГОНУКЛЕОТИДОМ 5'- GCAAGTTGGAG-3'	93
4.3. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФДГХ С ТИМИНОМ	94
4.4. ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕМНОВОЙ И ФОТОЦИТОТОКСИЧНОСТИ СОЕДИНЕНИЙ	96
4.5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ ГЛАВЫ 4	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	99
ВЫВОДЫ	101
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	105

ВВЕДЕНИЕ

В современной медицине для лечения ряда заболеваний широкое применение получили технологии, позволяющие локально работать с пораженными участками внутренних органов и тела человека посредством совместного использования фотосенсибилизатора и излучения оптического спектра. Одна из наиболее известных технологий называется ПУВА-терапия (англ. PUVA образовано из начальных букв слов "psoralens" и "ultraviolet A") [1; 2]. История применения этого метода уходит в античный Египет, где было замечено, что у людей с витилиго после приема отвара плодов *Ammi majus*, произрастающего по берегам Нила, и последующей солнечной ванны наблюдалось восстановление меланина в коже. В настоящее время ПУВА терапия применяется при лечении различных, в основном дерматологических заболеваний. В ее основе лежит совместное применение фотосенсибилизатора (ФС) из группы линейных фурукумаринов (например, 8-метоксипсорален) и длинноволнового УФ-излучения (320-400 нм). Фотохимическое действие ФС при ПУВА-терапии основано на реакции (2+2)-фотоциклоприсоединения по двойным связям между фотовозбужденным (триплетным) состоянием псоралена и тимином, основанием, входящим в структуру ДНК [3–5]. 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.

Основными заболеваниями, к которым применяется ПУВА-терапия по медицинским показаниям, в настоящий момент являются псориаз, витилиго,

экзема, красный плоский лишай, грибovidный микоз и другие [6; 7]. Однако, длительная практика применения псораленов показала, что ПУВА-терапия может приводить к возникновению побочных токсических эффектов, например, к образованию эритемы и точечных мутаций, а также к хромосомным aberrациям в клетках кожи [1; 2; 8; 9]. Данные эффекты обусловлены "сшивками" между двумя пиримидиновыми основаниями на противоположных цепях ДНК или между молекулами ДНК и белков через образование ковалентных мостиков с линейной молекулой псоралена [2; 10; 11]. В этой связи, представляется актуальной задачей поиск новых ФС, которые бы отвечали необходимым условиям для применения в ПУВА-терапии по аналогии с псораленами: при фотовозбуждении светом УФ-А диапазона образовывали триплетные состояния, эффективно взаимодействующие с пиримидиновыми основаниями ДНК с образованием аддуктов, но в то же время, не обладали побочными токсичными эффектами на клетки кожи человека. В лаборатории процессов фотосенсибилизации ИБХФ РАН было предположено, что аннелирование фуранового цикла в структуру известных антиоксидантов, 2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолинов, будет приводить к увеличению выхода триплетного состояния при фотовозбуждении, и фуропроизводные дигидрохинолинов могут быть потенциальными препаратами для ПУВА-терапии.

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.

Научная новизна работы заключается в том, что были определены спектрально-кинетические характеристики серии новых соединений производных гидрированных фууро- 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 HCT116 и MCF-7.

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.

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

Работа выполнена в институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской Академии наук в лаборатории процессов фотосенсибилизации в рамках программ «Биомолекулярная и медицинская химия» отделения «Химия и наука материалов» фундаментальных исследований Российской Академии наук и «Фундаментальные науки медицине», а также при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, ГК №16.512.11.2138.

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.

Апробация работы. По результатам диссертационной работы опубликовано 10 работ: из них 5 статей в российских журналах из списка ВАК и индексируемых в базах данных Web-of-Science и Scopus и 5 публикаций в сборниках тезисов докладов научных конференций. 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.).

Объем и структура диссертации. 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.

В первой главе приведен обзор литературы по фотохимическим и фотофизическим свойствам соединений семейства фурукумаринов (псораленов), их реакциям с участием биомакромолекул и оснований ДНК, описаны механизм взаимодействия и продукты указанных химических фотореакций и выявленные побочные явления при использовании псораленов в ПУВА-терапии. Рассмотрены направления поиска новых соединений для ПУВА-терапии.

Во второй главе представлено описание используемого оборудования, методик проведения экспериментов, приведены схемы синтеза используемых в данной работе соединений производных гидрированных фууро- и тиенилгидрохинолинов.

В третьей главе описаны спектрально-люминесцентные свойства фууро- и тиенилгидрохинолинов, исследованы фотоиндуцированные реакции исследуемых соединений в различных растворителях в присутствии и отсутствие кислорода, установлено образование триплетных состояний и охарактеризованы их спектрально-кинетические характеристики.

В четвертой главе рассмотрено взаимодействие триплетных состояний исследуемых соединений с биомакромолекулами, основаниями ДНК и олигонуклеотидами. Оценена темная и фотоцитотоксичность исследуемых соединений на линии культуры клеток рака молочной железы и толстой кишки.

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. Триpletные состояния ФДГХ взаимодействуют с тиминовыми основаниями ДНК по механизму [2+2]-циклоприсоединения с образованием моноаддуктов без образования диадуктов.

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.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Литературный обзор посвящен описанию свойств псораленов, механизму их взаимодействия с биомакромолекулами под действием света и современным направлениям по поиску ФС для фотодерматологии с менее выраженной токсичностью.

1.1. ПСОРАЛЕНА, ИХ ПРИМЕНЕНИЕ И СВОЙСТВА, ПУВА-ТЕРАПИЯ

Концепция ПУВА-терапии существует уже более 3 тысяч лет [3]. Еще в Древнем Египте для лечения кожных болезней (в основном витилиго) применялся отвар плодов лекарственных растений (*Ammi majus*, *Psoralea corylifolia*), который вызывает повышенную чувствительность к солнечному свету. Метод ПУВА (фотохимиотерапии) основан на сочетанном воздействии УФ-А облучения (320–400 нм) и фотосенсибилизаторов (псораленов).

Основным механизмом действия ПУВА считается взаимодействие активированного фотосенсибилизатора с ДНК псориатических клеток, в результате образуются монофункциональные связи с пиримидиновыми основаниями, а затем бифункциональные связи и перекрестные сшивки между цепями ДНК или ДНК и белками, что приводит к торможению клеточного деления за счет временного подавления синтеза нуклеиновых кислот и белка. Необходимо отметить, что только образование монофункциональных связей (образование моноаддукта) между молекулой псоралена и основанием ДНК является эффективным при фототерапии. Дело в том, что в случае образования перекрестных сшивок между цепями ДНК увеличивается риск развития онкологических заболеваний. Фотоконъюгация псораленов и ДНК документально подтверждается результатами электронной микроскопии *in vivo* и *in vitro*. [5; 12; 13] Проблеме возникновения различных нежелательных последствий ПУВА-терапии, в том числе онкологических заболеваний, и протоколу лечения псориаза и других кожных заболеваний с применением псораленов посвящено большое

количество исследований, начиная с 90-х годов прошлого века и до настоящего времени [8, 9, 14–35].

В настоящее время в качестве фотосенсибилизаторов применяются и исследуются натуральные (аммиофурин, это соединение представлено в многочисленных растениях по всему миру) и синтетические фурукумарины (псоралены): псорален, ангелицин, 5-метоксипсорален (5-MOP), 8-метоксипсорален (8-MOP) и 4,5',8-триметилпсорален (4,5',8-TMP) (Рисунок 1.1). Несмотря на длительные исследования различных псораленов, к применению как перорально, так и наружно (в виде растворов, кремов, ванн) одобрены только три соединения: 5-MOP, 8-MOP и 4,5',8-TMP. Наиболее широко используемым в различных странах является 8-MOP, который в США является единственным препаратом, разрешенным для использования в клинической практике [14].

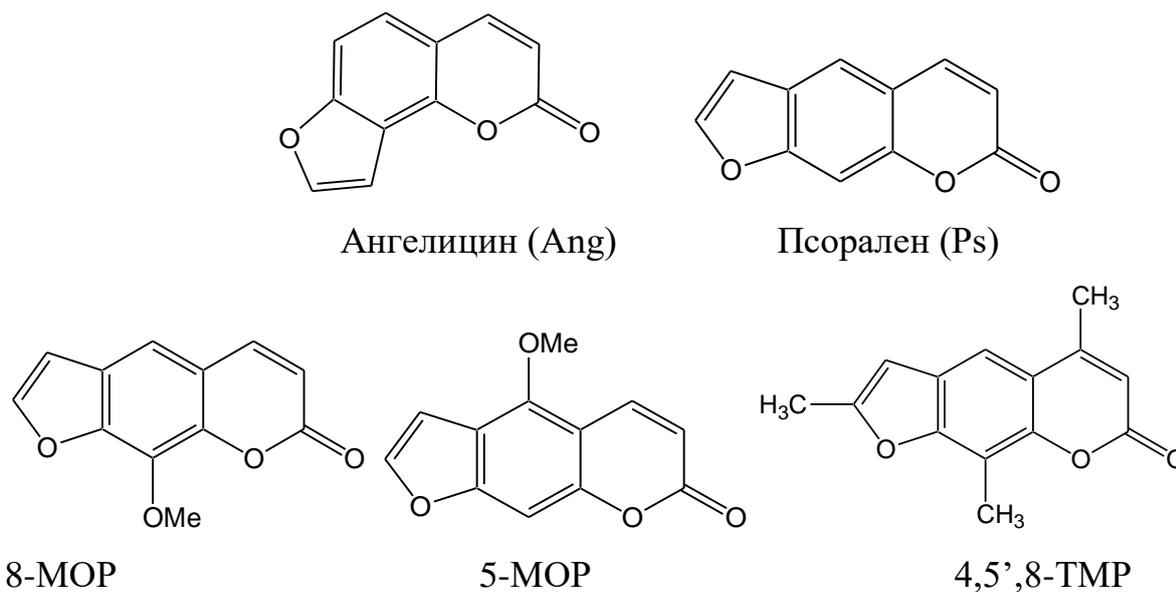


Рисунок 1.1 – Структуры фурукумаринов, используемых в ПУВА-терапии

Лечение с применением ПУВА показано при псориазе, атоническом дерматите, красном плоском лишае, витилиго, почесухе, лимфомах, парапсориазе, ихтиозе, бляшечной склеродермии, облысении [13–16]. ПУВА можно назначать в любой стадии псориаза, в том числе и прогрессирующей. Важно отметить, что ПУВА является одним из методов лечения таких фотодерматозов, как солнечная крапивница, полиморфный солнечный дерматоз. Сочетанное применение УФ-А и

фотосенсибилизаторов усиливает образование меланина в коже, что дает положительный эффект при лечении витилиго. В отличие от лечения псориаза и других кожных болезней, фотохимиотерапия витилиго проводится на дозах, вызывающих эритему, длительное время, курсами. Известно также, что определенные псоралены подавляют рецепторы роста эпидермиса при облучении комплекса псорален-рецептор УФ-А светом.

Фурукумарины также используются в лечении раковой Т-клеточной лимфомы и некоторых инфекций, связанных со СПИДом. В этом случае, отведенную, внешнюю кровь облучают с фотоактивным 8-МОР в искусственно созданной подвижной системе [35–37].

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 возможный фотоканцерогенез. Было показано, что для пациентов, получивших более 200 сеансов ПУВА-терапии, риск плоскоклеточного рака кожи в 30 раз выше, чем в общей популяции [16]. Поскольку псоралены, и особенно 8-МОР, активно применяются до сих пор, то исследования по возможным побочным явлениям при ПУВА-терапии и путях их преодоления проводятся в течение последних 30 лет [1; 2; 18–34].

1.2. МЕХАНИЗМ ФОТОРЕАКЦИЙ ПСОРАЛЕНОВ

Псоралены (фурукумарины) принадлежат к классу гетероциклических ароматических соединений. Длинноволновая полоса поглощения псораленов находится в пограничном диапазоне УФ-А–УФ-В: для 8-МОР плечо в области 330–380 нм и $\lambda_{\max} = 300$ нм (Рисунок 1.2).

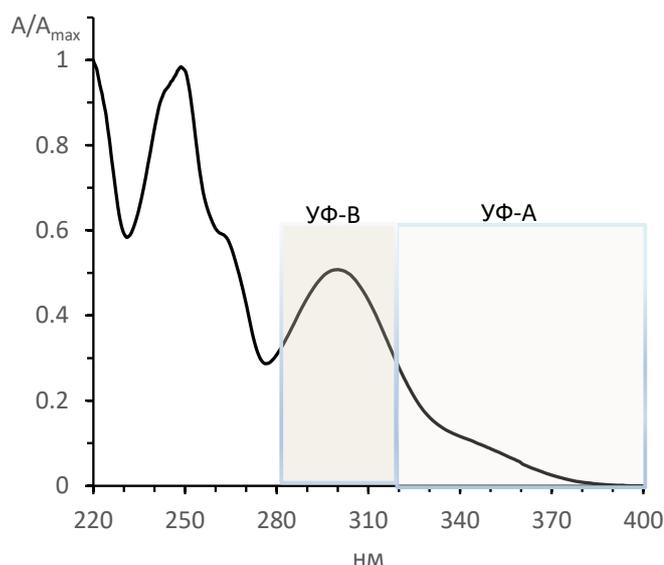


Рисунок 1.2 – Спектр раствора 8-MOP в этаноле, нормированный по коротковолновой полосе. «Разработан автором»

При поглощении УФ-А излучения в псораленах могут протекать различные фотоиндуцированные реакции, знание которых обеспечивает использование этих соединений при лечении различных кожных заболеваний от псориаза и витилиго до потенциального применения при лечении онкологических заболеваний [38; 39]. Интеркаляция псораленов между соседними парами оснований ДНК с образованием нековалентно-связанных комплексов является первым и важным шагом, обеспечивающим их дальнейшую активность под действием облучения [3; 40–46]. Результаты расчетов методом молекулярной механики комплексов 3-карбетоксипсоралена (3-CPs), 5-MOP, 8-MOP, 7-метилпиридо[3,4-с]псоралена (MePyPs) и 7-метилпиридо[4,3-с]псоралена (2N-MePyPs) с двухцепочечным дуодекануклеотидом $d(\text{CGCGATATCGCG})_2$ показали, что при интеркаляции плоскость псораленов перпендикулярна оси геликса, при этом различные заместители действуют специфично, выталкивая часть молекулы или к малой или к большой бороздке [41]. Поэтому интеркаляция несимметрична по отношению к двух цепям ДНК и на основании относительного положения псоралена и соседнего тимина было сделано предположение, что в случае 3-CPs, MePyPs и 2N-MePyPs будут образовываться моноаддукты по фурановому циклу (ФМА), в случае 5-MOP предпочтительно образование моноаддуктов по пирановому циклу

(ПМА) и оба типа моноаддуктов могут образовываться в случае 8-МОР. Следует отметить, что эти теоретические предсказания хорошо коррелируют с экспериментальными данными [47].

Молекулярный докинг комплексов модельных ДНК ((d(CСТТGСТАССТТ)2 и d(TАТАТАТАТАТА)2) и псоралена, в котором лиганд выступал или как интеркалятор, или связывался с малой бороздкой ДНК показал, что наиболее выгодным является интеркаляция в 5'-ТрА сайт в АТ окружении (poly-ТА ДНК) [44]. В случае нелинейного аллопсоралена наиболее выгодным оказалось связывание с малой бороздкой ДНК, при этом интеркаляция также происходит в 5'-ТрА сайт в АТ окружении [46]. В литературе приводятся оценки константы диссоциации нековалентного комплекса между молекулами псораленов и ДНК, которые зависят от строения псоралена, ДНК, ионной силы раствора и находятся в диапазоне 10^{-3} – 10^{-4} М [47]. Недавно на большой выборке линейных псораленов было показано, что положительно заряженные заместители в положении 8 повышают эффективность псораленов благодаря более сильному взаимодействию с полианионной структурой ДНК [40].

Между интеркалированной молекулой фотосенсибилизатора и основанием ДНК после фотовозбуждения могут происходить реакции нескольких типов [3; 48], самой важной из которых считается прямое фотосвязывание с образованием моно- и диаддуктов (Рисунок 1.3), что оказывает антипролиферативное действие на поврежденные клетки [38]. Были выделены два вида моноаддуктов: моноаддукт по фурановому циклу (ФМА) и по пироновому циклу (ПМА) (Рисунок 1.3) [5]. При этом в литературе рассматривается взаимодействие возбужденной молекулы псораленов с пиримидиновыми основаниями ДНК, а именно, тимин, что обусловлено тем, что именно для тимина при фотовозбуждении характерно образование циклобутановых димеров [49–51].

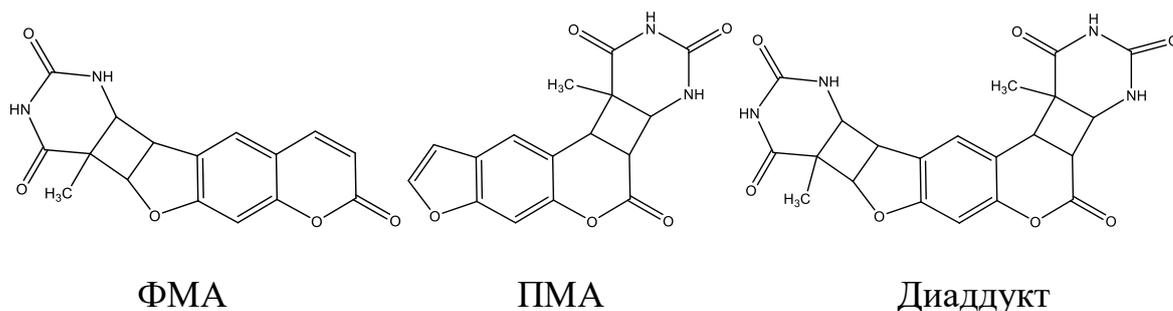


Рисунок 1.3 – Структуры ФМА, ПМА и диаддукта между псораленом и тимином

Другой тип реакций включает в себя реакции фотовозбужденных молекул фурукумаринов с кислородом с генерацией синглетного кислорода и других активных форм кислорода (АФК), которые ответственны за повреждение клеточных мембран. Этот механизм известен как фотодинамическая терапия и считается, что он играет незначительную роль в ПУВА-терапии [52–57]. Существует консенсус, что в фотоиндуцированных реакциях образования аддуктов с ДНК и в реакциях с кислородом псоралены принимают участие в возбужденном триплетном состоянии. В литературе также рассматривается возможность образования катион- и анион-радикалов в результате переноса электрона от возбужденной молекулы псоралена на основание ДНК или с гуанозинового основания ДНК на псорален, а также аутоионизация за счет переноса электрона между двумя молекулами псоралена [42; 43; 48; 52; 58]. Далее будут рассмотрены подробно фотофизические свойства псораленов и три типа реакций псораленов при фотовозбуждении.

1.2.1. ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПСОРАЛЕНОВ

В 70–80-х годах прошлого века было проведено интенсивное изучение спектральных свойств, квантовых выходов триплетного состояния различных псораленов и тушение триплетного состояния основаниями ДНК и аминокислотами [59–62]. Флуоресценция ($\lambda_{\text{max}}^{\text{F}} = 409$ нм, $\Phi_{\text{F}} \approx 0.019$) и фосфоресценция ($\lambda_{0-0}^{\text{P}} = 456$ нм, $\Phi_{\text{P}} \approx 0.13$) были зарегистрированы в низкотемпературных матрицах (77 К, этанол) [59; 60]. Из времязрешенных измерений была получена константа скорости флуоресценции для 4,5',8-ТМР

$k^F = 3.3 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ [61]. Для ряда псораленов было найдено, что квантовые выходы как флуоресценции, так и триплетного состояния сильно снижаются при понижении полярности растворителя [60–66]. Например, для псоралена было получено, что квантовый выход триплета составляет $\Phi_T = 0.009, 0.180$ и 0.545 в *n*-гексане, этаноле и воде соответственно [65]. Согласно [64] квантовые выходы флуоресценции и триплета для 8-MOP равны $\Phi_F = 0.00026, 0.0013, 0.011$ и $\Phi_T = 0.012, 0.04, 0.104$ в ацетонитриле, этаноле и трифторэтаноле соответственно. Во время разрешенных пико- и нано-секундных экспериментах в различных растворителях было показано, что возбужденное синглетное состояние 8-MOP имеет две сильные полосы поглощения с максимумами 430 и 630–690 нм. Время жизни первого возбужденного состояния S_1 , τ_S , изменяется от величины <10 пс в низко-полярных растворителях (толуол, тетрагидрофуран) до 2.7 нс в сильно полярных растворителях (трифторэтанол, гексафторизопропанол) [67].

Триплетные спектры 8-MOP, 5-MOP и 3-CPs сильно изменяются при переходе от растворителя, образующего Н-связи такого как вода, к растворителям, не способными к образованию Н-связей (бензолу или ацетонитрилу), при этом спектры незамещенного псоралена не зависят от растворителя [68]. С помощью теоретического рассмотрения методом CNDO/S было объяснено существование различных типов триплетов. Для 8-MOP, 5-MOP и 3-CPs триплетные состояния в воде рассматриваются как триплетные эксиплексы ${}^3(\text{FC}^{\delta-} \cdot \text{H}_2\text{O}^{\delta+})$, что соответствует тому, что спектры этих состояний близки к спектрам соответствующих анион-радикалов.

Методами квантовой химии была изучена фотофизика псораленов [69; 70]. Спектры поглощения и эмиссии были объяснены из расчета энергии и свойств низколежащих синглетных и триплетных возбужденных уровней. Состояние S_1 (π - π^*) ответственно за длинноволновую полосу поглощения и флуоресценцию, и именно оно обеспечивает дальнейшие фотофизические процессы, относящиеся к фототерапевтическим свойствам псораленов. Низшее триплетное состояние T_1 (π - π^*) является источником фосфоресценции и предполагается, что его важнейшая роль в реакциях возбужденного состояния обусловлена удлинением

связи С3–С4 пиринового цикла. На основе расчетов в газовой фазе был предложен механизм дезактивации первично заселенного возбужденного $\pi\text{--}\pi^*$ состояния, которое включает интеркомбинационную конверсию (ИКК) в $n\text{--}\pi^*$ триплетное состояние, которое через коническое пересечение спускается в самое низкое $\pi\text{--}\pi^*$ триплетное состояние, источник реакционной способности псораленов в реакциях с ДНК.

Для объяснения наблюдаемых зависимостей квантовых выходов от полярности растворителей были проведены квантово-химические расчеты структуры псораленов и их возбужденных состояний [71–74]. Основные каналы дезактивации возбужденного синглетного состояния, безызлучательная внутренняя конверсия (ВК) $S_1 \rightarrow S_0$ и ИКК $S_N \rightarrow T_M$ обсуждаются в [71]. Показано, что образование комплексов между псораленами и молекулой метанола изменяет характер возбужденных синглетных и триплетных состояний и их положение.

Поскольку фотохимические реакции псораленов имеют большое значение, Дж. Татчен (J. Tatchen) с коллегами провели квантово-химическое исследование этих соединений, в котором были вычислены константы скорости ИКК псоралена с использованием прямого и вибронного спин-орбитального (СО) взаимодействия [72; 73]. По мнению авторов, включение вибронного СО взаимодействия в расчеты позволяет учесть влияние растворителя. Действительно, рассчитанные только для прямого СО взаимодействия, константы скорости имеют значения $k_{\text{ИКК}} = 10^{10} \text{ s}^{-1}$ в результате перехода $S_2(n\text{--}\pi^*) \rightarrow T_1(\pi \rightarrow \pi^*)$, тогда как скорость перехода $S_1(\pi\text{--}\pi^*) \rightarrow T_{\{1,2,3\}}(\pi\text{--}\pi^*)$ не превышает значений $k_{\text{ИКК}} = 10^5 \text{ s}^{-1}$. После включения вибронного СО взаимодействие для перехода $S_1(\pi\text{--}\pi^*) \rightarrow T_1(\pi\text{--}\pi^*)$ были получены константы скорости $k_{\text{ИКК}} = 3 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$, при этом безызлучательный переход из $S_1(\pi\text{--}\pi^*)$ состояния в почти вырожденное $T_3(\pi\text{--}\pi^*)$ является менее эффективным ($k_{\text{ИКК}} = 10^7 \text{ s}^{-1}$). Основываясь на вычисленных скоростях ИКК и изменениях возбужденного состояния в различных растворителях, был сделан вывод, что экспериментально наблюдаемый высокий квантовый выход триплетного состояния псоралена в полярной протонной среде проявляется в первую очередь благодаря $S_1(\pi\text{--}\pi^*) \rightarrow T_1(\pi\text{--}\pi^*)$ переходу. Авторы делают вывод,

что для гетероароматических систем $(\pi \rightarrow \pi^*)/(\pi \rightarrow \pi^*)$ интеркомбинационная конверсия, осуществляемая путем прямого и вибронного спин-орбитального взаимодействия, является общим механизмом заселения триплетного состояния.

1.2.2. МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ АДДУКТОВ С ОСНОВАНИЯМИ ДНК, АМИНОКИСЛОТАМИ И ЛИПИДАМИ

Как отмечалось выше, фотоприсоединение псораленов к тиминовым основаниям ДНК происходит в две стадии: после поглощения света сначала образуется моноаддукт (МА), который превращается в диаддукт после поглощения второго кванта света. Такой процесс становится возможным, поскольку в псораленах имеется две двойные связи, в фурановом и пироновом циклах, способные после фотовозбуждения образовывать продукты фотоциклоприсоединения с двойной связью тиминового основания. При этом моноаддукты первоначально могут образовываться как по фурановому (ФМА), так и пионовому циклу (ПМА) (Рисунок 1.3). Моноаддукты были идентифицированы и охарактеризованы [75; 76], а затем были изолированы диаддукты, образовавшиеся в реакции трех псораленов (8-МОР, 4,5',8-ТМР и 4'-(гидроксиметил)-4,5',8-триметилпсорален (НМР)) с ДНК в результате последовательного импульсного фотовозбуждения выделенных моноаддуктов [5]. В этой работе было показано, что при первоначальном фотовозбуждении ФМА образуется в концентрации, превышающей концентрации ПМА в 5 раз. Однако при облучении моноаддуктов концентрация ФМА убывает, а ПМА остается практически постоянной, т.е. в диаддукт превращается в основном ФМА. Неспособность аддукта 8-МОР к тимину по пионовому циклу (ПМА) к дальнейшему превращению в диаддукт была позже объяснено увеличением его энергии возбуждения в S_1 состояние по сравнению с исходным фотосенсибилизатором, что предотвращает последующую реакцию, инициируемую УФ-А [77–79].

На основании анализа структуры моно- и диаддуктов псораленов с ДНК после их ферментативного гидролиза, методом ЯМР было показано, что

моноаддукты и диаддукты имеют структуру, в которой псорален и основания ДНК располагаются в *цис-син* конфигурации по отношению к циклобутановому циклу (Рисунок 1.4) [5; 80].

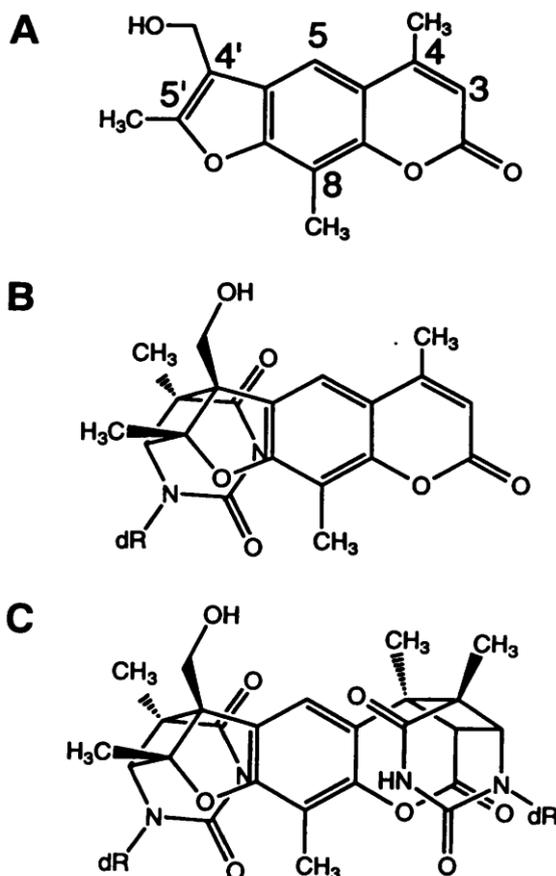


Рисунок 1.4 – Структуры НМТ (А), *цис-син* ФМА НМТ и тимина (В) и *цис-син* диаддукта НМТ и тимина (С) (воспроизведено из [80])

Интересно отметить, что образовавшиеся при облучении УФ-А диаддукты подвергаются фоторазложению и превращаются в исходные соединения при облучении УФ-С светом с $\lambda = 254$ нм [5].

Исследование образования триплетных состояний 4',5'-фотомоноаддуктов 3-СРs и 8-МОР с тимидином и уридином показало, что квантовый выход триплета в случае моноаддукта 3-СРs много выше, чем для 8-МОР. Тем не менее, диаддукт образуется из моноаддукта 8-МОР и не образуется из моноаддукта 3-СРs, что объясняется стерическими затруднениями, вызванными карбэтоксигруппой в положении 3 пиринового гетероцикла [81; 82].

Несмотря на широкое применение ПУВА-терапии и описание продуктов взаимодействия фурокумаринов с тиминовыми основаниями, детальный механизм этого взаимодействия до сих пор активно дискутируется [4; 47]. Согласно правилу Вудворда–Гофмана [2 + 2]-циклоприсоединение является термически запрещенной, но фотохимически разрешенной перициклической реакцией [83]. В [84] впервые исследован теоретически механизм взаимодействия псоралена с тиминном. Были рассчитаны пути образования ФМА и ПМА из возбужденных синглетных и триплетных состояний псоралена и тимина. При этом авторы полагают, что ФМА может образовываться как из возбужденного триплетного состояния, так и из возбужденного синглетного состояния, а ПМА только из триплетного состояния. Расчеты были проведены для молекулы тимина, однако авторы считают, что в реальной системе с псораленом, интеркалированным в ДНК, большую роль может играть взаимное расположение псоралена и тиминового основания. Экспериментально обнаруженное отсутствие диаддуктов у первично образованных ПМА [5] объясняется тем, что триплетные состояния ПМА имеют существенно более высокую энергию и не образуются при облучении УФ-А. Также отмечается, что заместители в пироновом кольце препятствуют образованию диаддуктов, что было показано экспериментально [40]. Интересно отметить, что рассчитанные в [84] структуры моноаддуктов имеют транс-конфигурацию, что не совпадает с цис-*syn*-структурой, экспериментально установленной в [5]. По-видимому, это объясняется стерическими затруднениями при образовании продуктов в реальных молекулах двунитевой ДНК, в то время как расчет проводили для индивидуальной молекулы тимина без рибозного остатка.

В последние годы с помощью современных спектральных и время-разрешенных методов был исследован детальный механизм образования аддуктов псораленов с тиминовыми основаниями ДНК для 4'-аминометил-4,5',8-триметилпсоралена (АМТ) [4] и для используемых в ПУВА терапии 8-МОР, 4,5',8-ТМР и 5-МОР [47]. В [4] были обсуждены различия в образовании циклобутановых димеров (ЦБД) между соседними тиминовыми основаниями

ДНК при фотоповреждении и при взаимодействии триплетов АМТ с теми же тиминовыми основаниями. В первом случае образование ЦБД происходит только при фотооблучении светом УФ-С диапазона [85–87]. Методом фемтосекундной спектроскопии с УФ накачкой и ИК регистрацией было показано, что образование ЦБД между тиминовыми основаниями происходит в течение нескольких сот фс через возбужденное синглетное состояние [86]. Это означает, что циклобутановый цикл образуется по согласованному механизму Вудворда–Гофмана [83]. Исследование димеризации тиминовых оснований через триплетное состояние затруднено в связи с очень низким квантовым выходом триплетного состояния при прямом фотовозбуждении. Эксперименты с прямым и сенсibilизированным возбуждением показывают, что квантовый выход димеризации из триплетного состояния низок (<0.1) [87].

Важное отличие образования фотоаддуктов в случае псораленов заключается в том, что оно происходит под действием УФ-А облучения и, как было отмечено выше, в реакции принимают участие триплеты псораленов. Метод фемтосекундной спектроскопии с УФ накачкой и ИК регистрацией и квантово-химические расчеты позволили охарактеризовать фотоиндуцированное присоединение АМТ к тимину [4]. Было однозначно показано, что присоединение происходит через триплетный канал в микросекундном временном диапазоне и включает в себя интермедиат, который авторы относят к бирадикалу $^3(\text{AMT}^*-\text{T}^*)$. На основании квантово-химических расчетов предполагается, что образование одинарной связи между положением 5' фуранового цикла АМТ в триплетном состоянии и положением 6 тимина дает бирадикал [79]. DFT расчеты показывают, что триплетный бирадикал не распадается на исходные АМТ и тимин из-за высокого барьера в 83.7 кДж/мол. Это означает, что большинство бирадикалов превращаются в фотоаддукт путем замыкания циклобутанового цикла (Рисунок 1.5).

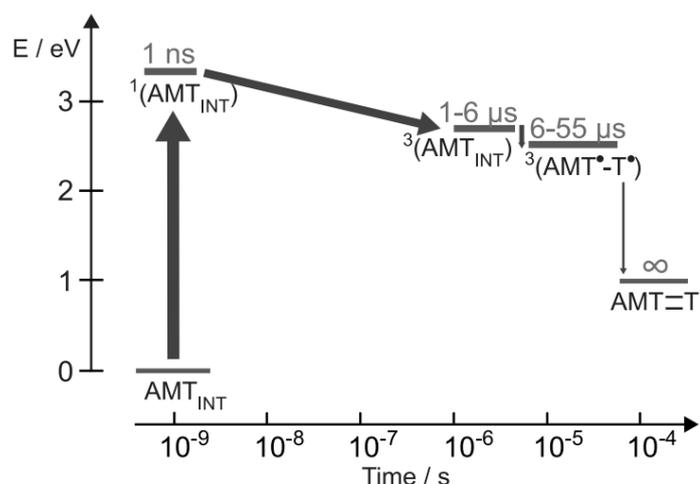


Рисунок 1.5 – Времена жизни зарегистрированных промежуточных частиц, принимающих участие в фотоприсоединении интеркалированной молекулы AMT_{INT} к тимину. Относительная эффективность образования последовательных промежуточных частиц отображена толщиной стрелок (воспроизведено из [4])

Это исследование было продолжено методами стационарной УФ и ИК спектроскопии и наносекундного фотолиза на примере применяемых на практике 8-MOP, 4,5',8-TMP и 5-MOP с использованием синтетической двух-цепочечной ДНК, включающей только адениновые (А) и тиминные (Т) основания (АТ-ДНК) [47]. Эксперименты показали, что фотоциклоприсоединение 8-MOP и 4,5',8-TMP к АТ-ДНК происходит аналогично фотоприсоединению АМТ и включает триплетное состояние и бирадикальный интермедиат. Что касается 5-MOP, то в этом случае показано, что фотоаддукт образуется по пирановому циклу. Ранее образование такого фотоаддукта обсуждалось в литературе [41; 88]. К сожалению, авторам не удалось проследить путь его образования, поскольку спектры промежуточных продуктов сильно сдвинуты в УФ область.

Таким образом, на основании экспериментальных исследований и квантово-химических расчетов однозначно показано, что реакция фотоциклоприсоединения между молекулами псораленов и тиминными основаниями ДНК происходит из возбужденного триплетного состояния псоралена. При этом установлено, что направление присоединения и возможность образования диаддуктов зависит от исходной структуры псоралена. Интересно отметить, что для наиболее широко

применяемого в лечебной практике 8-MOP зафиксировано эффективное образование диаддуктов.

Экспериментально установлено, что под действием света псоралены образуют циклобутановые аддукты не только с ДНК, но и с другими биомакромолекулами с двойными связями: белками, аминокислотами, ненасыщенными жирными кислотами и фосфолипидами [89–98]. По аналогии с диаддуктами с тиминовыми основаниями ДНК возможно образование кросс-сшивок между молекулами ДНК и белками (DPC) [95]. Способность некоторых линейных и ангулярных фурукумаринов образовывать DPC под действием УФ-А облучения было показано на клетках яичника китайского хомяка. Линейные фурукумарины, псорален и 8-MOP, образуют такие сшивки в большом количестве, в то время как 4'-метилангелицин и 4,4'-диметилангелицин образуют только небольшое их количество, а ангелицин и 4,6,4'-триметилангелицин неспособны вызывать повреждения. Авторы [95] считают, что способность образовывать DPC является свойством фототоксических фурукумаринов и вызывает поражения кожи в виде эритемы.

Взаимодействие с липидами нарушает ключевые клеточные функции такие как организация и целостность мембран. Было показано, что 20% лимфоидных клеток, инкубированных с 8-MOP, погибают в течение секунды после облучения УФ-А из-за повреждения мембраны [97]. Более того, эксперименты *in vivo* на крысах альбиносах Wistar, обработанных 8-MOP, показали, что после облучения около 26% обнаруженных фотоаддуктов являются фотоаддуктами ненасыщенных липидов мембран, что выше, чем наблюдаемое количество фотоаддуктов для ДНК/РНК (17%) [98].

1.2.3. РЕАКЦИИ ПСОРАЛЕНОВ С ПЕРЕНОСОМ ЭЛЕКТРОНА И С КИСЛОРОДОМ

Начиная с конца 70-х годов прошлого века, в литературе предполагалось взаимодействие триплетов псораленов с молекулярным кислородом [48; 52–57]. В реакциях с участием кислорода (по электронно-обменному механизму) энергия

возбуждения от триплетного состояния псоралена переходит к молекулярному кислороду. Молекулярный кислород в возбужденном синглетном состоянии ($^1\Delta_g$ состояние) может в свою очередь очень быстро взаимодействовать без определенной избирательности с широким рядом биомолекул, приводя, в конечном счете, к их разрушению. На примере ряда фурукумаринов было показано, что синглетный кислород образуется при облучении УФ-А светом кислородсодержащих растворов 8-MOP, 5-MOP, 4,5',8-TMP, 5,8-диметоксипсоралена (5,8-MOP), 3-CPs и других, при этом образования синглетного кислорода не было зарегистрировано для ангелицина [54; 55]. В бензольных растворах не было зарегистрировано образования супероксид радикала. Квантовые выходы синглетного кислорода в водных растворах фурукумаринов невелики и составляют: псорален (0.18), 5-MOP (0.013) и 8-MOP (0.035). Обращает на себя внимание уменьшение выходов синглетного кислорода для замещенных псораленов, применяемых в качестве лечебных препаратов, по сравнению с незамещенным. Было зарегистрировано образование значительного количества синглетного кислорода для нековалентных комплексов 8-MOP с бычьим ДНК и для ковалентных аддуктов. Введение 8-MOP в липосомы яичного фосфатидилхолина приводит к перекисному окислению липидов [99].

В [52] теоретически методом TD-DFT с включением континуальной модели для учета влияния растворителя были исследованы фототоксические реакции между большим набором возбужденных фурукумаринов с молекулярным кислородом. Было сделано заключение, что фурукумарины действительно вступают в реакции с молекулярным кислородом и способны генерировать как синглетный кислород, так и супероксид радикал. Однако при определенных условиях супероксид радикал может в свою очередь восстанавливать триплетный псорален, предотвращая таким образом образование АФК. В [52] был исследован прямой перенос электрона между псораленом и кислородом, а также влияние триплетного возбуждения на реакцию аутоионизации между фурукумаринами.

Реакции переноса электрона в псораленах при фотовозбуждении рассматриваются с конца 70-х годов прошлого века. Было показано, что при

тушении триплетного состояния 4',5'-дигидропсоралена аминокислотой триптофаном образуются анион-радикал псоралена и радикал катион триптофана, т.е. происходит перенос электрона от триптофана на триплет 4',5'-дигидропсоралена [100]. Как отмечалось выше (раздел 1.2.1) в водных растворах триплеты замещенных фурукумаринов являются эксиплексами с частичным переносом электрона от молекулы воды на фурукумарин, т.е. в некотором смысле являются предшественниками анион-радикалов [68].

Методом фемтосекундной лазерной спектроскопии было показано, что эффективный фотоиндуцированный перенос электрона с образованием анион-радикала происходит в АМТ, интеркалированный в ДНК [42]. Поскольку это противоречит общепринятому механизму образования аддуктов с тиминовыми основаниями ДНК, то этот процесс был детально исследован с использованием синтезированных модельных ДНК. На примере взаимодействия АМТ с короткими синтетическими ДНК дуплексами, включающими или только GC основания, или только AT основания было однозначно показано, что в случае AT ДНК образуются аддукты с участием триплетов АМТ, а в случае GC ДНК основания гуанина эффективно восстанавливают АМТ. Этот процесс происходит в возбужденном синглетном состоянии АМТ, что приводит к уменьшению времени жизни возбужденных синглетов более чем на два порядка, и триплеты практически не образуются [43]. Гибель анион-радикала происходит в реакции рекомбинации с катион-радикалом гуанина. Время жизни образующегося анион-радикала АМТ составляет ~10 мкс. Поскольку использование псораленов в медицинских целях предполагает образование аддуктов с ДНК, а ДНК в живых организмах содержит все типы оснований, то при исследовании взаимодействия псораленов с ДНК квантовые выходы образования аддуктов существенно ниже, чем в модельных системах. Авторы предполагают, что повысить выход аддуктов и подавить нежелательный фотоиндуцированный перенос электрона можно с помощью дизайна псораленов, активных к образованию аддуктов.

Известно, что G-квадруплексы ДНК являются целями для противораковых препаратов, и их взаимодействие с малыми молекулами становится важной

областью исследований. Поскольку было показано, что псоралены в возбужденном состоянии взаимодействуют с G основаниями ДНК [41; 42] с образованием ион-радикалов, калориметрическими и спектроскопическими методами были исследованы последствия взаимодействия АМТ с 22-мерной теломерной последовательностью AGGG(TTAGGG)₃, образующей G-квадруплексы [101]. Было показано, что при фотовозбуждении образуется ион-радикальная пара (АМТ[•]G^{•+}) с временем жизни 30 пс. Авторы полагают, что псоралены могут рассматриваться как перспективный класс соединений для развития противораковой терапии.

Экспериментально зарегистрировано образование катион-радикалов 5-MOP, 8-MOP и 4,5',8-TMP при прямом фотовозбуждении ($\lambda_{\text{возб}}$ 355 нм) в водных или ацетонитрильных растворах, насыщенных кислородом, с выходами, не превышающими 0.02 [58; 102; 103]. Фотоионизация происходит в результате однофотонного процесса из возбужденного синглетного состояния. Показано, что катион-радикалы 8-MOP взаимодействуют с гуанозин монофосфатом (GMP) с константой скорости, близкой к диффузионной (схема 1.1), при этом константа скорости с аденозин монофосфатом ниже на 2 порядка, а реакция с пиримидиновыми основаниями происходит еще медленней [58]. Образовавшийся катион-радикал GMP^{•+} депротонируется с образованием радикала GMP[•].

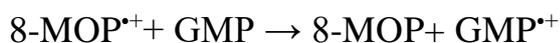


Схема 1.1 – Взаимодействие катион-радикала 8-MOP с гуанозин монофосфатом

По аналогичной схеме катион-радикал 8-MOP взаимодействует с легко окисляющимися аминокислотами (триптофаном и тирозином) и диенами. Таким образом, в результате взаимодействия катион-радикалов псораленов с GMP, аминокислотами и диенами в реакции одноэлектронного окисления субстрата восстанавливается исходный псорален и образуется окисленный нуклеотид, аминокислота или компонент мембраны соответственно. Это отличает эти реакции от образования циклоаддуктов с тиминовыми основаниями, в которых

происходит необратимое связывание псораленов и соответственно их расходование [58].

В работе [104] была предложена модель оценки количественного соотношения структура–реакционная способность (QSPR) и прогноза эффективности образования и реакций триплетного состояния фурукумаринов. Модель была опробована на 26 фурукумаринов, включая псоралены и ангелицины. Была оценена возможность образования триплетов, активных форм кислорода и катион- и анион-радикалов с участием триплетов (Схема 1.2, где Fc – фурукумарин).



Схема 1.2 – Реакции триплетов фурукумаринов

Расчеты показали, что образование катион- и анион-радикалов в реакции аутоионизации (3) маловероятно, но возможна в реакции переноса электрона между двумя триплетами (4).

1.3. СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ПОИСКА НОВЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ ДЛЯ ПУВА-ТЕРАПИИ

Более 20 лет назад появился обзор научных исследований и медицинских данных, полученных за 50 лет активного применения ПУВА терапии [2]. В этом обзоре отмечались как достижения метода, так и побочные явления, которые были выявлены на основании медицинской статистики. С этих пор начался поиск новых препаратов для ПУВА-терапии, которые сохранили положительные свойства используемых псораленов (образование нековалентных связей с ДНК с

последующим фотоиндуцированным присоединением к тиминовым основаниям с образованием моноаддуктов), но были бы лишены их отрицательных качеств (образование кросс-сшивок между молекулами ДНК в дуплексе за счет диаддуктов). Интересно отметить, что один из авторов обзора [2] Ф. П. Гаспарро (F. P. Gasparro) все прошедшие годы продолжал исследования соединений на основе псораленов для ПУВА-терапии, и недавно появилась большая статья возглавляемого им коллектива авторов, в которой проводится сравнительное исследование 73 новых соединений на основе линейных псораленов с различными заместителями [40]. В этой работе сопоставляются такие свойства псораленов, как их способность к интеркаляции в структуру ДНК, их токсичность и фототоксичность. При скрининге способности индуцировать смерть клеток были выявлены два производных из 73 (6E и 1F, Рисунок 1.6), которые более фотоцитотоксичны, чем 4'-аминометил-4,5',8-триметил псорален (АМТ), один из наиболее перспективных псораленов на сегодняшний день. Была установлена корреляция между повышенным нековалентным связыванием с ДНК и фотоцитотоксичностью. Наиболее активные производные содержат положительно заряженные заместители, которые увеличивают интеркаляцию псораленов.

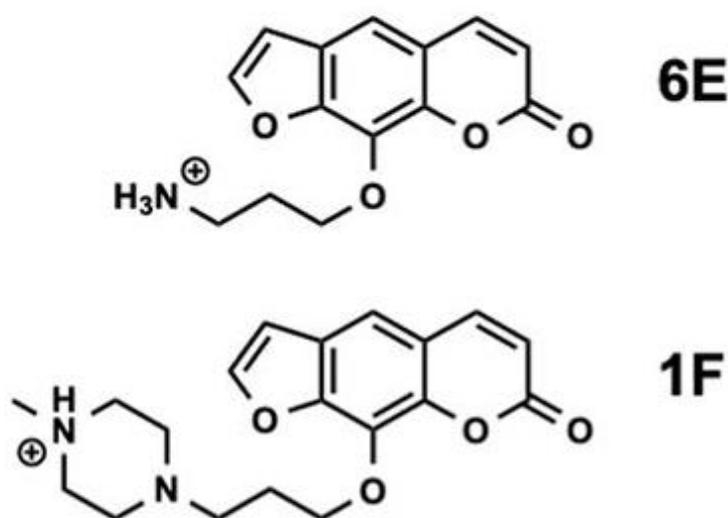


Рисунок 1.6 – Структуры наиболее перспективных псораленов, выявленных в [40]

В похожем направлении работают авторы исследования, которые с целью увеличения растворимости и способности к интеркаляции в ДНК ввели в 8-MOP положительно заряженные заместители в положение 5 (Рисунок 1.7) [105]. Действительно, синтезированные соединения обладают повышенной растворимостью (> 1 мМ) по сравнению с 8-MOP (0.2 мМ, [47]), а константа диссоциации комплексов с ДНК уменьшается с 1.1×10^{-3} М для 8-MOP до величины 9.2×10^{-6} М для ТМАРЕМ⁺.

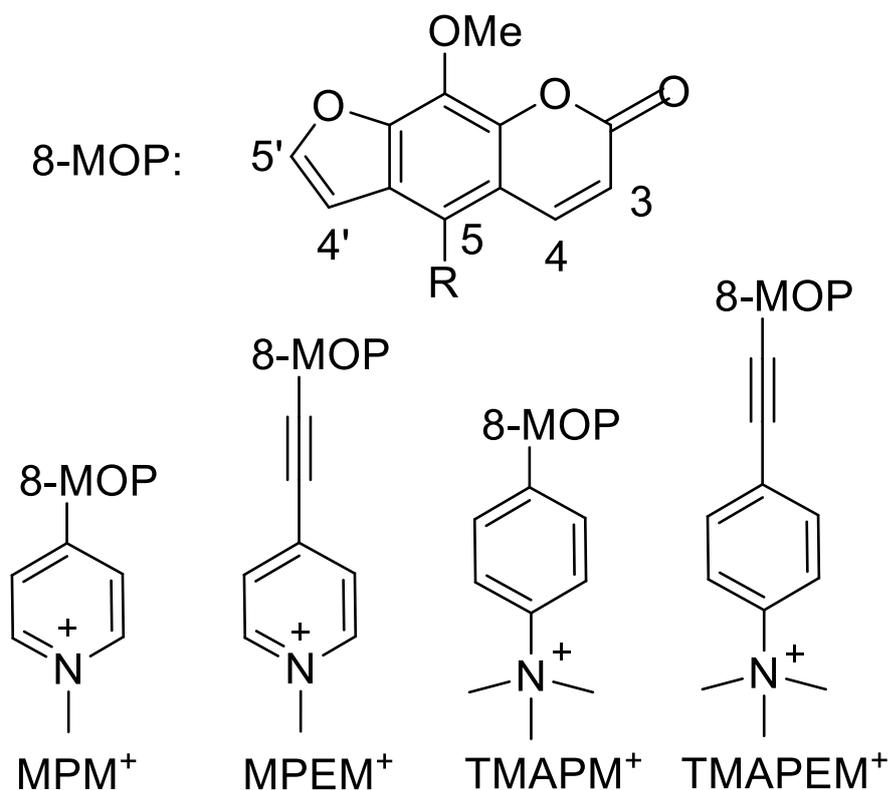


Рисунок 1.7 – Синтезированные структуры производных 8-MOP. Заместители связаны ковалентно с положением 5 в 8-MOP. (Воспроизведено из [105])

Однако, оценки показали, что эти соединения в возбужденном синглетном состоянии могут достаточно эффективно взаимодействовать с гуанозином в реакции переноса электрона, при этом экспериментально установлено, что эффективность их реакции с тиминовыми основаниями модельной АТ-ДНК низка. Авторы связывают этот факт с тем, что несмотря на низкую константу диссоциации нековалентного комплекса с ДНК объемный заместитель в положении 5 увеличивает расстояние между фурановым фрагментом молекулы

псоралена и тиминовым основанием ДНК и таким образом существенно замедляет образование ФМА. Однако авторы не теряют оптимизма и считают, что их исследование дает направление для дальнейшего развития синтеза новых псораленов для ПУВА терапии [105].

Другое направление поиска новых более эффективных и менее токсичных препаратов для ПУВА-терапии и фотоферезиса заключается в синтезе ангулярных псораленов или их аналогов, которые при взаимодействии с ДНК аналогично ангелицину не образуют диаддуктов из-за стерических затруднений. Были синтезированы и исследованы ангелициновые биоизостеры, а именно фуорохинолиноны [106–108]. Среди них 1,4,6,8-тетраметилфуоро[2,3-*h*]хинолин-2(1Н)-он (FQ) [107] и 4,6,9-триметилфуоро[2,3-*h*]хинолин-2(1Н)-он (HFQ) [108] являются наиболее перспективными соединениями (Рисунок 1.8).

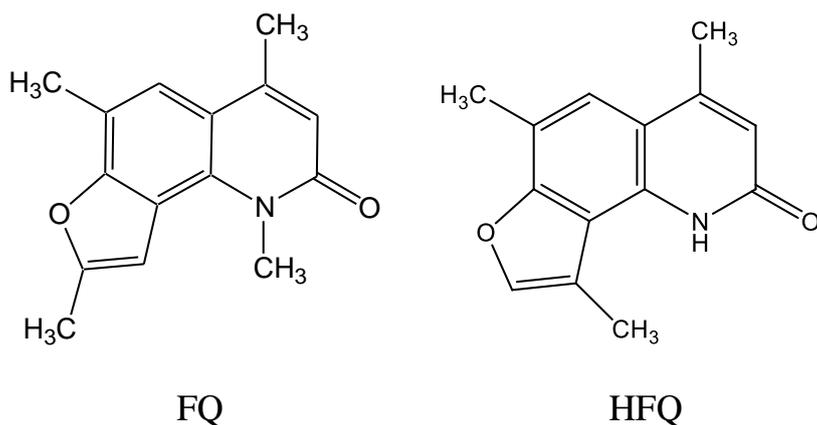


Рисунок 1.8 – Структуры 1,4,6,8-тетраметилфуоро[2,3-*h*]хинолин-2(1Н)-она (FQ) и 4,6,9-триметилфуоро[2,3-*h*]хинолин-2(1Н)-она (HFQ)

Оба соединения характеризуются очень сильной фотосенсибилизирующей активностью. Однако FQ демонстрирует явную кожную фототоксичность и кластогенную активность, но эти местные эффекты уменьшены или отсутствуют у HFQ. Оба соединения образуют большое количество МА и DPC, без образования ДА. Вместе с тем, как оказалось, образование и структура сшивок ДНК–белок отличается для этих двух соединений. В самом деле, DPC для FQ является настоящим бифункциональным аддуктом, в котором молекула FQ ковалентно связана между ДНК и протеином [108]. Похожие на ДА, эти DPC

образуются при двустадийной реакции, сначала формируются ФМА по фурановому кольцу между FQ и пиримидиновым основанием ДНК, а затем взаимодействие с протеином приводит к DPC. Используя хорошо известную технику двойного облучения FQ, наблюдали, что DPC является причиной его очень высокой кластогенной активности.

Отличие HFQ, индуцирующего DPC без соучастия в реакции, доказывает, что образование МА с HFQ идет без превращения в диаддукты. Этот пример, в котором ДНК и протеин напрямую взаимодействуют друг с другом, имеет сходство с DPC, вызванного УФ-С. Разная природа DPC, возможно, является одной из причин различия токсических свойств этих двух фуорохинолинов. Отсутствие кожной фототоксичности в случае HFQ может быть также вызвано возможной антиоксидантной активностью этого соединения, связанной с наличием группы NH в его структуре. Однако авторы исследования не рассматривали такую возможность.

Цитотоксичная активность HFQ была определена при UV-облучении клеток рака молочной железы, также были изучены взаимодействия с ДНК и способность к клональному росту, оценена T2 болезнетворность. Оказалось, что данное соединение обладает большей активностью, чем 8-MOP и не обладает какой-либо мутагенной активностью и кожной фототоксичностью. С учетом всех этих свойств, HFQ может быть потенциальным препаратом для ПУВА-терапии и фотоферезиса.

1.4. ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

2,2,4-триметилзамещенные 1,2-дигидрохинолины (ДГХ) давно известны и широко применяются как эффективные нетоксичные антиоксиданты ненасыщенных соединений и полимеров [109–114]. В лаборатории процессов фотосенсибилизации ИБХФ РАН в течение многих лет исследовались их фотохимические и фотофизические свойства [115], которые показали, что эти соединений имеют низкие квантовые выходы триплетов [116; 117]. Было предположено, что введение фуранового цикла в структуру гидрированных

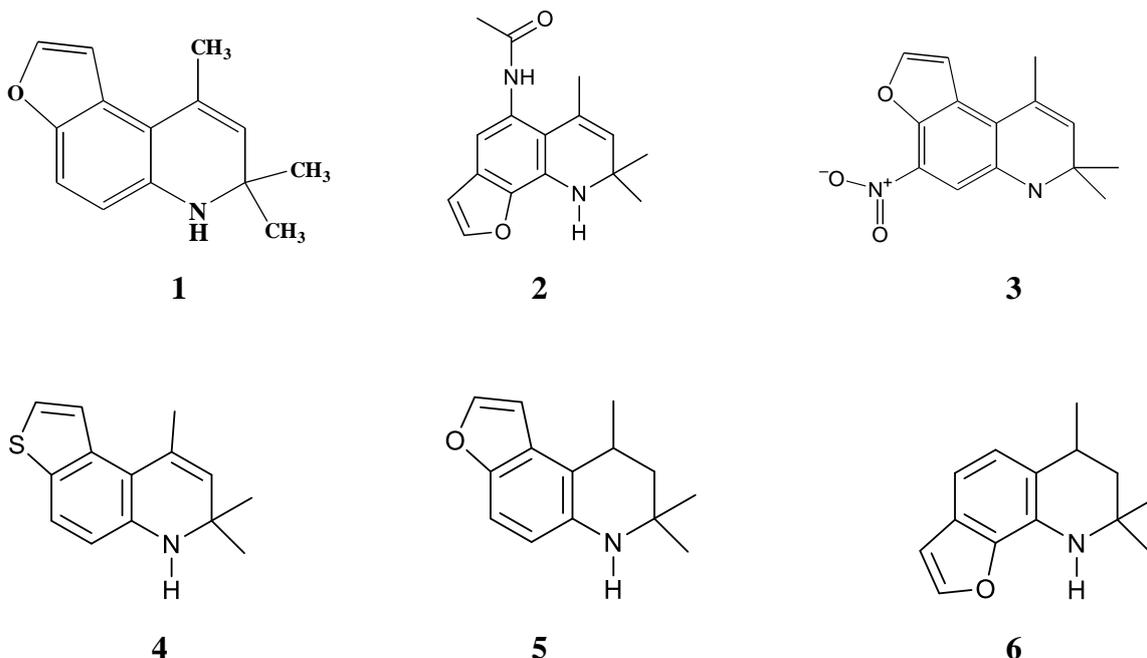
хинолинов увеличит квантовый выход триплетов и по аналогии с фуорохинолинами фуоропроизводные ДГХ могут быть исследованы в качестве возможных препаратов для ПУВА-терапии. Была синтезирована серия фуоропроизводных гидрированных хинолинов [118–121], первым из которых был 7,7,9-триметил-6,7-дигидрофуоро[3,2-*f*]хинолин [118]. Было показано, что это соединение обладает высокой антиоксидантной активностью.

В настоящей работе представлено исследование фотохимических и фотофизических процессов, протекающих с новыми фуоро- и тиенилпроизводными гидрированных хинолинов с целью установления потенциальной возможности их использования в качестве препаратов для ПУВА-терапии. Было исследовано образование триплетных состояний этих соединений и их взаимодействие с тиминовыми основаниями ДНК, а также их темновая и фотоцитотоксичность. Полученные результаты дают основания для дальнейших испытаний ФДГХ для использования в фотодерматологии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. ВЕЩЕСТВА И РЕАКТИВЫ

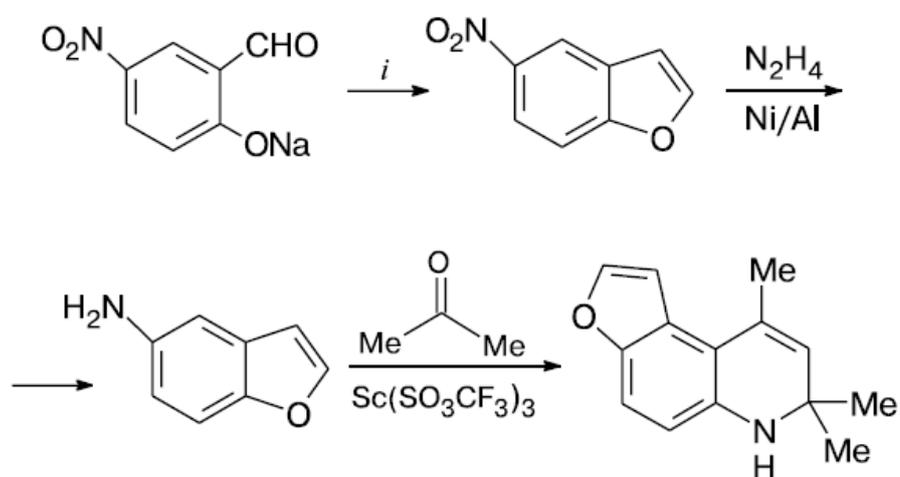
Для исследования фотохимических и фотофизических свойств производных гидрированных фуру- и тиенилхинолинов был разработан и впервые осуществлен синтез 6 соединений*, в том числе трех фуродигидрохинолинов (ФДГХ): 7,7,9-триметил-6,7-дигидрофуоро[3,2-*f*]хинолин (1), N-(6,8,8-триметил-8,9-дигидрофуоро[3,2-*h*]хинолин-5-ил)ацетамид (2) и 7,7,9-триметил-4-нитро-6,7-дигидрофуоро[3,2-*f*]хинолин (3); тиенодигидрохинолина (ТДГХ): 7,7,9-триметил-6,7-дигидротиено[3,2-*f*]хинолин (4); и двух фуротетрагидрохинолинов (ФТГХ): 7,7,9-триметил-6,7,8,9-тетрагидрофуоро[3,2-*f*]хинолин (5) и 6,8,8-триметил-6,7,8,9-тетрагидрофуоро[3,2-*h*]хинолин (6).



Исходными соединениями для синтеза различных фурохинолинов, могут стать доступные амино- и нитрофенолы с различными заместителями. В рамках данной работы были разработаны методы синтеза, позволяющие синтезировать фуродигидро- и фуротетрагидрохинолины различного строения.

Синтез ФДГХ 1 представлен на Схеме 2.1 [118].

*Работа по синтезу исследуемых соединений осуществлена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук, д.х.н. Е.Н. Ходотом. Диссертант принимал участие в синтезе и наработке соединений 1 и 4 для последующих исследований.



i. 1) $\text{MeCH}(\text{OEt})_2$, 2) 25%-ная H_2SO_4

Схема 2.1 – Синтез ФДГХ 1

Синтез **7,7,9-триметил-6,7-дигидрофуоро[3,2-f]хинолина (ФДГХ 1)**. Для получения 5-аминобензофурана раствор 1.63 г (10 ммоль) 5-нитробензофурана в 10 мл метанола с 12 мг никель-алюминиевого сплава (50/50) перемешивали 20 мин при 50 °С. Затем прибавили 1.52 мл (30 ммоль) гидразингидрата так, чтобы температура в реакционной колбе держалась около 58–60 °С. После прибавления всего гидразина реакционную смесь кипятили 1 ч, отфильтровали и упарили в вакууме. Остаток растворили в 10 мл сухого диэтилового эфира и через полученный раствор пропустили газообразный HCl . Выпавшие, слегка окрашенные в розовый цвет кристаллы отфильтровали и высушили в вакууме. получили 1.5 г (88.7%) неочищенного солянокислого 5-аминобензофурана.

Растворили 1.69 г (10 ммоль) солянокислого 5-аминобензофурана в 4 мл воды и осторожно добавили 1.8 г (20 ммоль) бикарбоната натрия. после прекращения газовыделения экстрагировали эфиром (3×5), объединенные органические слои сушили MgSO_4 . После упаривания в вакууме остаток растворили в 3 мл сухого ацетона. К раствору прибавили 0.5 г (1 ммоль) трифлата скандия и перемешивали 3 ч при комнатной температуре. Контроль за ходом реакции осуществляли методом ТСХ (силикагель Sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ, этилацетат-гексан, 1 : 3). По окончании реакции реакционную смесь упарили в

вакууме досуха, прибавили 3 мл хлороформа и профильтровали через слой силикагеля. Очистку проводили методом флеш-хроматографии (этилацетат-гексан, 1 : 3). Получили 1.56 г (73%) 7,7,9-триметил-6,7-дигидрофуоро[3,2-f]хинолина; т. пл. 58–58.5 °С (из бензола). Найдено (%): С, 78.79; Н, 7.12; N, 6.59. $C_{14}H_{15}NO$. Вычислено (%): С, 78.84; Н, 7.09; N, 6.57. Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д., $J/Гц$): 7.52 (д, 1 H, H(10a), $J = 1.9$); 7.17 (д, 1 H, H(12a), $J = 8.54$); 6.91 (д, 1 H, H(11a), $J = 1.9$); 6.49 (д, 1 H, H(13a), $J = 8.54$); 5.35 (с, 1 H, H(8a)); 3.64 (уш.с, 1 H, NH); 2.27 (с, 3 H, C(9)Me); 1.28 (с, 6 H, C(7)(Me) $_2$). Спектр ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 149.76 (C(2)); 144.67 (C(10)); 139.33 (C(5)); 129.68 (C(8)); 129.10 (C(9)); 123.94 (C(4)); 114.01 (C(3)); 111.95 (C(13)); 110.81 (C(12)); 106.91 (C(11)); 51.34 (C(7)); 29.71 (C(14, 15)); 21.85 (C(16)). Масс-спектр (ЭУ, 70 эВ), m/z ($I_{отн}$ (%)): 213 $[M]^+$ (11), 198 $[M - CH_3]^+$ (100), 183 $[M - 2CH_3]^+$ (2), 168 $[M - 3CH_3]^+$ (7), 154 $[C_{10}H_4NO]^+$ (5). УФ-спектр (гексан), $\lambda_{max}/нм$ ($\epsilon/л \cdot (см \cdot моль)^{-1}$): 363 (3250), 264 (12940), 211 (18350).

Синтез N-(6,8,8-триметил-8,9-дигидрофуоро[3,2-h]хинолин-5-ил)ацетамида (ФДГХ 2) запатентован [119] и впоследствии описан в [120]. Растворили N-(7-амино-1-бензофуран-4-ил)ацетамида (3.8 г, 20 ммоль) в 30 мл сухого ацетона. К раствору прибавляли 1.0 г (2 ммоль) трифлата скандия и кипятили при перемешивании в течение 8 часов. Контролировали ход реакции методом ТСХ (силикагель sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ, этилацетат). Растворитель отгоняли при пониженном давлении. Продукт очищали методом колоночной хроматографии (силикагель, элюент – этилацетат). Выход продукта после перекристаллизации из этилацетата составил 1.48 г (выход 27.4%). Элементный анализ: обнаружено С (71.15%), Н (6.92%), N (10.24%). Вычислено С (71.09%), Н (6.71%), N (10.36%). 1H NMR (300 MHz, DMSO- D_6) δ , ppm 1.24 (s, 6H), 1.97 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 5.24 (s, 1H), 6.04 (s, 1H), 6.59 (s, 1H), 6.78 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J = 2.6$, 1H), 9.38 (s, 1H). ^{13}C NMR (500 MHz, DMSO- D_6) δ , ppm 168.33, 145.65, 140.83, 130.43, 129.76, 129.45, 128.18, 126.07, 113.43, 107.03, 49.94, 29.05, 23.11, 21.60. Масс-спектр $[M + H^+]$ 271 (ESI).

7,7,9-Триметил-4-нитро-6,7-дигидрофуро[3,2-f]хинолина (ФДГХ 3) был синтезирован по схеме аналогичной синтезу ФДГХ 1.

Был разработан синтез 7,7,9-триметил-6,7-дигидроотиено[3,2-f]хинолина (ТДГХ 4), включающий 4 стадии (Схема 2.2) и наработано 0.21 г этого соединения для исследования спектрально-кинетических характеристик.

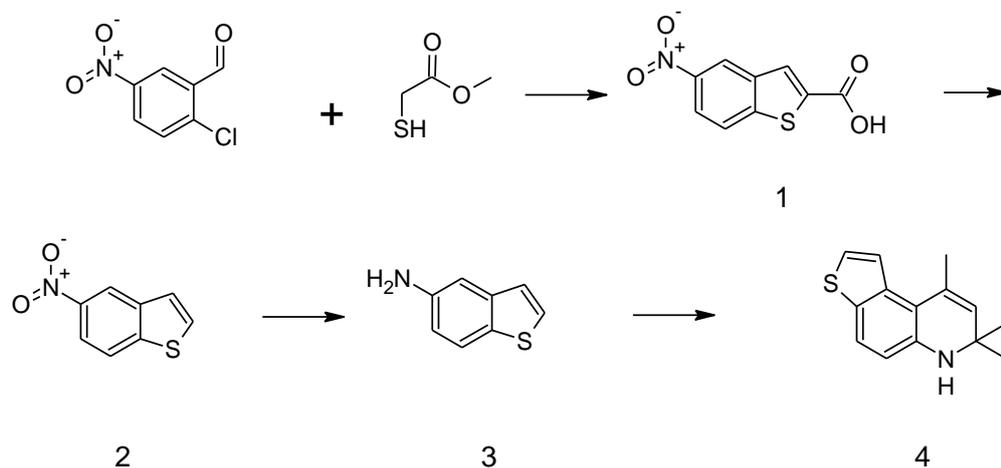


Схема 2.2 – Синтез 7,7,9-триметил-6,7-дигидроотиено[3,2-f]хинолина

5-Нитробензотиофен-2-карбокси кислота (1)

К нагретому до 40°C раствору метил меркаптоацетата (8,55 г, 0,081 моль) в абсолютном метаноле (170 мл), под аргоном прибавили раствор метилата натрия в метаноле (22 мл, 4,37 М, 0,097 моля). Реакционную смесь нагрели до 50°C и к ней прилили через капельную воронку раствор 2-хлор-5-нитро-бензальдегида (15 г, 0,081 моль) в 120 мл метанола. Вскоре начинается выпадение осадка. После прибавление всего раствора, полученную суспензию нагревали при 60°C в течение одного часа и затем дали остыть до комнатной температуры. К смеси прибавили раствор гидроксида натрия (33 мл, 2,5 М) и кипятили с перемешиванием 2 часа. После охлаждения до комнатной температуры полученный раствор охладили в ледяной бане и подкислили конц. соляной кислотой до pH 4. По мере подкисления, и выпадения осадка прибавляли воду для лучшего перемешивания. Выпавший осадок отфильтровали, промыли водой и сушили в вакууме (60°C, 14 мм Hg). Получено 4,0 г (96%).

Т.пл. 235-237°C. $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 8,79 (д, $J=2\text{Hz}$, 1H), 8,23 (дд, $J=8\text{ Hz}$, $J'=2\text{ Hz}$, 1H), 8,08 (д, $J=8\text{ Hz}$, 1H), 7,97 (с, 1H)

5-Нитробензотиофен (2)

К раствору 5-нитробензотиофен-2-карбокси кислоты (1,62 г, 7,26 ммоль) в хинолине (8 мл) при хорошем перемешивании, прибавили медный порошок (0,46 г, 7,26 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 190°C до прекращения газовыделения (около 0,5 часа). Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, выливали в мелко колотый лёд (30 мл) и подкисляли концентрированной соляной кислотой. Полученную суспензию экстрагировали эфиром (3 × 10), объединённые органические слои промыли 2NHCl (1 × 4 мл), водой (1 × 4) и рассолом (1 × 4 мл), затем сушили над прокалённым сульфатом натрия. Растворитель отогнали досуха при пониженном давлении, остаток перекристаллизовывали из ацетона. В результате получили чистый 5-нитробензотиофен (0,85 г, 65%).

T пл. 149-150°C

¹H NMR (CD₃OD) δ 8,84 (д, J=2Hz, 1H), 8,24 (дд, J=8 Hz, J'=2 Hz, 1H), 8,16 (д, J=8 Hz, 1H), 7,89 (д, J=6 Hz, 1H), 7,65 (д, J=6 Hz, 1H)

5-Аминобензотиофен (3)

Раствор 5-нитробензотиофена (0,70 г, 3,9 ммоль) в спирте (14 мл) гидрогенизировали в автоклаве при давлении 3 атм. и комнатной температуре над 10% Pd/C (0,2 г) до поглощения расчётного количества водорода. Катализатор удалили фильтрацией через слой силикагеля, растворитель отогнали при пониженном давлении. Остаток растёрли с петролейным эфиром, кристаллы отфильтровали. Получили 0,56 г (95%) 5-аминобензотиофена.

T. пл. 71-72°C. ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,63 (д, J=8 Hz, 1H), 7,38 (д, J=4Hz, 1H), 7,28 (д, J=4Hz, 1H), 7,09 (д, J=2 Hz, 1H), 6,78 (дд, J=8 Hz, J'=2 Hz, 1H), 3,70 (уш.с, NH₂).

7,7,9-Триметил-6,7-дигидротиено[3,2-f]хинолин (4)

К раствору амина **3** (0,5 г, ммоль) в 3 мл сухого ацетона прибавили 0,05 г трифлата скандия. Реакционную смесь нагревали в микроавтоклаве при 120°C, периодически контролируя ход реакции ТСХ (петролейный эфир этилацетат 3:1). Через 48 часов нагревания растворитель отогнали, остаток растворили в

этилацетате и раствор трижды промыли водой. Экстракт сушили сульфатом магния. После отгонки растворителя остаток чистили на колонке с силикагелем (петролейный эфир – этилацетат 3:1). Получили 0,21 г (27,3%) 7,7,9-триметил-6,7-дигидрофуоро[3,2-*f*]хинолина в виде стеклообразной массы. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ , м.д.: 7,65 (уш.с., 1H), 7,53 (д, J 8 Hz, 1H), 7,40 (д, J 6 Hz, 1H), 6,69 (уш.с., 1H), 5,42 (уш.с., 1H), 4,32 (уш.с., 1H), 2,37 (с, 3H), 1,31 (с, 6H); МСВР: ($M+H^+$)/ z 230,0996

7,7,9-Триметил-6,7,8,9-тетрагидрофуоро[3,2-*f*]хинолин (ФТГХ 5) и 6,8,8-триметил-6,7,8,9-тетрагидрофуоро[3,2-*h*]хинолин (ФТГХ 6) были синтезированы восстановлением соответствующих ФДГХ. Восстановление ФДГХ 1 осуществляли водородом с использованием Pd/C катализатора. Подбор катализатора представлял определенную трудность, поскольку надо было восстановить двойную связь дигидрохинолина, не затрагивая двойную связь фуранового кольца (Схема 2.3). Целевой продукт получали в виде зеленоватого, густого масла.

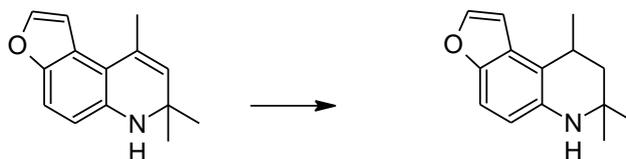


Схема 2.3 – Синтез ФТГХ 5

Синтез 6,8,8-триметил-6,7,8,9-тетрагидрофуоро[3,2-*h*]хинолина (ФТГХ 6) осуществляли согласно Схеме 2.4. Синтез 6,8,8-триметил-6,7,8,9-тетрагидрофуоро[3,2-*h*]хинолина осложняется тем, что соответствующий фуродигидрохинолин подвергается самопроизвольной олигомеризации. Это приводит к тому, что выход целевого продукта не превышает 16 %, а также к тому, что фотохимические и фотофизические свойства соответствующего фуродигидрохинолина не были исследованы.

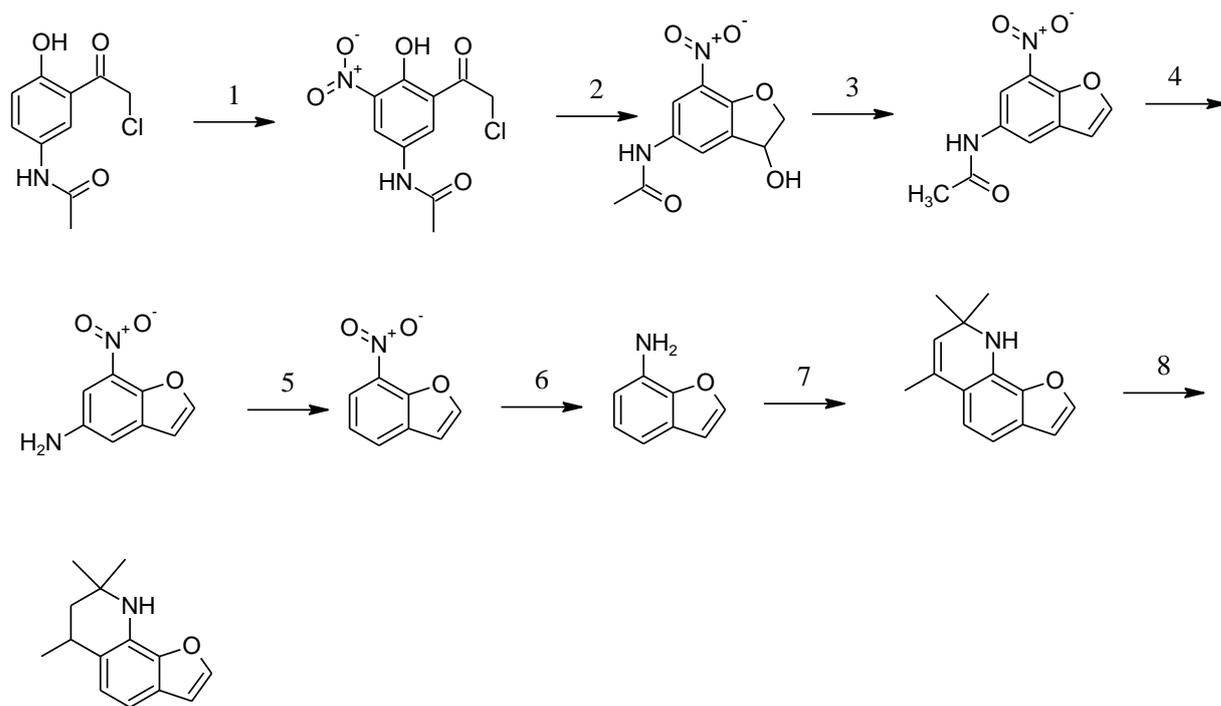


Схема 2.4 – Синтез ФТГХ 6

При исследовании образования триплетных состояний ФДГХ использовали 3,3'-диэтил-2,2'-тиакарбоцианин йодид (Краситель № 20, $\lambda_{\max} = 550$ нм и $\epsilon = 1.5 \times 10^5$ л моль⁻¹см⁻¹) и тетранатриевую соль сульфобенз(а)пирена (SBP). Структуры и спектры поглощения представлены на Рисунках 2.1 и 2.2.

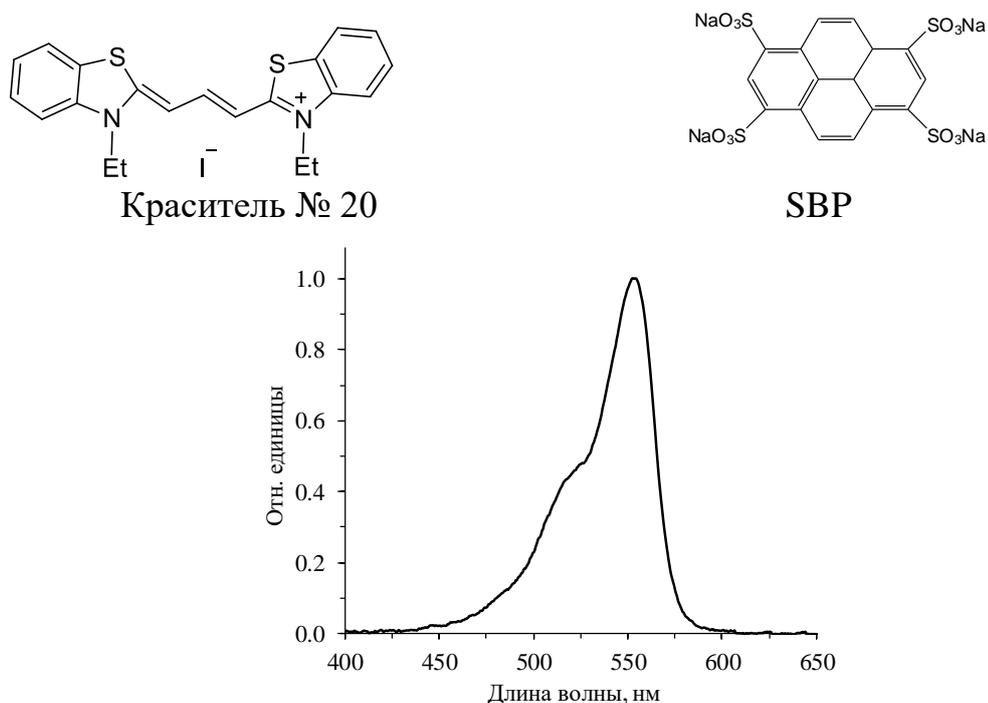


Рисунок 2.1 – Нормированный по максимуму поглощения спектр поглощения цианинового красителя № 20

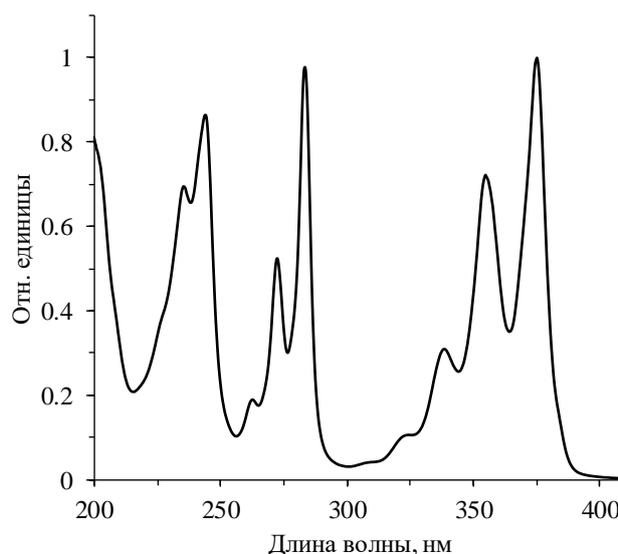
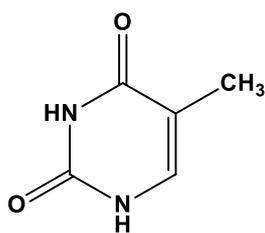
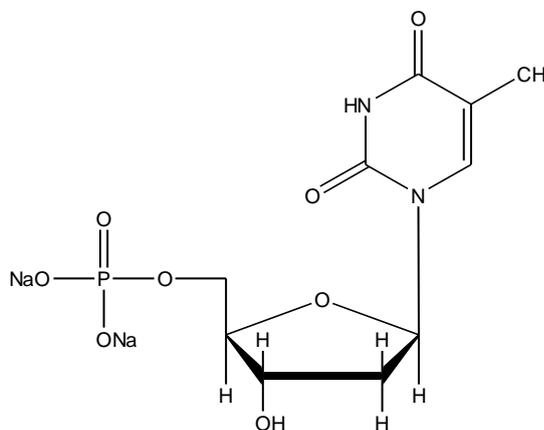


Рисунок 2.2 – Нормированный по длинноволновой полосе спектр поглощения SBP

При изучении взаимодействия триплетов ФДГХ 1–3 и ФТГХ 5 с основаниями ДНК использовали тимин (99%, производства фирмы «Acros Organics», CAS: 65-71-4) и тимидин 5'-монофосфат динатриевую соль (99%, производства фирмы «Sigma-Aldrich», CAS: 33430-62-5).



Тимин



Тимидин 5'-монофосфат динатриевая соль (TMP)

В качестве растворителей использовали метанол для спектроскопии (Merck), очищенный перед употреблением от следов воды и кислот перегонкой над $Mg(CH_3O)_2$, гексан (х.ч. «Компонент Реактив»), ацетонитрил (х.ч. «Компонент

Реактив»), этанол (ГОСТ Р 51652-2000г ЗАО «Сармаковский СДК») и дважды дистиллированную воду.

Растворы для опытов готовили следующим образом: навеску исследуемых веществ растворяли в соответствующем растворителе. Концентрацию красителей определяли в соответствии с законом Бугера–Ламберта–Бера. Для этого измеряли оптическая плотность на спектрофотометре "Shimadzu UV-3101 PC" в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см.

2.2. СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ И ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Спектры поглощения и флуоресценции регистрировали на спектрофотометре "Shimadzu UV-3101 PC" в области 200-700 нм и спектрофлуориметре "Shimadzu RF-5301 PC" в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см. Квантовые выходы флуоресценции (φ^{fl}) измеряли методом сравнения со стандартом, в качестве которого использовали 1,4-ди-[2-(5-фенилоксазолил)]-бензол (РОРОР) с квантовым выходом флуоресценции, близким к единице в гексане (0.97), максимумы поглощения и испускания которого близки к соответствующим максимумам исследуемых веществ ($\lambda_{max} = 345$ нм, $\lambda_{max}^{fl} = 430$ нм, Рисунок 2.3).

Раствор РОРОР готовили в гексане. Квантовые выходы флуоресценции вычисляли по уравнению (1), которое учитывает изменение свойств растворителя через соотношение их показателей преломления. В уравнении (1) I – относительная интенсивность флуоресценции, равная площади под спектром флуоресценции; A – поглощение на длине волны возбуждения, которое не превышало 0.08; n – показатель преломления растворителя; индексы 1 и 2 относятся к ФДГХ и РОРОР соответственно. Ошибка в определении квантовых выходов составляет 10%.

$$\varphi_1^{fl} = \varphi_2^{fl} n_1^2 I_1 A_2 / n_2^2 I_2 A_1 \quad (1)$$

Обработку экспериментальных данных проводили на ПК с использованием опции Solver программы MS Excel.

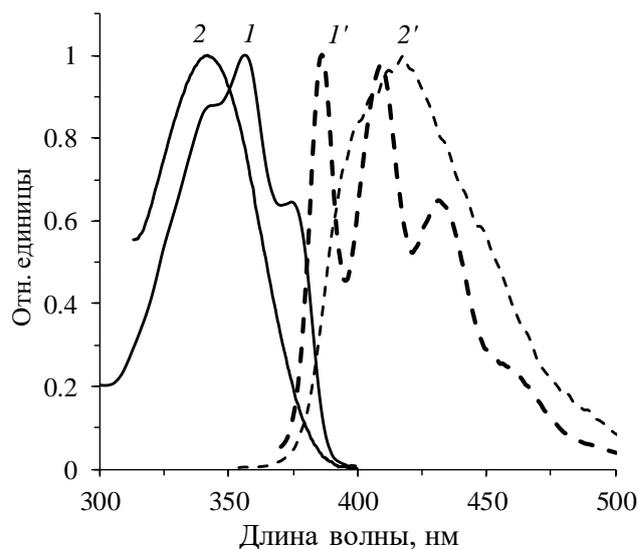


Рисунок 2.3 – Нормированные спектры флуоресценции (пунктирная линия) и поглощения (сплошная линия) РОРОР в гексане (1, 1') и ФДГХ 2 в метаноле (2, 2')

2.3. СТАЦИОНАРНЫЙ ФОТОЛИЗ

Стационарный фотолиз проводили с использованием ртутной лампы ДРШ-1000 или диода LED 365 нм в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см и $[C] = 2 \times 10^{-4}$ моль л⁻¹, возбуждая длинноволновую полосу поглощения исследуемых соединений. При использовании ртутной лампы возбуждение проводили светом $400 > \lambda > 300$ нм. Для выделения УФ-области для облучения использовали фильтр УФС-5 с пропусканием в области 390-320 нм. Он пропускает до 90 % излучения 360 нм и поглощает всю видимую область. Реакцию контролировали по УФ-спектрам на спектрофотометре "Shimadzu UV-3101 PC". При проведении стационарного фотолиза в отсутствие O₂ растворы предварительно продували Ar в течение 20 мин и герметически закрывали.

Разделение образцов после стационарного фотолиза проводилось на хроматографе фирмы Tracor (Нидерланды), состоящем из программатора сольвентов, одного насоса высокого давления, инжектора Rheodyne, термостата колонок и УФ-детектора с переменной длиной волны. Использовалась колонка "Luna C18(2)" ($l = 15$ см, $d = 0.46$ см, размер частиц 5 мкм, Phenomenex) при скоростях потока 1 мл/мин, 45 °С, элюент вода : ацетонитрил, градиент от 5% до

80%. Продукты выделяли методом препаративной ВЭЖХ. Фотолизат до разделения продуктов и выделенные продукты анализировали методом масс-спектрометрии.

Масс-спектры были получены на гибридном масс-спектрометре LTQ FT (Thermo Electron Corp., Бремен, Германия), который состоит из линейной квадрупольной ионной ловушки и масс-спектрометра ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (ИЦР ПФ). В качестве источника ионов использовали универсальный источник ионизации Finnigan Ion Max Source в режиме электроспрея (ESI). Электрораспыление образца производилось при напряжении на игле-эмиттере 3 кВ и скорости подачи образца в иглу-эмиттер 1 мкл/мин. Образец растворяли в смеси ацетонитрил/вода (50/50) с добавлением 0.1% муравьиной кислоты. Для достоверной идентификации вещества А2Е в линейной квадрупольной ловушке были проведены МС/МС эксперименты, в которых молекулярные ионы с определенным отношением массы к заряду, m/z , изолировались от других продуктов ионизации, и подвергались индуцированной столкновениями диссоциации (CID- collision induced dissociation) с последующим масс-спектрометрическим анализом продуктов фрагментации. Обработка и анализ масс-спектров производился с помощью программы «Qual Browser» (Thermo Electron Corp., Бремен, Германия).

Эксперименты с использованием препаративной хроматографии и масс-спектрометрии были выполнены в Центре коллективного пользования ИБХФ РАН «Новые материалы и технологии».

2.4. ИМПУЛЬСНЫЙ ФОТОЛИЗ

Кинетику образования и гибели триплетного состояния исследуемых веществ измеряли методом лазерного фотолиза на установке на лазерного фотолиза с временным разрешением 7 нс или лампового импульсного фотолиза с разрешением 15 мкс. В лазерном фотолизе возбуждение проводили с использованием третьей гармоники Nd-YAG лазера ($\lambda_{\text{возб}} = 353 \text{ нм}$). Промежуточное поглощение регистрировали с помощью системы, состоящей из

импульсной Хе лампы, расположенной под прямым углом к возбуждающему лазерному свету, в интервале 300–800 нм. Использовали кювету с длиной оптического пути 1 см, сигнал записывался с помощью осциллографа Tektronix TDS 5052. Для удаления кислорода продували кювету с исследуемым раствором аргоном особой чистоты в течение 30 мин. Эксперименты по лазерному фотолизу проводили в смеси этанол–вода 1 : 4 по объему.

В экспериментах по обычному импульсному фотолизу образцы облучали в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 20 см с помощью Хе лампы с энергией вспышки 150 Дж. Изменения в поглощении регистрировали с помощью системы, состоящей из Хе лампы накаливания (75 Вт), монохроматора ЗМП-3, фотоумножителя, осциллографа на базе цифровой платы PCI Bordo 211 и ПК. Для выделения спектральной области длинноволновой полосы поглощения ФДГХ использовали светофильтр УФС-5 ($320 < \lambda_{\text{возб}} < 390$ нм). Промежуточное поглощение регистрировали в интервале длин волн от 400 до 700 нм. Для определения природы возбужденного состояния, ответственного за протекание реакции, эксперименты проводили в присутствии и отсутствие кислорода воздуха. Для удаления кислорода растворы вакуумировали по методу "замораживание–откачка–размораживание". Все эксперименты проводили при 22°C.

Для исследования триплетных состояний исследуемых соединений проводили импульсное возбуждение растворов этих соединений в отсутствие кислорода и тушение триплетных состояний исследовали в присутствии различных концентраций O_2 и ТМР. Методом импульсного фотолиза были проведены опыты по переносу триплетной энергии с сенсibilизатора SBP на ФДГХ 1 и с триплета ФДГХ 1 на цианиновый краситель №20.

Обработку экспериментальных данных, полученных методом импульсного фотолиза, проводили методом глобального кинетического анализа с аппроксимацией экспериментальных кривых мультиэкспоненциальным уравнением (2) или с использованием уравнения для одновременной гибели промежуточной частицы по реакциям второго и первого порядка согласно уравнению (3).

$$\Delta A^\lambda = \sum \Delta A_i^\lambda \exp(-k_i t), \quad (2)$$

где ΔA^λ – текущее суммарное дифференциальное поглощение на длине волны λ , ΔA_i^λ – начальное поглощение i -той частицы на длине волны λ , k_i – константа скорости гибели i -той частицы.

$$\Delta A^\lambda = \Delta A_0^\lambda k_{\text{TMP}} / (k_{\text{TMP}} \exp(k_{\text{TMP}} t) - 2 \Delta A_0 k_{\text{T-T}} (1 - \exp(k_{\text{TMP}} t)) / \varepsilon^\lambda l), \quad (3)$$

где ΔA_0^λ и ΔA^λ – начальное и текущее дифференциальное поглощение интермедиата на длине волны λ , ε^λ – коэффициент экстинкции на длине волны λ , l – длина оптического пути, k_{TMP} – константа скорости тушения триплетного состояния молекулой TMP и $k_{\text{T-T}}$ – константа скорости триплет-триплетной аннигиляции.

2.5. ИЗМЕРЕНИЕ ТЕМНОВОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ И ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПРИ ОБЛУЧЕНИИ*

Исследования на темновую цитотоксичность были проведены на клетках карциномы толстой кишки человека HCT116 в 96-луночных планшетах обработанных различными концентрациями исследуемых веществ. Выживаемость клеток фиксировали после 72-часовой инкубации. Выживаемость клеток исследована в МТТ-тесте. За 100% принята выживаемость клеток, инкубированных без препарата. Результат получен посредством вычисления средней величины 3-х повторностей, стандартные отклонения не более 10%.

Исследования на фотоцитотоксичность были проведены на клетках карциномы молочной железы человека MCF-7 (3x104) и карциномы толстой кишки человека HCT116 в 96-луночных планшетах обработанных различными концентрациями исследуемых веществ в течение 24 часовой инкубации.

*Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Российском онкологическом научном центре имени Н.Н. Блохина» под руководством проф., д.б.н. Штиля А.А.

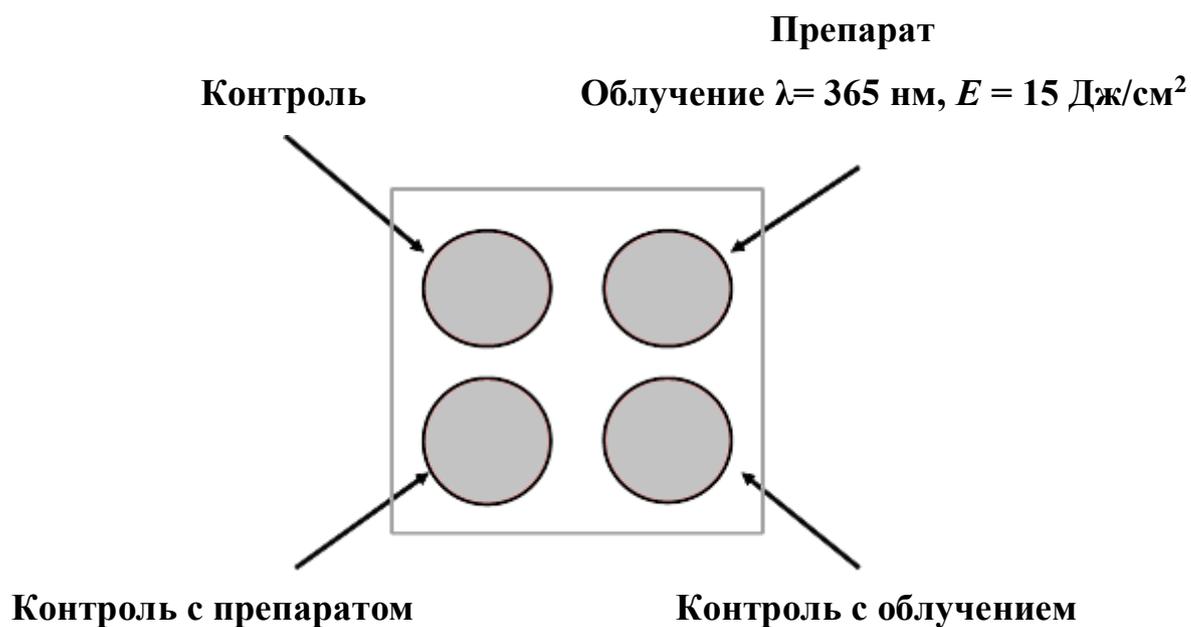


Рисунок 2.4 – Схема опыта на фототоксичность исследуемых веществ

Выживаемость клеток исследована в МТТ-тесте. За 100% принята выживаемость клеток, инкубированных без препарата. На Рисунке 2.4 представлена схема опыта.

Сравнивали токсичность в четырех пробах: двух без облучения: (1) без препарата; (2) с препаратом (исследуемое соединение); и двух с облучением: (3) без препарата и (4) с препаратом (Рисунок 2.4). Выживаемость регистрировали через 2 и 24 часа после облучения.

ГЛАВА 3. ФОТОХИМИЧЕСКИЕ И ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФУРО- И ТИЕНО-ПРОИЗВОДНЫХ ГИДРИРОВАННЫХ ХИНОЛИНОВ

Важным свойством псораленов, используемых в фотодерматологии, является образование триплетов, активных в реакциях с ДНК и другими биомакромолекулами, в результате поглощения света в УФ-А диапазоне. Поэтому исследование фотохимических и фотофизических свойств синтезированных ФДГХ, ФТГХ и ТДГХ является важной частью работы по определению возможности их использования в ПУВА-терапии. В главе 3 представлены спектрально-люминесцентные характеристики исследуемых соединений **1–6**, их фотохимические превращения под действием света и особенности образования триплетных состояний.

3.1. СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЙ **1–6** [121; 122; 123]

Для характеристики спектральных и люминесцентных свойств исследуемых соединений были сняты их спектры поглощения и флуоресценции в растворителях, отличающихся полярностью и способностью образовывать водородные связи: гексан, ацетонитрил, этанол, метанол и вода. Длинноволновые и коротковолновые максимумы поглощения ФДГХ **1** и **2**, ТДГХ **4** и ФТГХ **5** и **6** близки к соответствующим максимумам исходных гидрированных хинолинов, в том числе увеличение коэффициента экстинкции на порядок для коротковолновой полосы поглощения по сравнению с длинноволновой полосой (Рисунок 3.1) [124]. Для соединения **3** с нитрогруппой в качестве заместителя характерно наличие интенсивной полосы поглощения в видимой части спектра с максимумом поглощения при 469 нм (Рисунок 3.1(б) спектр 3). Все остальные соединения поглощают только в УФ-области. Соединения **1**, **2** и **4** имеют близкие полосы поглощения в УФ-области спектра с максимумом длинноволновой полосы в области 340–370 нм (Рисунок 3.1(а) спектры 1, 2 и 4). Спектры поглощения соединений **5** и **6** на основе тетрагидрохинолина сдвинуты в коротковолновую область и имеют длинноволновый максимум поглощения около 300 нм (Рисунок

3.1(б) спектры 5 и 6). В случае соединения **6** длинноволновая полоса поглощения имеет вид плеча полосы поглощения в области 250–300 нм.

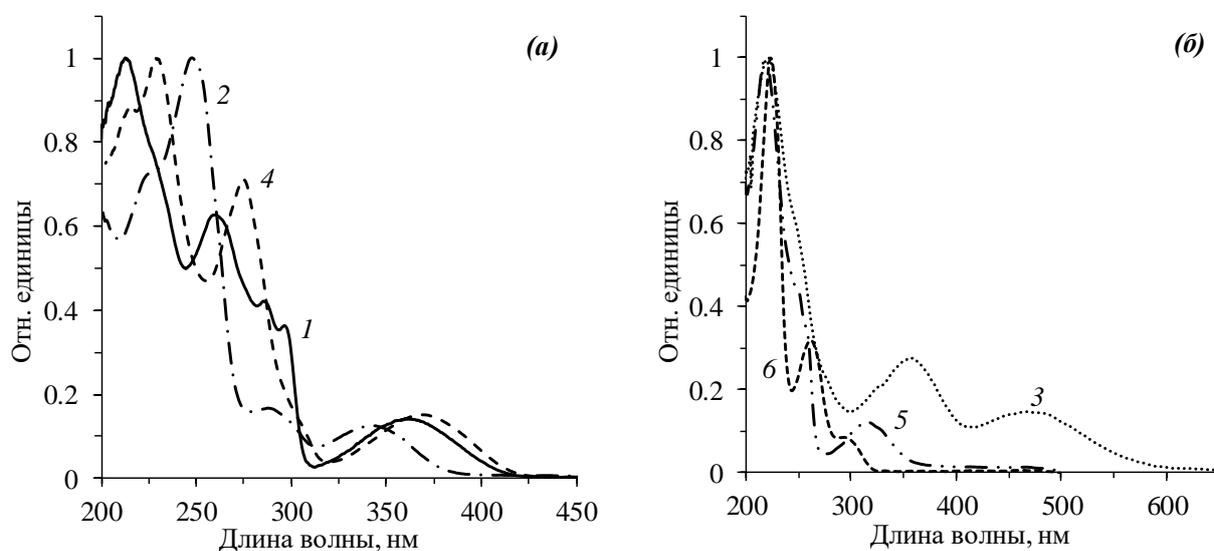


Рисунок 3.1 – Нормированные по коротковолновой полосе спектры поглощения соединений (номера спектров соответствуют номерам соединений) в метаноле (а): 1 (сплошная линия), 2 (пунктир-точка), 4 (пунктир); в этаноле (б): 3 (точки), 5 (пунктир-две точки), 6 (квадратные точки)

Интересно отметить, что для соединений **2** и **6** с фуорогруппой, аннелированной в положении 7,8 соответствующих гидрированных хинолинов, длинноволновая полоса сдвинута гипсохромно по сравнению с соединениями **1** и **5** с фуорогруппой в положении 5,6 гидрированных хинолинов. Коротковолновый сдвиг этой полосы, по-видимому, обусловлен водородной связью между кислородом фуранового цикла и водородом группы NH. Согласно расчетам, это расстояние составляет 2.85 Å (Рисунок 3.2). Максимумы поглощения в области 250–300 нм являются характерными для соединений с аннелированными фуорогруппами.

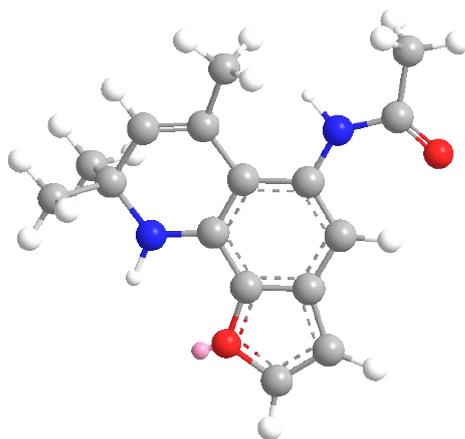


Рисунок 3.2 – 3D-Структура ФДГХ 2

Замена атома кислорода в фурановом цикле на серу приводит к батохромному смещению длинноволновой полосы в соединении **4** (Рисунок 3.1(a), Таблица 1).

Исследование зависимости спектра поглощения от природы растворителя показало, что спектры поглощения во всех растворителях близки друг к другу (Таблица 1). Для соединения **1** можно выделить четыре характерные области: (1) длинноволновая полоса с максимумом поглощения при $\lambda_{\max} = 365\text{--}343$ нм, максимум этой полосы смещается гипсохромно при переходе от гексана к протонным растворителям, при этом наблюдается уширение этой полосы; для полярного растворителя ацетонитрила наблюдается слабый батохромный сдвиг; (2) в области поглощения от 300 до 275 нм наблюдаются полоса поглощения с колебательной структурой, положение которой практически не зависит от природы растворителя, однако колебательная структура в протонных растворителях сглаживается, коэффициент экстинкции для этой полосы примерно в пять раз выше, чем для длинноволновой полосы поглощения; (3) полоса поглощения с максимумом при $\lambda_{\max} = 265\text{--}255$ нм также смещается гипсохромно при переходе от гексана к протонным растворителям; (4) коротковолновая полоса в области $\lambda_{\max} = 215\text{--}210$ нм слабо зависит от растворителя (Рисунок 3.3, Таблица 1).

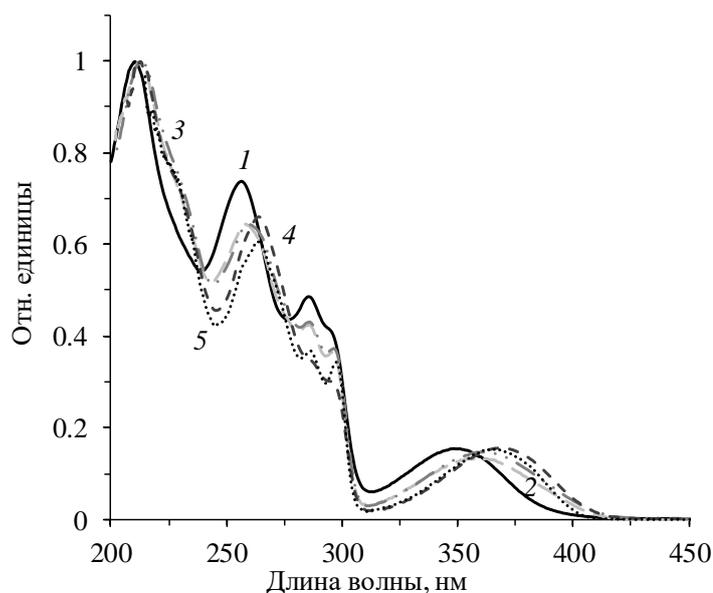


Рисунок 3.3 – Нормированные по коротковолновой полосе спектры поглощения соединения **1** в: воде – *1* (сплошная линия), метаноле – *2* (длинный штрих), этаноле – *3* (пунктир-две точки), ацетонитриле – *4* (пунктир), гексане – *5* (точки)

В отличие от изученных ранее производных гидрированных хинолинов [125], спектры поглощения соединения **1** в метаноле и этаноле практически совпадают. По всей видимости, данный эффект обусловлен увеличением системы сопряжения исследуемых соединений в результате введения в его структуру фуранового кольца. В соединении **1** π -электроны бензольного кольца сопряжены с кратными связями обоих гетероциклов, при этом неподеленные пары электронов на атомах кислорода и азота также участвуют в сопряжении всей системы молекулы. В этой связи, каркас молекулы соединения **1** является плоским и состоит из бензольного кольца и двух гетероциклов. Расчет по методу DFT с использованием функционала PBE и полноэлектронного базиса 3z (квантово-химическая программа “PRIRODA 06” [126]) подтверждает это. Отклонение величин диэдральных углов между фурановым и бензольным кольцами от плоскости составляет менее 0.5° , дигидрохинолиновый фрагмент является плоским. Вероятно, возможность образования водородной связи между гидроксильной группой спирта и расширенной по сравнению с производными гидрированными хинолинами сопряженной π -системой соединения **1**, а также с атомом кислорода фуранового кольца сглаживает стерические различия,

связанные с более объемной этокси группой в 6-этокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолине (этоксихин), который структурно наиболее близок к **1**. Это приводит к различиям при комплексообразовании спиртов с **1** и этоксихином.

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

Вещество	Растворитель	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	ε , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{фл}}$, нм	ϕ^{fl}	Стоксов сдвиг, cm^{-1} (нм)
1	MeOH	360	3 000	438	0.21	5 060 (78)
		258	14 210			
		212	20 550			
	C ₆ H ₁₄	366	3 260	419	0.15	3 550 (51)
		263	12 940			
		214	18 350			
	H ₂ O	351	2 950	450	0.44	6 510 (99)
		256	14 000			
		210	20 300			
	EtOH	362	3 160	438	0.27	5 020 (76)
		260	14 140			
		213	22 400			
	MeCN	368	3 690	438	0.19	3 940 (70)
		261	15 190			
		210	23 540			
2	MeOH	342	2 440	417	0.18	5 344 (76)
		288	3 260			
		247	22 370			
	EtOH	341	3 100			
		288	4 250			
		248	29 200			
	MeCN	343	3 550			
		289	4 250			
		249	27 700			

Вещество	Растворитель	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{фл}}$, нм	ϕ^{fl}	Стоксов сдвиг, cm^{-1} (нм)
3	EtOH	469	3 440	-	-	-
		356	6 366			
		222	24000			
4	MeOH	368	2 500	436	0.20	4 240 (68)
		275	11 700			
		229	16 500			
5	EtOH	315	2 430	380	0.18	5 430 (76)
		220	21 760			
6	EtOH	295	2 180	411	0.12	9 570 (116)
		262	8 125			
		225	26 240			

Таким образом, наибольшее гипсохромное смещение максимума спектра поглощения соединения **1** наблюдается в воде по сравнению с апротонными гексаном и ацетонитрилом и, по всей видимости, проявление указанного эффекта зависит в основном от способности растворителя образовывать комплексы с молекулой ФДГХ **1**. В случае ФДГХ **2**, изменения в спектрах поглощения в зависимости от растворителя выражены слабее (Таблица 1), что также может быть связано с водородной связью между кислородом фуранового цикла и водородом группы NH.

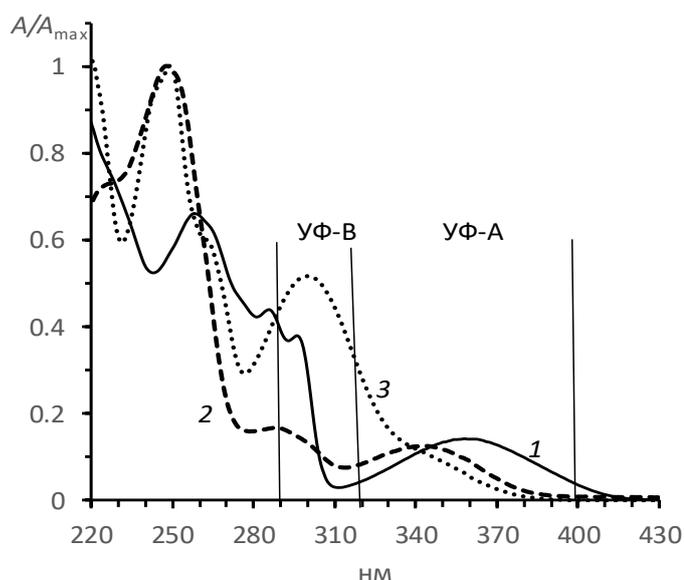


Рисунок 3.4 – Нормированные по коротковолновой полосе спектры поглощения ФДГХ **1** (1), **2** (2) и 8-МОР (3)

Сопоставление спектров поглощения ФДГХ **1** и **2** со спектрами поглощения псораленов (Рисунок 3.4) показывает, что для ФДГХ поглощение в УФ-В области ниже, чем для псораленов. Таким образом, ФДГХ имеют преимущество перед псораленами, поскольку высокий уровень поглощения в УФ-В области может приводить к нежелательным последствиям после принятия лечебной процедуры и выхода из помещения. В этой связи, пациенты вынуждены в течение нескольких часов после терапии находится в закрытом помещении. В этом смысле соединения ФТГХ **5** и **6**, длинноволновая полоса которых находится в УФ-В диапазоне (Рисунок 3.1(б)), едва ли могут рассматриваться как препараты для ПУВА терапии, хотя в литературе есть предложения по использованию облучения в УФ-В диапазоне при лечении псораленами [29].

Изучение люминесцентных свойств исследуемых веществ показало, что они флуоресцируют с относительно высокими квантовыми выходами (Таблица 1). На Рисунке 3.4 представлены нормированные спектры поглощения и флуоресценции соединения **1** в различных растворителях. Наблюдается характерное для гидрированных хинолинов батохромный сдвиг полосы эмиссии и гипсохромный сдвиг полосы возбуждения флуоресценции при переходе от неполярного гексана к полярным растворителям. При этом исчезает колебательная структура спектра

эмиссии в гексане. Величина Стоксова сдвига увеличивается при переходе от гексана к воде от 3550 до 6510 см^{-1} . Кроме увеличения полярности среды, в этом явлении также может играть роль возможность образования водородных связей между соединением **1** и протонными растворителями.

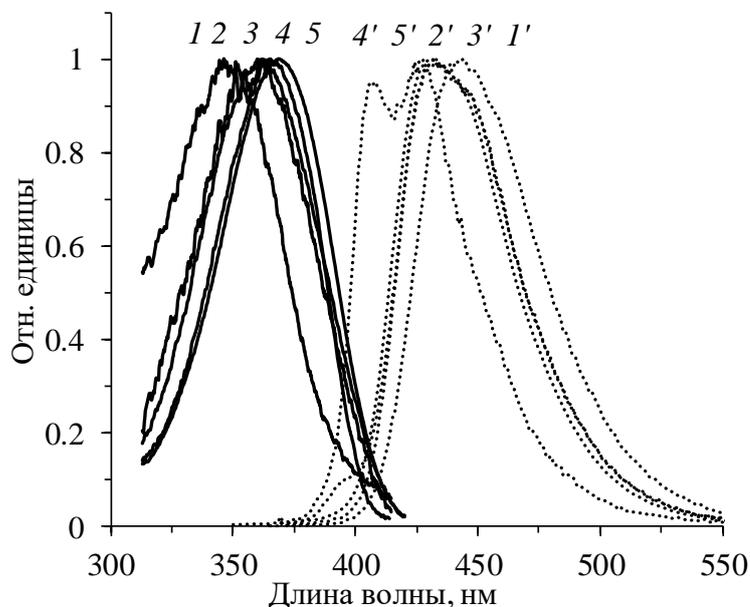


Рисунок 3.4 – Нормированные спектры флуоресценции (точки) и спектры возбуждения флуоресценции (сплошные линии) соединения **1** в различных растворителях: *1, 1'* – вода; *2, 2'* – метанол; *3, 3'* – этанол; *4, 4'* – гексан; *5, 5'* – ацетонитрил

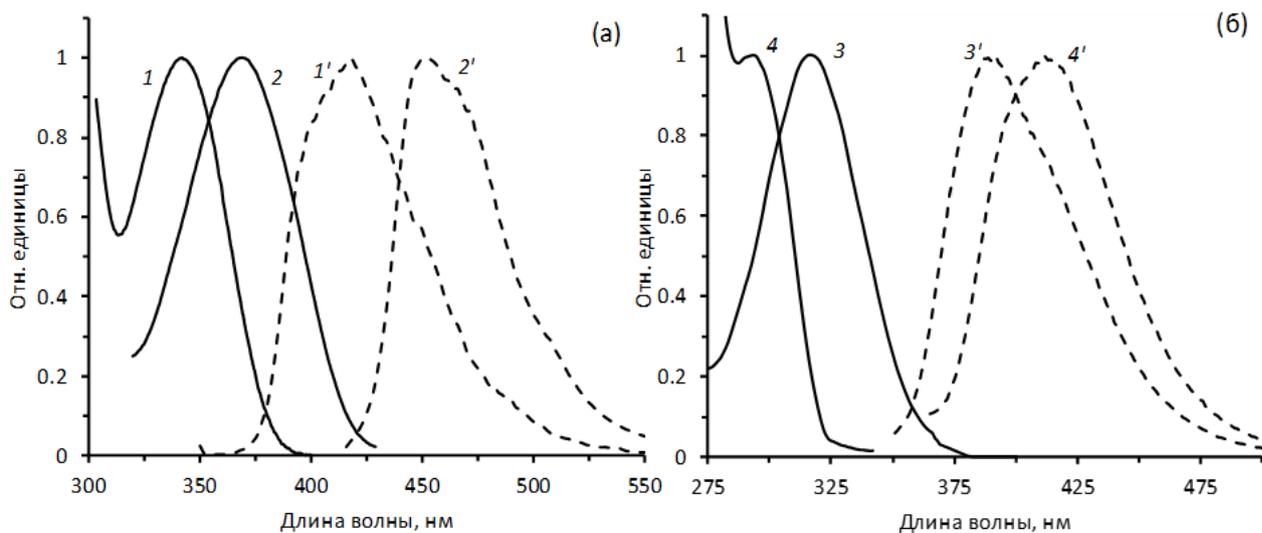


Рисунок 3.5 – Нормированные спектры флуоресценции (пунктирные линии) и спектры поглощения (сплошные линии) (а) соединений **2** (*1, 1'*) и **4** (*2, 2'*) в MeOH и (б) соединений **5** (*3, 3'*) и **6** (*4, 4'*) в EtOH

Соединение **3**, содержащее нитрогруппу в качестве заместителя, аналогично изученным ранее нитрозамещенным гидрированным хинолинами [127] не флуоресцирует. Для соединений **2**, **4–6** нормированные спектры поглощения и флуоресценции представлены на Рисунке 3.5.

Квантовые выходы флуоресценции для соединений **1**, **2**, **4** и **5** (Таблица 1) близки между собой и сопоставимы по значениям для производных гидрированных хинолинов [128]. Однако, в отличие от них, в случае исследуемых соединений максимальный квантовый выход наблюдается в воде, а наименьший в гексане, что в свою очередь указывает на различие в путях деградации энергии возбужденного синглетного состояния. Причиной указанного эффекта, вероятно, является иной процесс комплексообразования исследуемых соединений с протонными растворителями. Для соединения **6** квантовый выход флуоресценции несколько ниже, при этом наблюдается относительно большой Стоксов сдвиг, что, видимо, обусловлено особенностями строения этого соединения.

3.2. СТАЦИОНАРНЫЙ ФОТОЛИЗ СОЕДИНЕНИЙ 1–6 [122; 123]

Важной частью анализа фотохимических и фотофизических свойств фуругидрохинолинов является исследование их превращений в процессе стационарного фотолиза. Сопоставление изменений спектров поглощения соединений **1–6**, полученных в результате облучения растворов УФ-светом, показало, что фотохимические превращения зависят от структуры соединения, растворителя и наличия кислорода в реакционной среде. На Рисунках 3.6–3.8 представлена эволюция спектров поглощения соединения **1** в растворе метанола, воды и гексана в зависимости от времени облучения и отсутствия (а) или наличия (б) кислорода воздуха в анализируемой системе.

Для всех соединений независимо от растворителя изменения в спектрах поглощения происходят с изобестическими точками. Наличие изобестических точек означает, что в результате фотолиза образуется либо один продукт, либо несколько продуктов образуется в параллельных реакциях, и соотношение между этими продуктами не меняется в процессе фотолиза. При этом в каждом

конкретном растворителе фотолиз протекает с разными скоростями и образуются различные продукты в зависимости от наличия O_2 в системе. Особенно ярко это проявляется в метаноле (Рисунок 3.6).

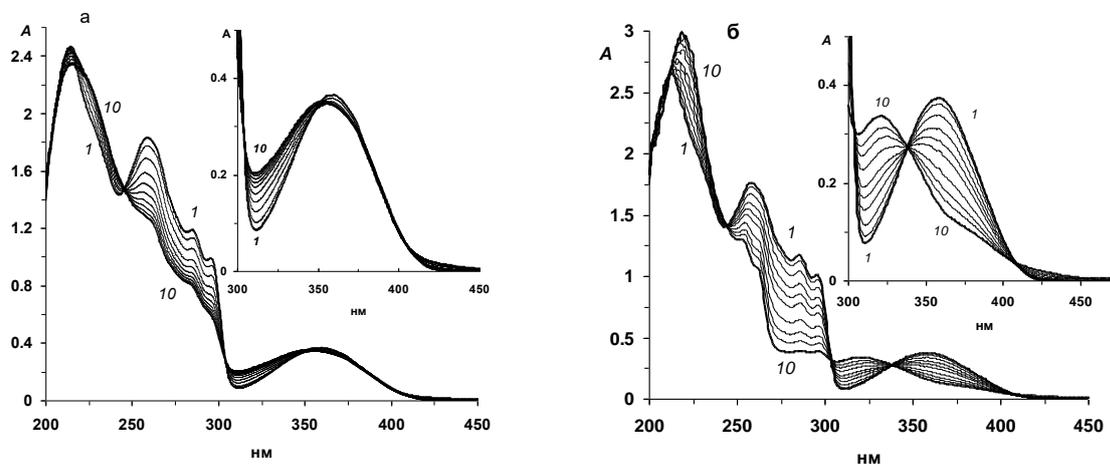


Рисунок 3.6 – Эволюция спектров поглощения соединения **1** в процессе стационарного фотолиза в метаноле (а) в атмосфере аргона, время, мин: (1) 0, (2) 5, (3) 15, (4) 30, (5) 45, (6) 60, (7) 75, (8) 90, (9) 105, (10) 120; (б) на воздухе, время, мин: (1) 0, (2) 5, (3) 15, (4) 30, (5) 45, (6) 60, (7) 90, (8) 120, (9) 150, (10) 210

В отсутствие O_2 наблюдается небольшой спад поглощения основного пика при 355 нм и увеличение поглощения в области 300–340 нм; в области 240–300 нм поглощение снижается; а в области от 200 до 240 нм происходит небольшой рост оптической плотности и батохромное смещение максимума поглощения соединения **1** на 5–7 нм. В присутствии O_2 расхождение ФДГХ **1** сопровождается существенным снижением поглощения в области максимума при 355 нм с одновременным ростом оптической плотности в области 300–340 нм с образованием продукта с λ_{\max} при 325 нм (Рисунок 3.6 (б) вставка). Необходимо отметить также, что реакция 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 O_2 .

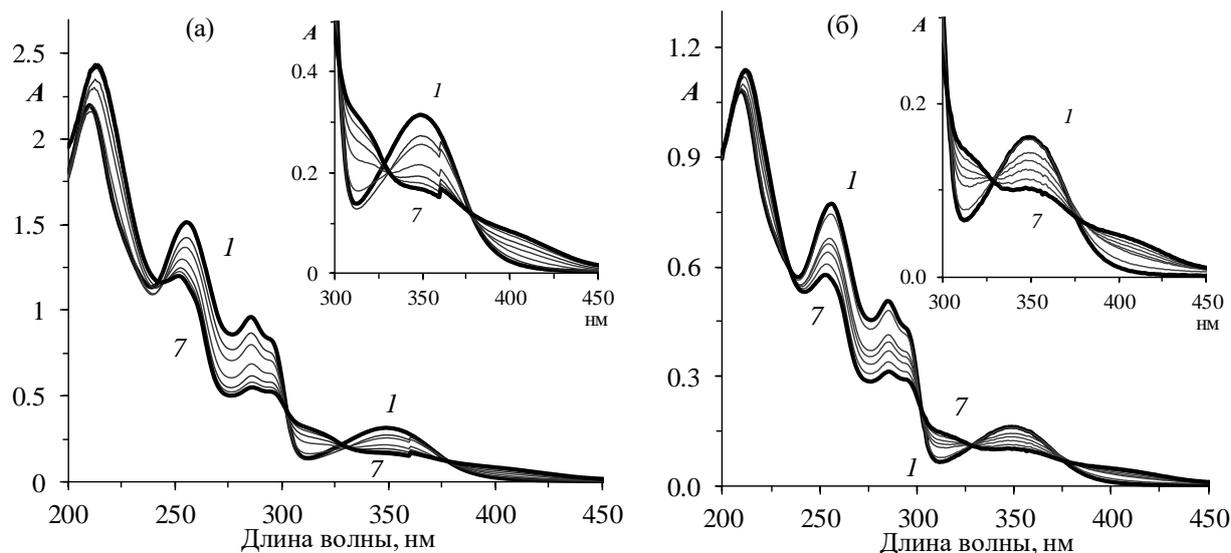


Рисунок 3.7 – Эволюция спектров соединения **1** в процессе стационарного фотолиза в воде (а) в атмосфере аргона, время, мин: (1) 0, (2) 5, (3) 15, (4) 45, (5) 75, (6) 105, (7) 135; (б) на воздухе, время, мин: (1) 0, (2) 5, (3) 15, (4) 30, (5) 45, (6) 60, (7) 90

Спектры, полученные в водном растворе соединения **1** в аргоне и на воздухе, мало отличаются друг от друга (Рисунок 3.7) и имеют такой же характер изменений, как в случае раствора метилового спирта на воздухе. Однако, в области 320 нм нет четкого максимума, как в случае, представленном на Рисунке 3.6 ((б) вставка).

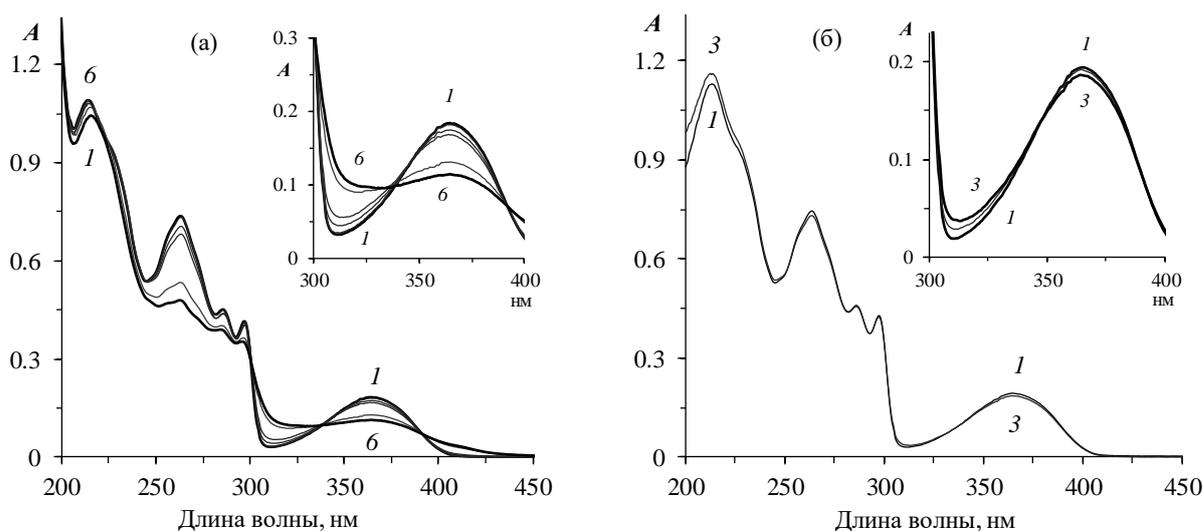


Рисунок 3.8 – Эволюция спектров соединения **1** в процессе стационарного фотолиза в гексане (а) в атмосфере аргона, время, мин: (1) 0, (2) 7, (3) 30, (4) 60, (5) 300, (6) 420; (б) на воздухе, время, мин: (1) 0, (2) 30, (3) 60

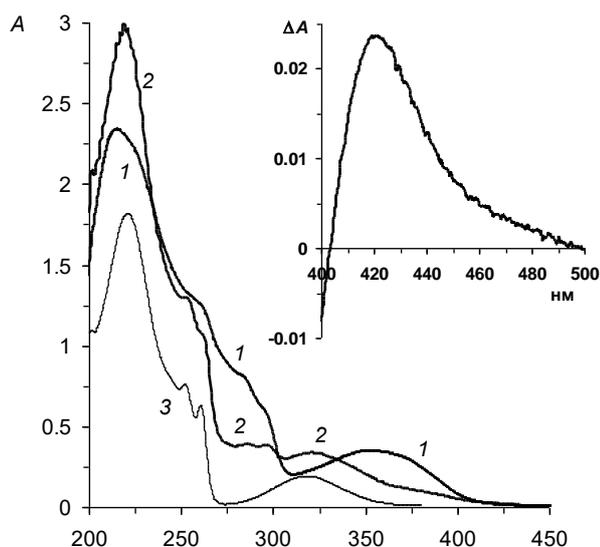


Рисунок 3.9 – Спектры поглощения конечных продуктов фотолиза **1** в метаноле: (1) в отсутствие кислорода и (2) на воздухе, (3) спектр поглощения ФТГХ **5**; вставка: дифференциальный спектр продукта фотолиза **1** в видимой области

Сопоставление спектров поглощения продуктов фотолиза **1** в метаноле в атмосфере Ar и на воздухе (Рисунок 3.9) показывает, что в отсутствие O₂ образуется продукт с λ_{max} , близким к λ_{max} исходного соединения, в то время как спектр фотолизата на воздухе представляет собой смесь двух спектров: спектра, аналогичного спектру в отсутствие O₂, и спектра, близкого к спектру поглощения ФТГХ **5**: наблюдается совпадение длинноволновой (λ_{max} 320 нм) и коротковолновой (λ_{max} 220 нм) полос поглощения этих соединений; в промежуточной области (240–275 нм) в спектре **10** (Рисунок 3.6 б) появляется колебательная структура, которая четко выражена в спектре ФТГХ **5**. Это свидетельствует о том, что продукт фотолиза соединения **1** имеет общую фуротетрагидрохинолиновую структуру с соединением **5**.

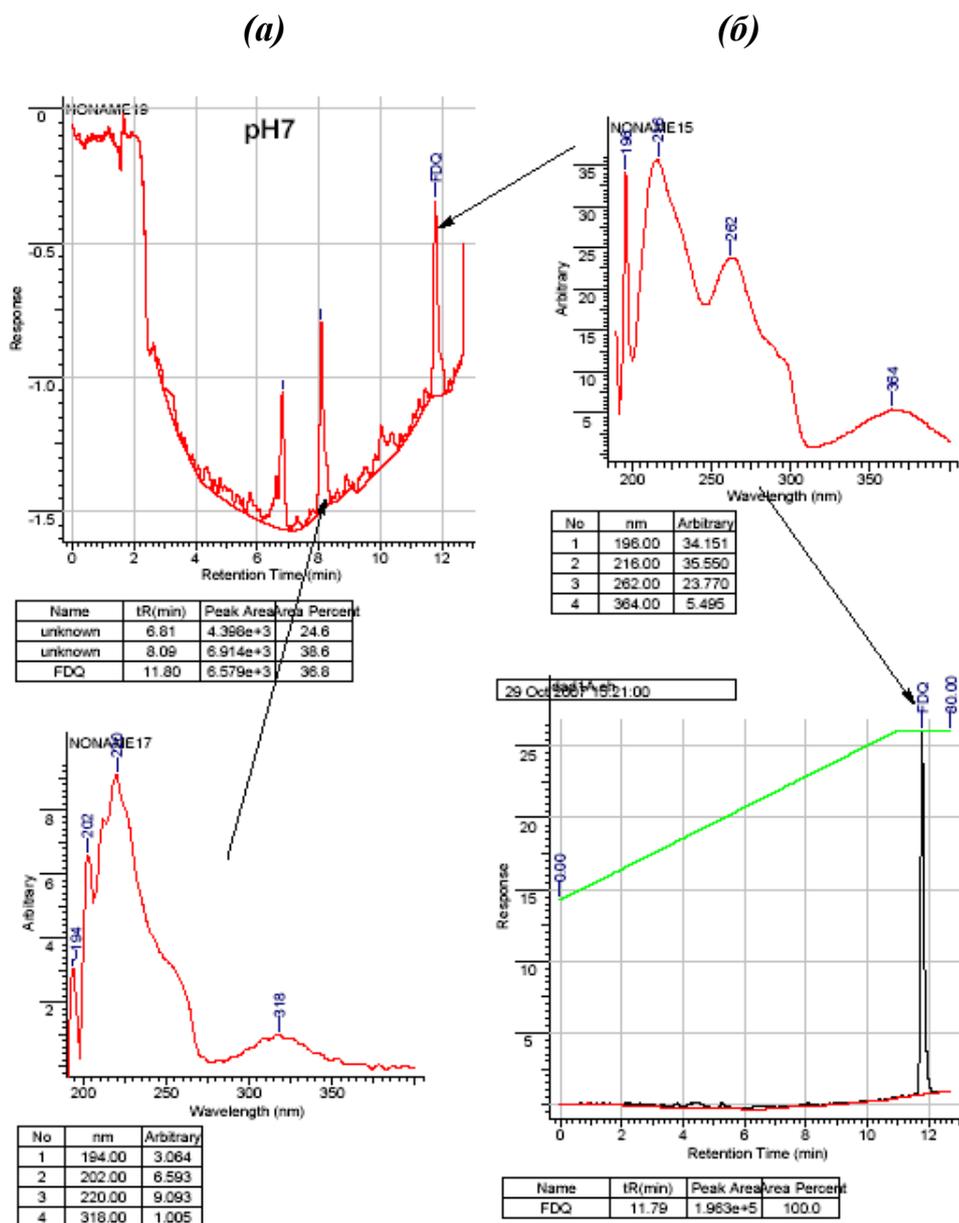


Рисунок 3.10 – Результаты исследования водно-спиртового раствора фотолизата соединения ФДГХ **1** методом ВЭЖХ: (a) – хроматограмма смеси продуктов фотолиза **1** и спектр поглощения продукта с $R_t = 8.09$; (б) – хроматограмма и спектр поглощения чистого **1**

Анализ продуктов фотолиза ФДГХ **1** в водно-спиртовом растворе методом ВЭЖХ показал, что кроме основного пика с временем удерживания $R_t = 11.79$ мин, на хроматограмме присутствуют два пика с временами удерживания 6.81 и 8.09 минут (Рисунок 3.10). Форма спектра поглощения, приведенная на хроматограмме для продукта с $R_t = 8.09$ (Рисунок 3.10 (a)), близка к спектру поглощения соединения **5** (Рисунок 3.9 спектр 3). Форма спектра поглощения продукта с $R_t = 6.81$ также схожа с формой спектра поглощения соединения **5**.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что продукты фотолиза соединения **1** в протонном растворителе (вода, спирт) образуются в результате фотореакции по двойной связи в дигидрохинолиновой части молекулы соединения **1**, в ходе которого получился тетрагидрохинолиновый фрагмент (Схема 3.1, реакции (1), (2)). В этой связи, продукт с $R_t = 6.81$ предположительно является аддуктом, образованным в результате присоединения воды, а пик с $R_t = 8.09$ является продуктом присоединения спирта к соединению **1**.

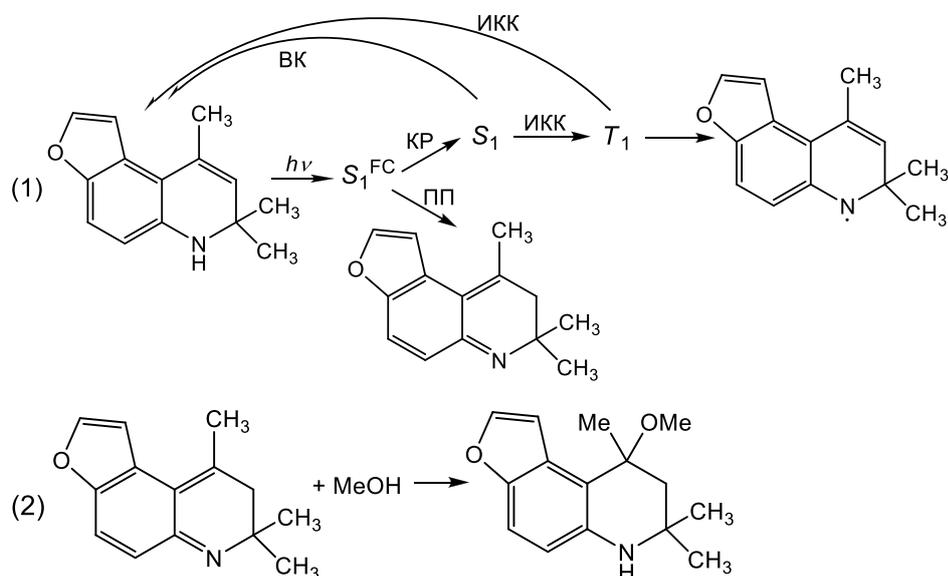
В отличие от протонных растворителей (вода, спирт), в гексане фотолиз происходит крайне медленно. На воздухе в течение часа спад оптической плотности в основном максимуме поглощения в районе 355 нм был незначительным (Рисунок 3.8 (б)) и поэтому фотолиз был остановлен. Раствор, насыщенный аргоном, облучали в течении 7 часов, и изменения в спектрах поглощения были заметны только после первого часа облучения. При этом коротковолновый максимум поглощения смещается гипсохромно на 2–3 нм за время фотолиза.

Методом масс-спектрометрии были проанализированы фотолизаты **1**, полученные в ходе проведения стационарного фотолиза в разных растворителях, и было установлено, что основными пиками на масс-спектрах фотолизатов в воде и метаноле помимо масс исходных веществ являются пики с массами, соответствующими сумме масс исходного вещества и растворителя, а также пик равный сумме масс двух исходных веществ. Основные продукты фотолиза в присутствии воздуха имеют 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 ($MH^+ 425.2$). Молекулярная масса этого продукта соответствует димеру, образованному в результате рекомбинации двух аминильных радикалов. Только образование димера было зафиксировано также в растворе гексана. Во всех растворителях было зафиксировано образование следовых количеств соединения с

молекулярной массой 197 (MH^+ 198.1), соответствующей ароматическому фуорохинолину.

Форма конечных спектров поглощения, полученных при фотолизе **1** в метаноле в присутствии и отсутствие O_2 (Рисунок 3.2.1) и анализ продуктов фотолиза позволяют предположить, что в присутствии O_2 основным продуктом является аддукт метанола и ФДГХ **1** соответствующий 9-метокси-7,7,9-триметил-6,7,8,9-тетрагидрофуоро[3,2-*f*]хинолин, а в отсутствие O_2 – 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. Принципиальный механизм фотолиза представлен на схеме 3.1.

По аналогии с хорошо исследованным фотолизом дигидрохинолинов (ДГХ) в протонных растворителях [115; 129] мы полагаем, что в нерелаксированном возбужденном синглетном состоянии S_1^{FC} происходит двойной перенос протона (ПП) от группы N–H на метанол и от гидроксильной группы метанола в положение C(8) азотсодержащего гетероцикла (реакция (1)).



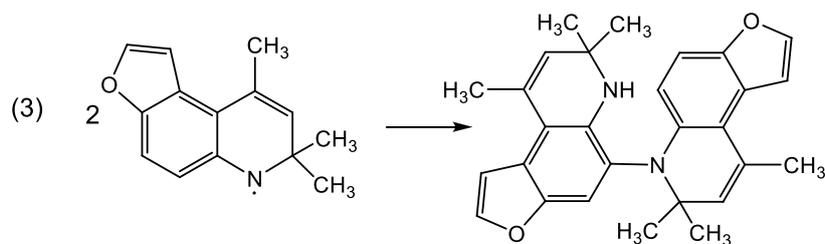


Схема 3.1 – Принципиальный механизм фотолиза ФДГХ 1

Образовавшийся таутомер ФДГХ 1 претерпевает серию последовательных превращений, конечным продуктом которых является метоксизамещенный ФТГХ (реакция (2)). Полученные экспериментальные результаты показывают, что квантовый выход этого процесса в ФДГХ существенно ниже, чем в ДГХ. Образующееся в результате интеркомбинационной конверсии (ИКК) триплетное состояние, выход которого существенно повышается в ФДГХ, претерпевает гомолитический разрыв связи N–H с образованием аминильного радикала (реакция (1)). Рекомбинация аминильных радикалов с образованием димера (реакция (3)) представлена на Схеме 3.1 так, как она происходит для 6-этокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина [110; 111]. Образование аминильного радикала подтверждается также тем, что в масс-спектрах фотолизата наблюдается в незначительных количествах молекулярный ион (MH^+ 198.1), соответствующий образованию негидрированного хинолинового производного. Образование хинолинов в результате элиминирования метильного радикала от аминильного радикала является основной реакцией при окислении ДГХ при температурах выше 100°C [130].

Предложенная схема позволяет объяснить наличие изобестических точек при фотолизе ФДГХ в различных условиях. Действительно, формирование двух параллельных каналов в образовании продуктов фотолиза происходит еще на начальной стадии релаксации возбужденного состояния S_1^{FC} : (1) двойной перенос протона и (2) колебательная релаксация в состояние S_1 с последующей ИКК в триплетное состояние T_1 , из которого образуются аминильные радикалы.

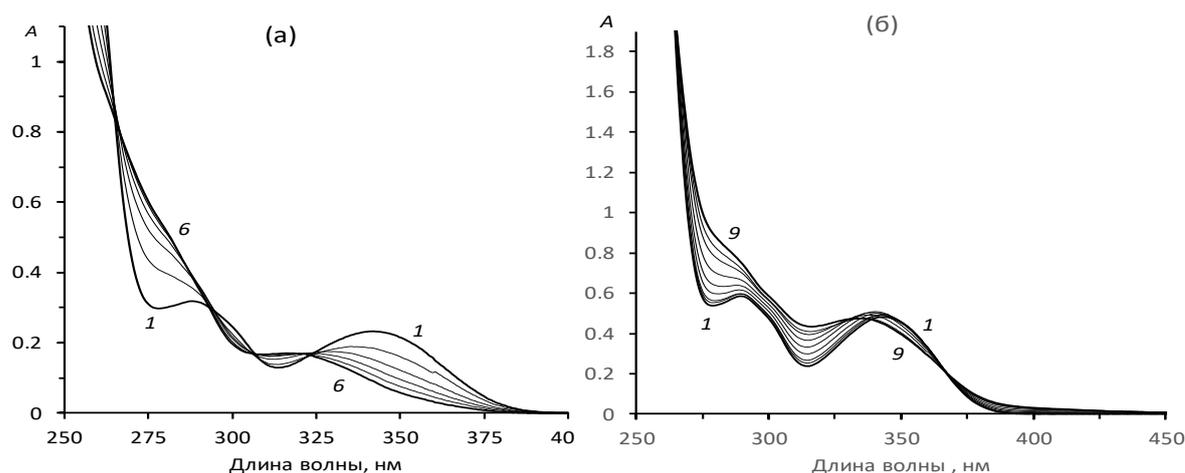


Рисунок 3.11 – Эволюция спектров поглощения при фотолизе **2** в MeOH в атмосфере воздуха (а), время (мин): 0 (1), 2 (2), 4 (3) 6 (4), 8 (5), 10 (6), и в MeCN в атмосфере аргона (б) время (мин): 0 (1), 1 (2), 4 (3), 10 (4), 20 (5), 35 (6), 55 (7), 80 (8), 110 (9)

Для соединения **2** характер изменений спектров при фотолизе представлен на Рисунке 3.11. В случае раствора **2** в метиловом спирте фотолиз в присутствии и отсутствие O_2 различаются не сильно, аналогично ФДГХ **1** в воде: наблюдается незначительное увеличение скорости фотолиза в Ar, без принципиальных изменений в получаемых спектрах поглощения. По сравнению с исходным спектром поглощения (Рисунок 3.11 (а), спектр 1) наблюдается: уменьшение основного максимума поглощения 342 нм; идет нарастание оптической плотности в области 310–325 нм с нечетким новым максимумом на 320 нм; далее в области 290–310 нм спад и последующий рост в области 265–290 нм. Фотолиз **2** в растворе ацетонитрила протекает существенно медленнее, основные видимые изменения наблюдали в растворе без O_2 : максимум поглощения 342 нм незначительно уменьшался и гипсохромно смещался на несколько нм, в области 265–340 нм наблюдался рост оптической плотности без образования новых максимумов (Рисунок 3.11 (б)). Изменения спектров ФДГХ **2** при фотолизе указывают на то, что фотопроцессы для этого соединения аналогичны таковым для ФДГХ **1** и могут быть представлены Схемой 3.2.

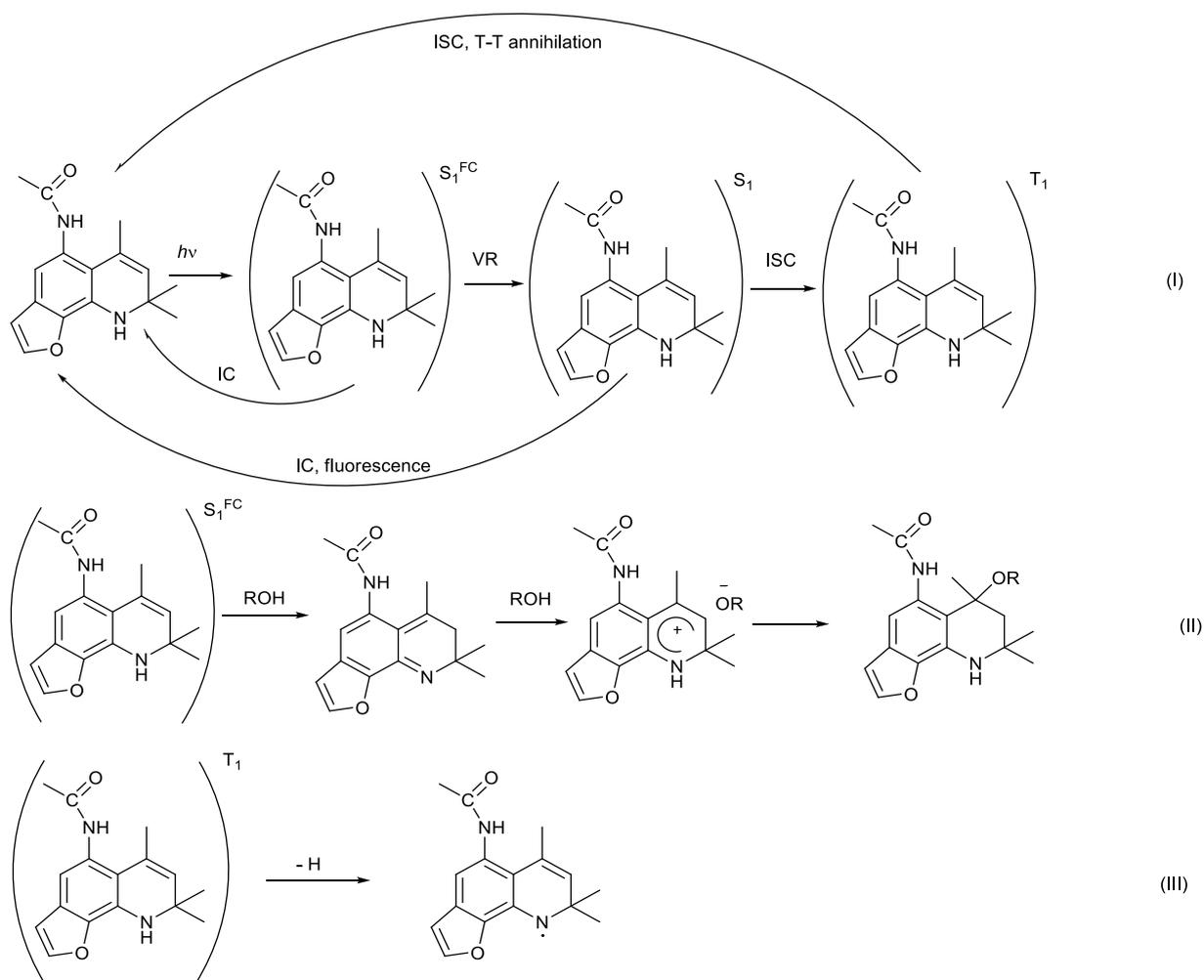


Схема 3.2 – Принципиальный механизм фотолиза ФДГХ 2

ФДГХ **3** с нитрогруппой фотостабильно, и спектр поглощения не претерпевает изменений в процессе стационарного фотолиза при облучении светом как видимого, так и УФ-диапазона независимо от растворителя. Фактор наличия или отсутствия кислорода воздуха также не имел наблюдаемого эффекта.

Соединение **4** по аналогии с соединением **1** и **2** также показало зависимость характера изменений спектров поглощения от растворителя. В протонных растворителях, таких как вода и спирты, наблюдалась более высокая скорость реакции по сравнению с растворами в гексане и ацетонитриле, а отсутствие O_2 в растворе только ускоряло этот процесс.

При стационарном фотолизе ФТГХ **5** и **6** зафиксированы небольшие изменения спектров поглощения, которые выражаются в сдвиге максимумов поглощения на 1–2 нм и небольшом падении оптической плотности (Рисунок

3.12). Видимого эффекта от наличия кислорода воздуха в растворе не наблюдалось.

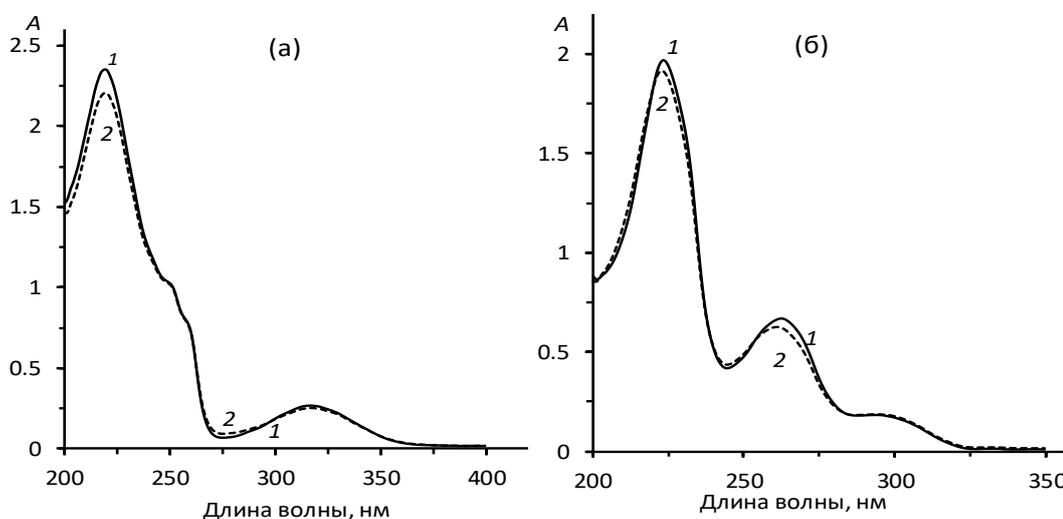


Рисунок 3.12 – Спектры поглощения **5** (а) и **6** (б) в EtOH при стационарном фотолизе в начальный момент времени (спектр 1) и через 60 мин (спектр 2) после облучения УФ-светом

Существенное отличие фотолиза ФТГХ **5** и **6** от фотолиза ФДГХ **1** и **2** объясняется тем, что для этих соединений аналогично тетрагидрохинолинам (ТГХ) образование продуктов присоединения протонных растворителей невозможно. Поэтому в результате фотолиза первоначально образуется соответствующий аминильный радикал из возбужденного триплетного состояния (Схема 3.3). Димер, образовавшийся при рекомбинации двух аминильных радикалов, предположительно является основным продуктом фотолиза. Как уже отмечалось для димеров ФДГХ, спектр димерных продуктов не должен сильно отличаться от спектра исходного соединения. Именно поэтому при фотолизе ФТГХ изменения спектра поглощения минимальны.

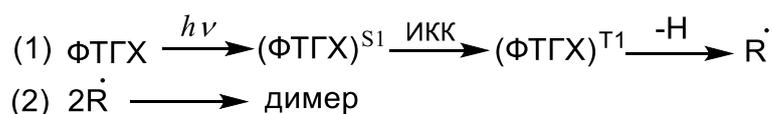


Схема 3.3 – Принципиальный механизм фотолиза ФТГХ

На основании совокупности экспериментальных результатов стационарного фотолиза соединений **1–6** в различных растворителях в отсутствие и в

присутствии O_2 можно сделать несколько выводов. Особенности химических превращений ФДГХ при фотолизе во многом определяются наличием дигидрохинолинового фрагмента в их структуре: (1) отсутствие видимых изменений в спектре поглощения соединения **3** с нитрогруппой при стационарном фотолизе характерного для нитрозамещенных производных гидрированных хинолинов [127]; (2) образование аддуктов между двойной связью дигидрохинолинового гетероцикла в ФДГХ и протонным растворителем и (3) образование димерных продуктов исходных веществ [115]. С другой стороны, 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 исходных соединений в реакции образования продуктов.

3.3. СПЕКТРАЛЬНО-КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТРИПЛЕТНЫХ СОСТОЯНИЙ ГИДРИРОВАННЫХ ФУРОХИНОЛИНОВ [123; 131]

При исследовании стационарного фотолиза гидрированных фуорохинолинов было обнаружено, что фотохимические превращения этих соединений сильно зависят от наличия кислорода: квантовый выход фотохимической реакции в отсутствие O_2 увеличивается за счет появления нового направления реакции – образования промежуточных аминильных радикалов. Было предположено, что аминильные радикалы образуются в результате гомолитического разрыва связи N–N азотсодержащего гетероцикла в триплетном состоянии. Известно, что квантовый выход триплетного состояния гидрированных хинолинов невысок и не превышает 0.01, а спектр триплет-триплетного поглощения был получен с использованием фотосенсибилизаторов и имеет максимум около 650 нм [116]. С целью установить влияние введения фуранового кольца в структуру гидрированных хинолинов на образование триплетов, было проведено

исследование свойств короткоживущих интермедиатов, образующихся при фотовозбуждении ФДГХ 1–3 и ФТГХ 5.

3.3.1. ФДГХ 1

Методом импульсного фотолиза вакуумированных растворов ФДГХ 1 с возбуждением длинноволновой полосы поглощения в MeOH, воде и гексане было зарегистрировано образование интермедиата с $\lambda_{\max} = 620\text{--}640$ нм и временем жизни ~ 200 мкс (Рисунок 3.13). Этот интермедиат в экспериментах по ламповому импульсному фотолизу не наблюдается на воздухе, что является важным доводом в пользу предположения о том, что это триплетное состояние 1. Максимальный выход этого интермедиата наблюдали в MeOH и минимальный в гексане. Следует отметить, что для псораленов выход триплетного состояния также выше в полярных растворителях [60–66].

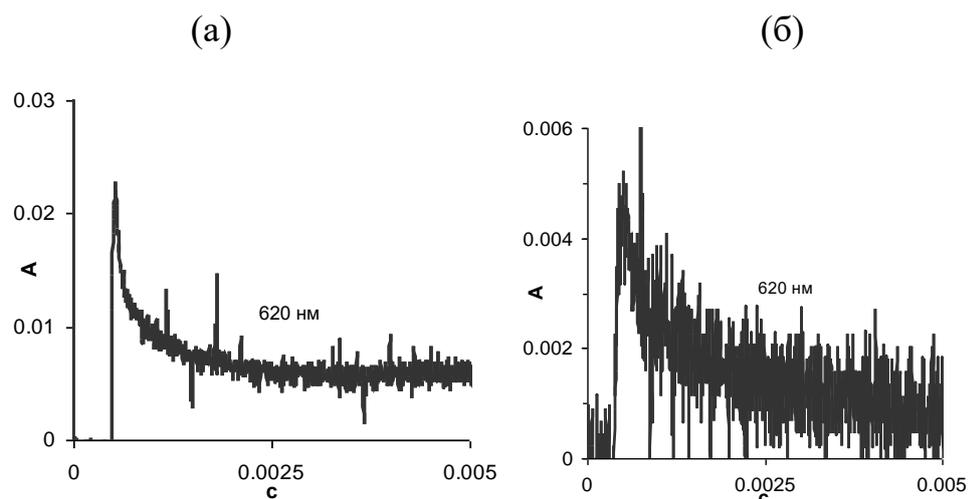


Рисунок 3.13 – Кинетика гибели промежуточных частиц, образующихся в вакуумированных растворах 1 в метаноле (А) и гексане (Б) при импульсном возбуждении $\lambda_{\text{возб}} 300\text{--}400$ нм, $\lambda_{\text{рег}} 620$ нм

Для доказательства триплетной природы интермедиата были проведены опыты по переносу триплетной энергии с донора на соединение 1 (схема 3.4) и с 1 на акцептор триплетной энергии (схема 3.5). В качестве донора триплетной энергии использовали тетранатриевую соль сульфобенз(а)пирена (SBP), триплетное состояние которой имеет время жизни около 100 мкс.

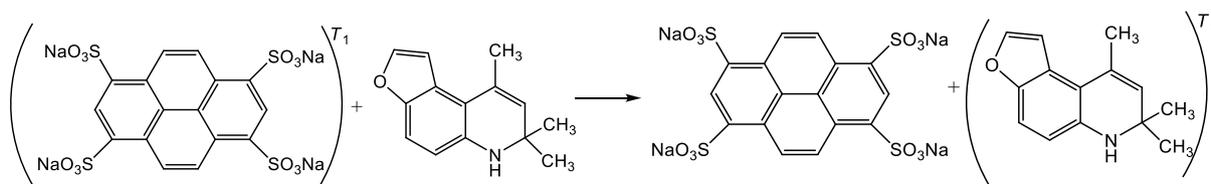


Схема. 3.4 – Перенос триплетной энергии с донора на ФДГХ 1

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 (Рисунки 2.2 и 3.1), то под действием светового импульса происходит возбуждение как **1**, так и SBP. В водном растворе в присутствии SBP триплет-триплетное поглощение в области 600–660 нм увеличилось почти в три раза (Рисунок 3.14, 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 [132].

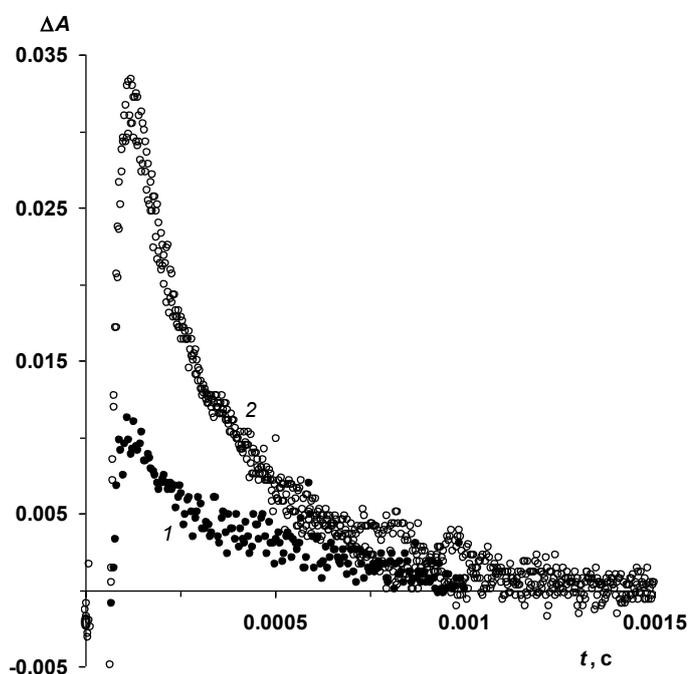


Рисунок 3.14 – Гибель промежуточного поглощения при возбуждении вакуумированного водного раствора соединения 1: (1) без добавок и (2) в присутствии SBP; ламповый импульсный фотолиз, $\lambda_{\text{возб}}$ 300–400 нм, $\lambda_{\text{рег}}$ 660 нм

В качестве акцептора триплетной энергии использовали цианиновый краситель 3,3'-диэтил-2,2'-тиакарбоцианин йодид (краситель №20, $\lambda_{\max} = 550$ нм, $\epsilon = 1.5 \times 10^5$ л моль⁻¹см⁻¹). На Рисунке 3.15 представлена кривая выцветания в максимуме поглощения красителя при импульсном фотовозбуждении вакуумированного раствора, содержащего соединение **1** и краситель в метаноле. Возбуждение проводили светом $\lambda_{\text{возб.}}$ 300–400 нм, т.е., в спектральной области, в которой краситель не поглощает. Отчетливо видно выцветание поглощения красителя за счет образования триплетного состояния с последующей регенерацией красителя.

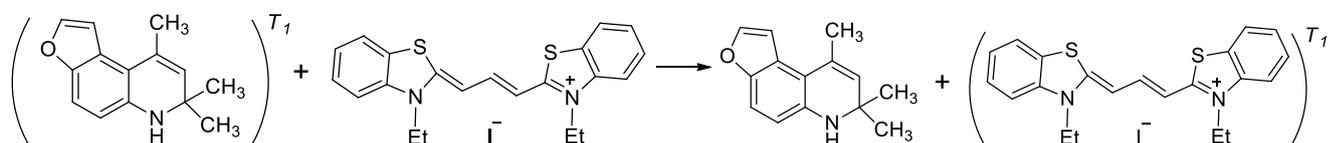


Схема 3.5 – Перенос триплетной энергии с ФДГХ **1** на акцептор

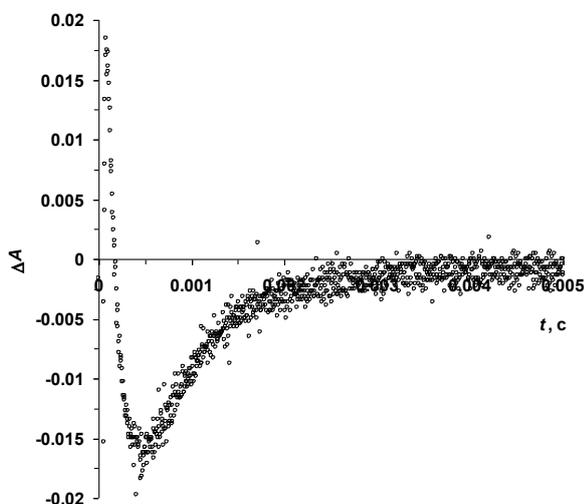


Рисунок 3.15 – Выцветание цианинового красителя (8.6×10^{-5} моль/л) на длине волны 550 нм в вакуумированном растворе метанола с ФДГХ **1** (10^{-3} моль/л) после импульсного возбуждения в области 300–400 нм

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 триплет–триплетному поглощению **1**. Уровни триплетной

энергии цианинового красителя и SBP составляют 14700 см^{-1} и 19000 см^{-1} соответственно. Следовательно, энергия триплетного состояния **1** находится в этом интервале значений, что сопоставимо с величиной энергии первого триплетного уровня дигидрохинолинов, для которых эта величина составляет $\sim 16000\text{ см}^{-1}$ [115].

Более детально спектрально-кинетические характеристики триплетного состояния ФДГХ были изучены методом лазерного фотолиза. Как следует из Рисунка 3.16 (1), после вспышки наблюдается выцветание в области 410–560 нм, которое обусловлено флуоресценцией из синглетного состояния S_1 ФДГХ **1**. При этом в области 350–400 нм поглощение увеличивается. Это является свидетельством того, что к этому времени произошел перенос протона (ПП) от растворителя к нерелаксированному возбужденному состоянию S_1^{FC} с образованием промежуточного таутомера ФДГХ **1** (схема 3.1, реакция (1)). Далее наблюдается незначительное увеличение поглощения в области 350–420 нм и сильное увеличение поглощения в области 550–800 нм, обусловленное образованием триплетного состояния (Рисунок 3.16, 2). Гибель триплетного состояния **1** в атмосфере Ar происходит менее, чем за 3.5 мкс, образовавшиеся интермедиаты имеют сильное поглощение в области 370–450 нм с λ_{max} 400 нм и плечом до 600 нм (Рисунок 3.16, 3). В этой области поглощают таутомер **1** и радикальные короткоживущие продукты превращения триплетного состояния. На Рисунке 3.16 (4) приведен спектр триплет-триплетного поглощения **1**, определенный из экспериментов по лазерному фотолизу.

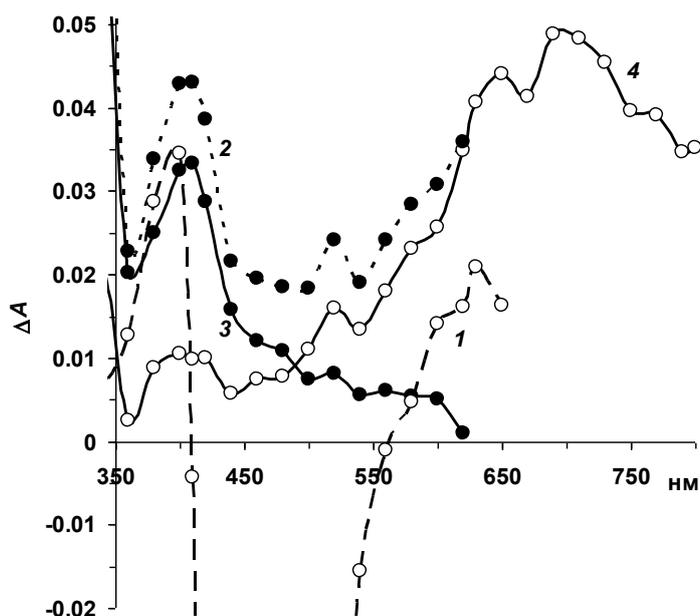


Рисунок 3.16 – Спектры промежуточного поглощения при лазерном фотолизе водно-спиртового раствора **1** в атмосфере Ar, время регистрации, мкс: (1) 0.017 (пунктирная линия, пустые точки), (2) 0.08 (пунктирная линия, черные точки), (3) 3.5 (сплошная линия, черные точки) и (4) спектр триплетного состояния **1** (сплошная линия, пустые точки); $\lambda_{\text{возб}}$ 353 нм

На Рисунке 3.17 представлены кривые гибели триплетного состояния **1** в зависимости от концентрации кислорода. 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 удовлетворительно описываются в предположении параллельной гибели по реакциям второго и первого порядка (уравнение (3)). 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 (схема 3.1, реакция (1)).

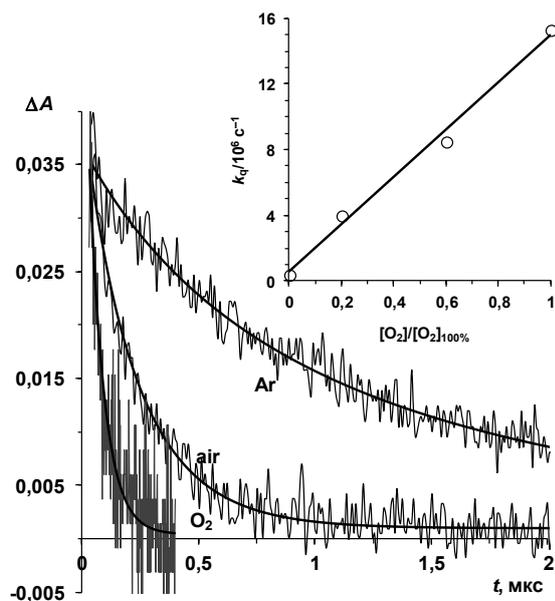


Рисунок 3.17 – Кинетика тушения кислородом триплетного состояния ФДГХ 1. Кривые гибели триплетного поглощения в атмосфере аргона (1), воздуха (2) и кислорода (3), сплошные гладкие линии – результат обработки экспериментальных данных в предположении гибели триплетного состояния по реакциям первого и второго порядка (уравнение (2)); вставка: зависимость константы скорости первого порядка тушения триплетного состояния от концентрации кислорода

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), $k_{T-T}/\epsilon_{620} \approx 1 \times 10^7$ 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 диффузионной константой скорости.

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 3.17, 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 $\text{мол}^{-1}\text{с}^{-1}$. Константы скорости гибели триплетного состояния первого порядка в вакууме (5×10^3 с^{-1}) и в атмосфере аргона (4×10^5 с^{-1}), определенные методами лампового и лазерного

импульсного фотолиза соответственно, различаются почти на два порядка. Это может быть обусловлено различными условиями проведения экспериментов, в первую очередь, более высокой исходной концентрацией **1** в растворе, который может участвовать в тушении триплетного состояния, а также наличием остаточного кислорода при продувке системы аргоном в экспериментах по лазерному фотолизу. Однако, поскольку скорость гибели триплетного состояния резко увеличивается при переходе к растворам, содержащим кислород, то величина константы скорости в отсутствие кислорода практически не влияет на бимолекулярную константу скорости взаимодействия с кислородом (Рисунок 3.17).

3.3.2. ФДГХ 2

Методом лазерного фотолиза раствора ФДГХ **2** в атмосфере Ar было показано образование интермедиата, скорость гибели которого увеличивалась на воздухе и в атмосфере O₂ (Рисунок 3.18). Из зависимости константы скорости тушения триплетного состояния от концентрации кислорода была определена бимолекулярная константа скорости взаимодействия триплетного состояния **2** с O₂, которая аналогично ФДГХ **1** имеет значение $\sim 2.5 \times 10^9$ л мол⁻¹с⁻¹. На Рисунке 3.19 представлены спектры промежуточного поглощения при лазерном фотолизе **2** в атмосфере аргона. Отчетливо наблюдается образование интермедиата, поглощающего в области 500–750 нм.

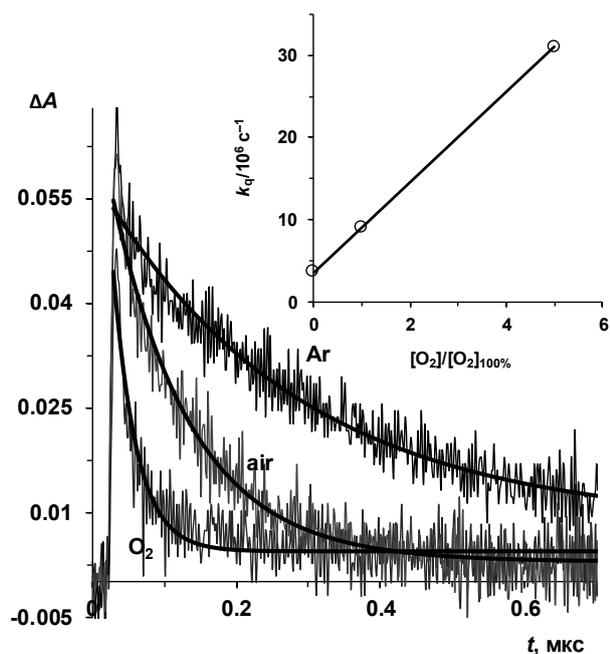


Рисунок 3.18 – Кинетика тушения кислородом триплетного состояния ФДГХ **2** в растворе H_2O – EtOH (9 : 1). Кривые гибели триплетного поглощения в атмосфере аргона (1), воздуха (2) и кислорода (3), сплошные гладкие линии – результат обработки экспериментальных данных в предположении гибели триплетного состояния по реакциям первого и второго порядка (уравнение (2)); вставка: зависимость константы скорости первого порядка тушения триплетного состояния от концентрации O_2

Взаимодействие триплетного состояния ФДГХ **2** с кислородом приводит к образованию синглетного кислорода с квантовым выходом ~ 0.02 , что было установлено при регистрации характерного спектра люминесценции в ближней ИК-области спектра. Образование синглетного кислорода может вносить вклад в фототоксическое действие ФДГХ.

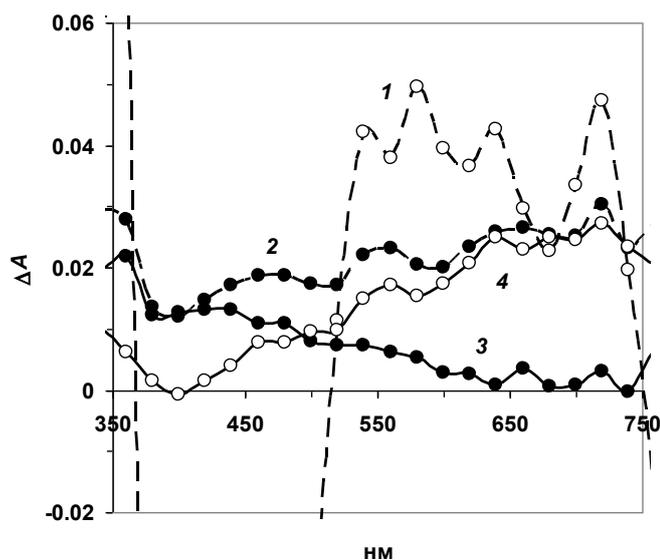


Рисунок 3.19 – Спектры промежуточного поглощения при лазерном фотолизе **2** в отсутствие кислорода, время регистрации, мкс: (1) 0.017 (пунктирная линия, пустые точки), (2) 0.04 пунктирная линия, черные точки), (3) 3.5 (сплошная линия, черные точки) и (4) спектр триплет-триплетного поглощения для триплетного состояния **2** (сплошная линия, пустые точки)

Исследование триплетов **2** было продолжено методом импульсного фотолиза. Сопоставление спектрально-кинетических характеристик интермедиатов, образующихся при импульсном фотолизе соединения **2** в вакууме O_2 и на воздухе в растворе ацетонитрила, показали, что дифференциальные спектры поглощения интермедиатов так же, как для **1** различаются в зависимости от наличия кислорода в растворе (Рисунок 3.20). Кроме появления поглощения в области 500–700 нм в отсутствие O_2 , которое связано с образованием триплетов, в вакууме увеличивается поглощения в области около 400 нм, которое мы относим к поглощению аминильного радикала, и около 480 нм. Очевидны также различия в спектрах этих соединений в длинноволновой области в отсутствие O_2 : для **2** наблюдается постепенное уменьшение поглощения при $\lambda > 500$ нм (Рисунок 3.20, вставка, спектр 1)

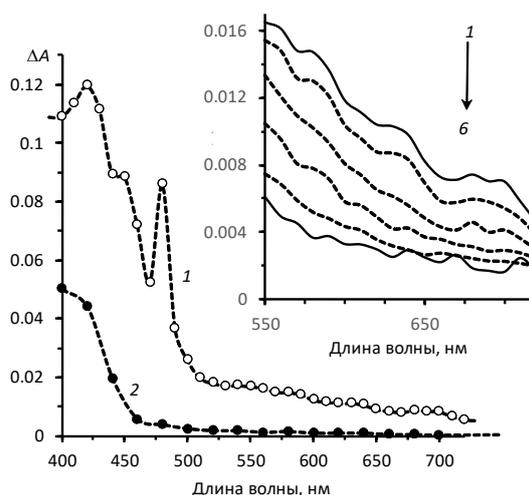


Рисунок 3.20 – Дифференциальные спектры поглощения после импульса света, соединение **2** в растворе ацетонитрила, (1) – в отсутствие O_2 , (2) – на воздухе. Вставка: изменение дифференциальных спектров поглощения во времени в диапазоне $550 < \lambda < 720$ нм, время регистрации, с: 0.00015 (1), 0.0002 (2), 0.0003 (3), 0.0005 (4), 0.001 (5), 0.002 (6)

Кинетика гибели интермедиатов, поглощающих в области 400 нм, подчиняется уравнению 2-го порядка (Рисунок 3.21), что является подтверждением их радикальной природы. Увеличение концентрации аминильных радикалов при фотолизе в отсутствие O_2 свидетельствует об их образовании из триплетного состояния. Преимущественное образование аминильных радикалов из соответствующих триплетных состояний аминов давно обсуждается в литературе. Интересно отметить, что для соединения **2** константа скорости гибели интермедиата, образовавшегося в отсутствие O_2 , примерно в 6 раз ниже, чем на воздухе (Рисунок 3.21, вставка). Это вероятно свидетельствует об изменении структуры радикала для **2**, в котором ацетамидная группа может играть особую роль в реакциях триплетного состояния. Нельзя исключить образования ион-радикальных интермедиатов, образовавшихся в результате реакций переноса электрона.

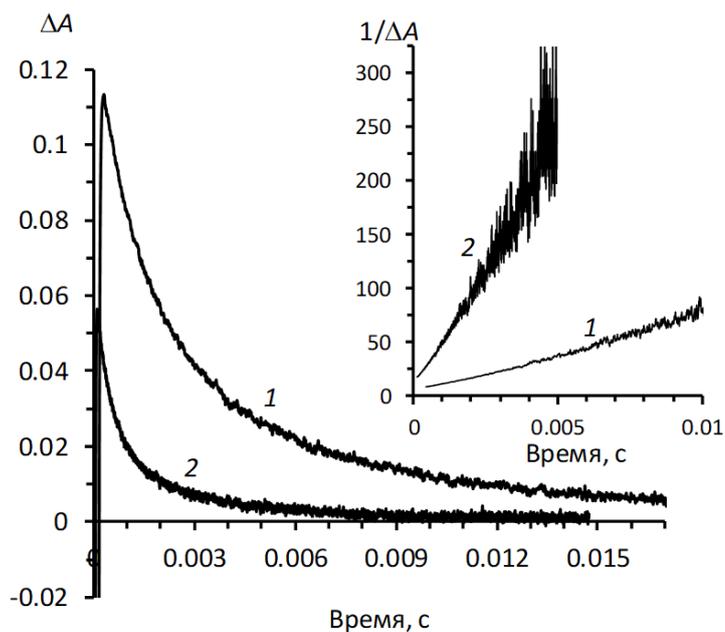


Рисунок 3.21 – Кинетика гибели дифференциального поглощения, образующегося при фотовозбуждении раствора соединения **2** в растворе ацетонитрила: (1) – в отсутствие O_2 , (2) – на воздухе, $\lambda_{\text{рег}} = 400$ нм. Вставка: зависимость $1/\Delta A$ от времени

Изменения спектров дифференциального поглощения во времени в отсутствие O_2 в длинноволновой области (Рисунок 3.22, вставка) показывает, что скорость этих изменений различна на разных длинах волн. Действительно, кинетические кривые гибели отчетливо демонстрируют наличие по крайней мере двух процессов, происходящих с разными константами скорости. Аппроксимация экспериментальных данных методом глобального анализа по уравнению (2) при $i = 2$ позволила определить константы скорости гибели и спектры поглощения для промежуточных частиц (Рисунок 3.22) для соединения **2** $k_1 = (5.5 \pm 0.5) \times 10^3 \text{ c}^{-1}$ ($\lambda_{\text{max}} = 630$ нм) и $k_2 = (1.0 \pm 0.1) \times 10^3 \text{ c}^{-1}$ ($\lambda_{\text{max}} \leq 550$ нм). Экспериментальные результаты позволяют сделать предположение, что два короткоживущих интермедиата образуются независимо из синглетного возбужденного состояния **2**.

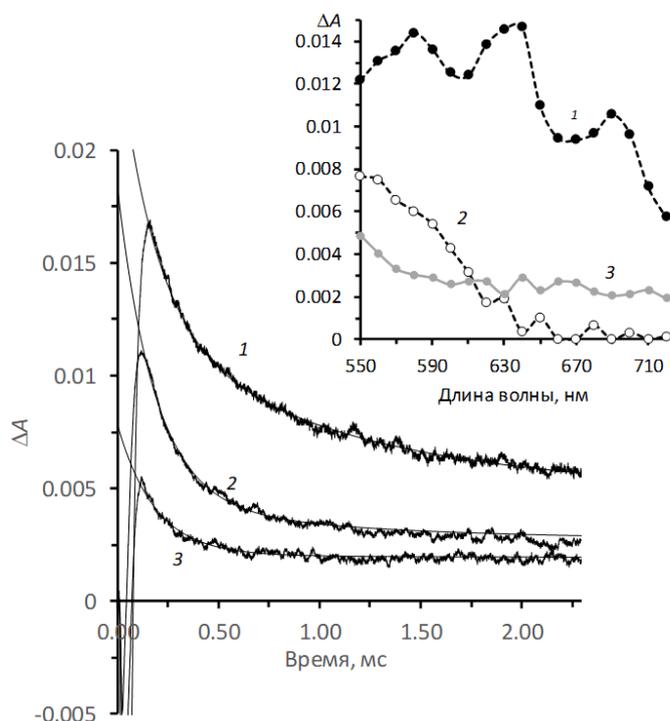


Рисунок 3.22 – Экспериментальная кинетика и аппроксимирующие кривые гибели дифференциального поглощения в отсутствие O_2 для соединения **2** в растворе ацетонитрила, $\lambda_{\text{рег}}$, нм: 550 (1), 620 (2) и 720 (3). Вставка: рассчитанные спектры поглощения интермедиатов с константами гибели, s^{-1} : 5.5×10^3 (1) и 1.0×10^3 (2), (3) спектр поглощения при $t \rightarrow \infty$

Сравнение спектра *1*, полученного методом импульсного фотолиза в ацетонитриле (рисунок 3.22), со спектром триплетного поглощения *4* (рисунок 3.19), полученного методом лазерного фотолиза в водно-спиртовом растворе, демонстрирует их сходство.

3.3.3. ФДГХ 3

Особенностью нитроароматических соединений является резкое уменьшение времени жизни возбужденного синглетного состояния за счет внутренней конверсии и эффективной интеркомбинационной конверсии, приводящей к образованию возбужденного триплетного состояния. Спектральное поведение ФДГХ **3** аналогично поведению ДГХ с нитрогруппой [127]. Введение нитрогруппы существенным образом меняет спектральные, фотохимические и фотофизические свойства фуридигидрохинолина. В отличие от соединений **1** и **2** соединение **3** имеет интенсивную полосу поглощения в видимой области

($\lambda_{\text{max}} = 468 \text{ нм}$, $\epsilon = 2300 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$) (Рисунок 3.1 (3)) и не флуоресцирует (Таблица 1). Это соединение фотостабильно, и не претерпевает изменений в процессе стационарного фотолиза при облучении светом как в видимой, так и в УФ-области. Методом нс импульсного фотолиза при возбуждении видимой полосы поглощения не наблюдали генерации короткоживущих интермедиатов как в атмосфере кислорода, так и после продувки аргоном. Однако при возбуждении продутых аргоном проб импульсом света с $\lambda = 355 \text{ нм}$, наблюдали появление интермедиата, со спектром триплет-триплетного поглощения в области 350–450 и 550–700 нм (λ_{max} 400 и 650 нм) и временем жизни $\sim 8 \text{ мкс}$ (Рисунок 3.23 (а)). Гибель этого интермедиата резко ускоряется в присутствии кислорода воздуха (Рисунок 3.23 (б)), что свидетельствует о том, что это действительно возбужденное триплетное состояние соединения **3**.

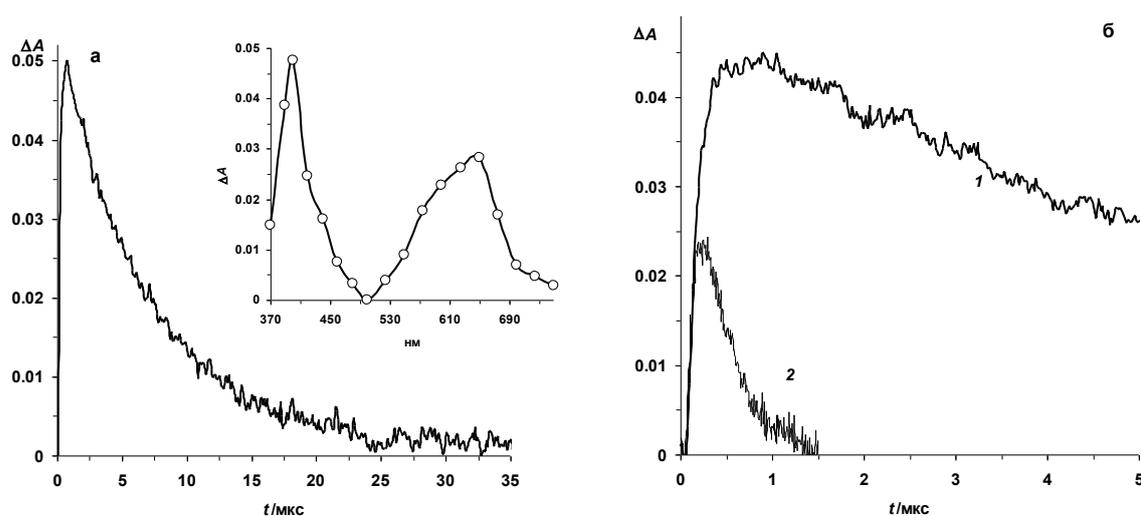


Рисунок 3.23 – (а) Кинетика гибели триплета соединения **3** в атмосфере Ar, нс импульсный фотолиз, $\lambda_{\text{возб}} 355 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{рег}} 400 \text{ нм}$; спектр триплет-триплетного поглощения (вставка). (б) Кинетика гибели триплетного состояния соединения **3** в атмосфере Ar (1) и на воздухе (2), $\lambda_{\text{возб}} 355 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{рег}} 400 \text{ нм}$

Таким образом, для **3** аналогично нитро-ДГХ наблюдается существенное отличие от закономерностей для нитроароматических углеводородов. ИКК и образование триплетного состояния происходит только при возбуждении более высоких синглетных уровней светом в УФ-области. Это может быть связано с тем, что триплетный уровень с вкладом $n-\pi^*$ состояния, на который возможна

ИКК из π - π^* синглетного состояния [133], находится в нитро-ДГХ и ФДГХ **3** выше уровня S_1 (Рисунок 3.24).

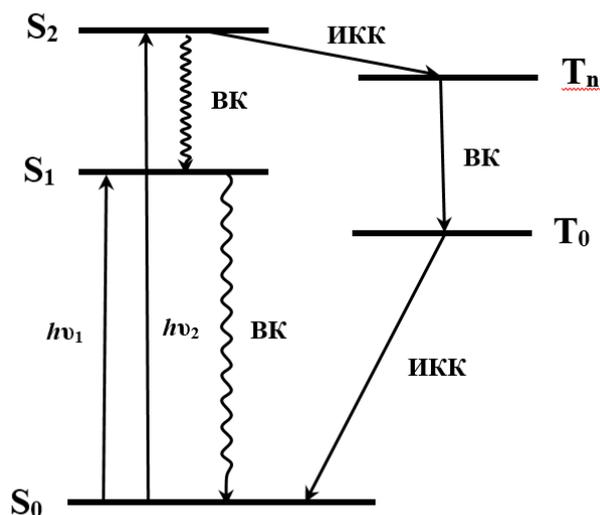


Рисунок 3.24 – Схематическое представление энергетических состояний ФДГХ **3**

3.3.4. ФТГХ **5**

Методом импульсного фотолиза было зарегистрировано образование триплетов ФТГХ **5** в растворе ацетонитрила (Рисунок 3.25). В отсутствие кислорода наблюдается появление поглощения в области 550–720 нм, поглощение отсутствует в области $550 > \lambda > 500$ нм, и увеличивается при $\lambda < 500$ нм. Кинетика гибели интермедиатов, поглощающих в области 450–400 нм, подчиняется уравнению 2-го порядка (Рисунок 3.26), что является подтверждением их радикальной природы. Увеличение концентрации аминильных радикалов при фотолизе в отсутствие O_2 свидетельствует об их образовании из триплетного состояния, как и в случае **2**. В случае соединения **5** гибель радикальных интермедиатов происходит с близкими константами скорости как на воздухе, так и в вакуумированном растворе, что свидетельствует об их идентичности (Рисунок 3.26, вставка).

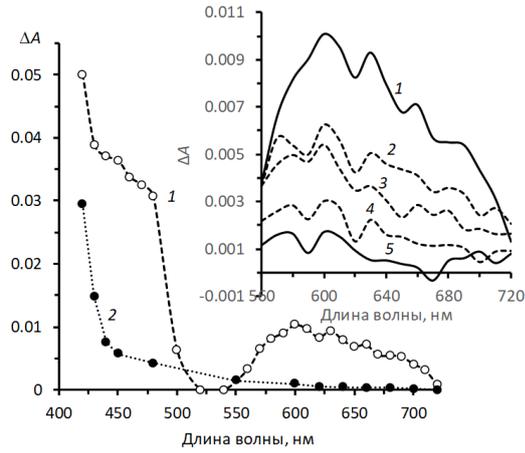


Рисунок 3.25 – Дифференциальные спектры поглощения после импульса света для ФТГХ **5** в растворе ацетонитрила, (1) – в отсутствие O_2 , (2) – на воздухе. Вставка: изменение дифференциальных спектров поглощения во времени в диапазоне $560 < \lambda < 720$ нм, время регистрации, с: 0.0008 (1), 0.0015 (2), 0.002 (3), 0.005 (4), 0.02 (5)

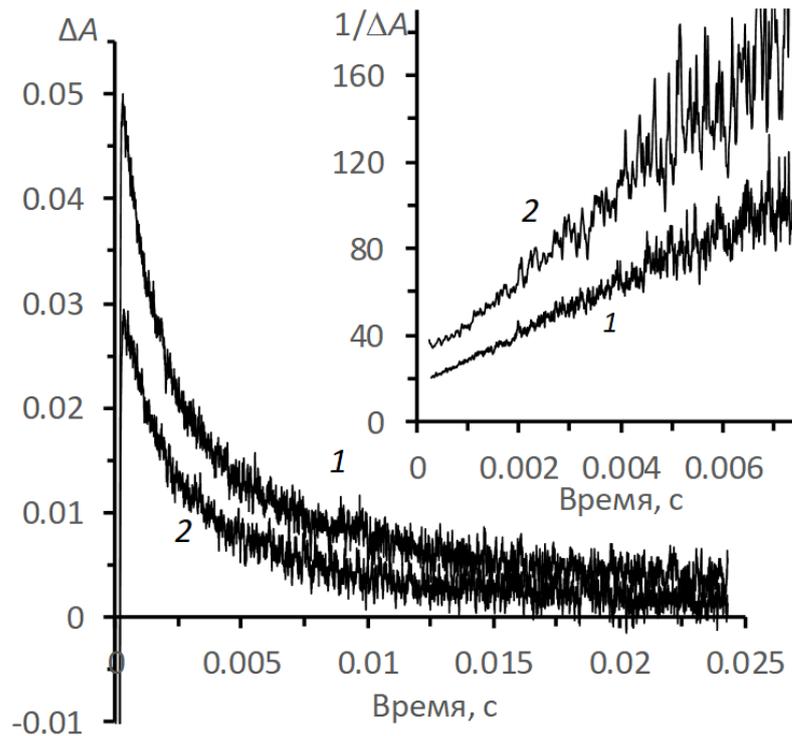


Рисунок 3.26 – Кинетика гибели дифференциального поглощения, образующегося при фотовозбуждении раствора соединения **5** в растворе ацетонитрила: (1) – в отсутствие O_2 , (2) – на воздухе, $\lambda_{\text{рег}} = 420$ нм. Вставка: зависимость $1/\Delta A$ от времени

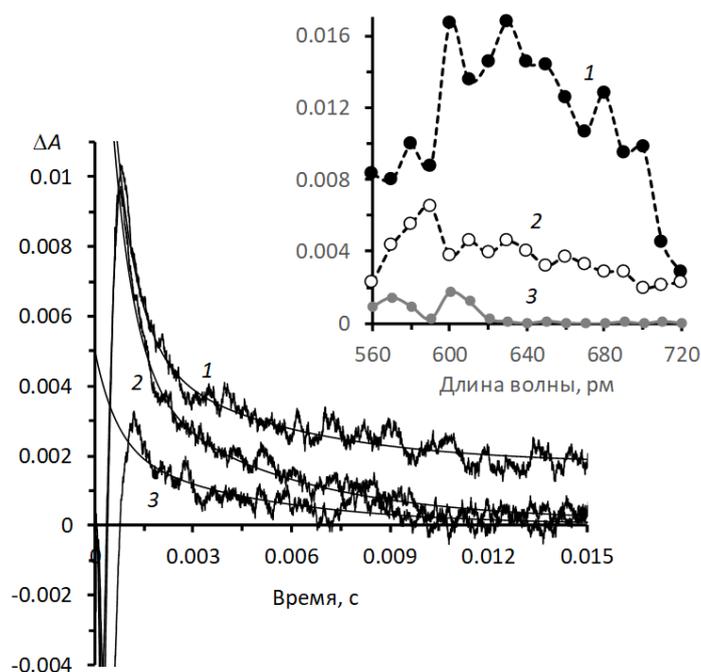


Рисунок 3.27 – Экспериментальная кинетика и аппроксимирующие кривые гибели дифференциального поглощения в отсутствие O_2 для соединения **5** в растворе ацетонитрила, $\lambda_{рег}$, нм: 600 (1), 630 (2) и 720 (3). Вставка: рассчитанные спектры поглощения интермедиатов с константами гибели, s^{-1} : $k_1 = (1.5 \pm 0.2) \times 10^3 s^{-1}$ (1) и $k_2 = (2.2 \pm 0.2) \times 10^2 s^{-1}$ (2), (3) спектр поглощения при $t \rightarrow \infty$

Аналогично **2** спектры дифференциального поглощения во времени в отсутствие O_2 в длинноволновой области (Рисунок 3.27) для **5** изменяются различным образом на разных длинах волн. Аппроксимация экспериментальных данных методом глобального анализа по уравнению (2) при $i = 2$ позволила определить константы скорости гибели ($k_1 = (1.5 \pm 0.2) \times 10^3 s^{-1}$ ($\lambda_{max} = 630$ нм) и $k_2 = (2.2 \pm 0.2) \times 10^2 s^{-1}$ ($\lambda_{max} = 590$ нм)) и спектры поглощения для двух промежуточных частиц (Рисунок 3.27, вставка).

3.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ ГЛАВЫ 3

Таким образом, получены спектрально-люминесцентные характеристики фууро- и тиенилпроизводных гидрированных хинолинов. За исключением ФДГХ **3** длинноволновые полосы поглощения исследуемых соединений находятся в УФ-А (**1, 2, 4**) и УФ-В (**5, 6**) области. Все соединения кроме нитропроизводного ФДГХ **3** флуоресцируют с относительно высоким квантовым выходом, который увеличивается с увеличением полярности растворителя. Показано, что при

фотовозбуждении происходит образование триплетных состояний со спектрами триплет–триплетного поглощения в области 600–700 нм. Квантовый выход триплетов также увеличивается с увеличением полярности среды.

что **1a** образует комплекс по типу интеркаляции между основаниями ДНК. Спектр КД ДНК в комплексе не меняется, что является свидетельством, что при комплексообразовании с **1a** структура ДНК не претерпевает существенных изменений.

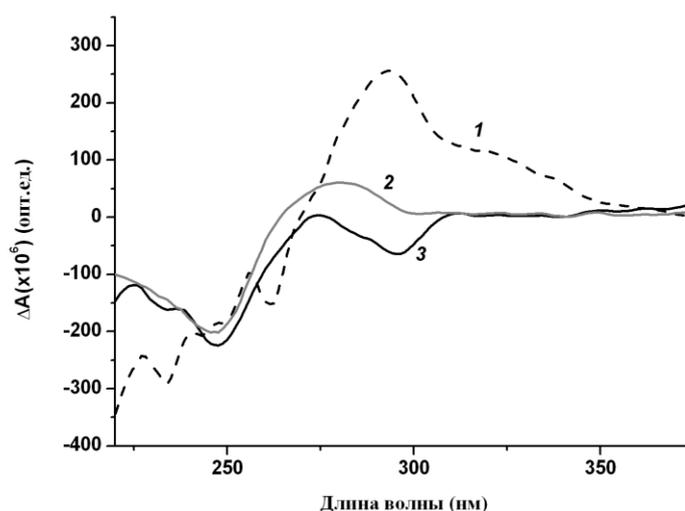


Рисунок 4.1 – Спектр кругового дихроизма соединения **1a** (2×10^{-5} М, 1), молекулы ДНК (3×10^{-5} М пар оснований ДНК, 2) и их смеси (3); все спектры сняты в 10 мМ фосфатном буфере, 0.3 М NaCl, pH=7.0

Исследование методом лазерного импульсного фотолиза показало, что добавление тимидин 5'-монофосфата (ТМР) в обескислороженные растворы ФДГХ **1** и **2** приводит к ускорению гибели триплетного состояния ФДГХ **1** и **2** (Рисунок 4.2). В результате аппроксимации кривых гибели $T^{\text{ФДГХ}}$ уравнением (3) были получены значения констант скорости тушения $k_{\text{ТМР}}$, которые линейно зависят от концентрации ТМР (Рисунок 4.2, вставки), и определено значение бимолекулярной константы скорости взаимодействия $T^{\text{ФДГХ}}$ с ТМР, которая составляет 1.9×10^9 и 2.0×10^9 л моль $^{-1}$ с $^{-1}$ для **1** и **2** соответственно. Таким образом, ТМР тушит триплетное состояние **1** и **2** с константой скорости, близкой к диффузионной.

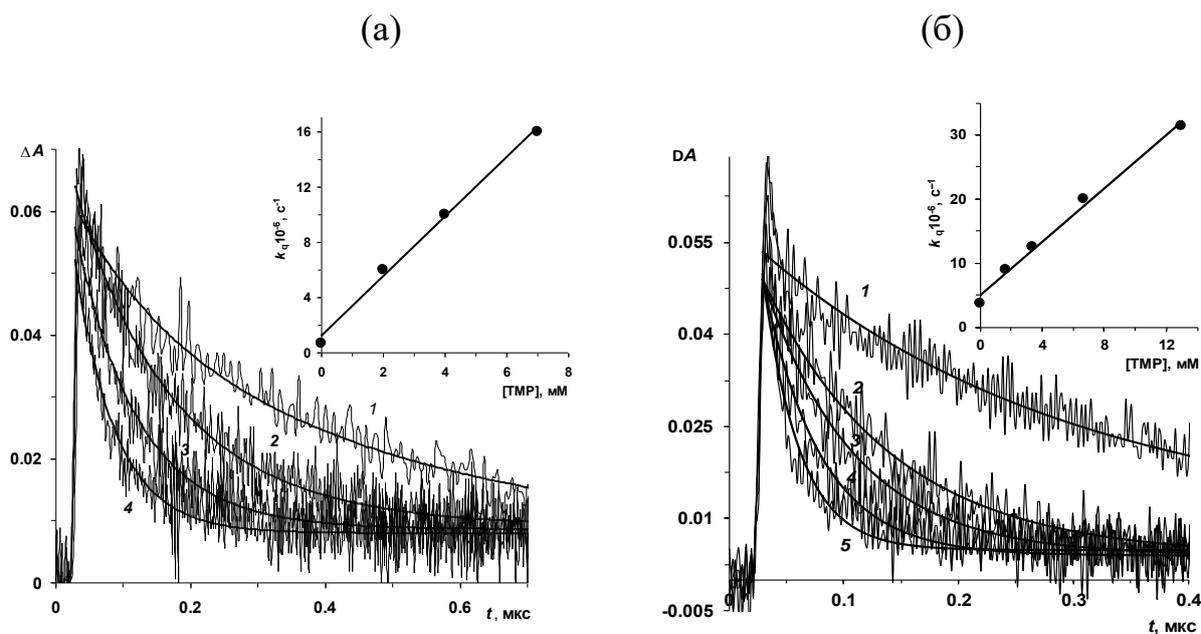


Рисунок 4.2 – Гибель триплетного поглощения в ФДГХ **1** (а) и **2** (б) (H_2O – EtOH (4 : 1 по объему), $\lambda_{\text{возб}} = 353$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 620$ нм) в отсутствие (1), и в присутствии ТМР, мМ: (а) (2) 2, (3) 4 и (4) 7 и (б) (2) 1.7 (3) 3.4, (4) 6.7 и (5) 13; сплошные гладкие линии – результат обработки экспериментальных данных по уравнению (2); вставка: зависимость константы скорости первого порядка тушения триплетного состояния от концентрации ТМР

Для того чтобы установить природу тушения триплетов **1** ТМР, был проведен стационарный фотолиз обескислороженной смеси ФДГХ **1** в присутствии ТМР. На Рисунке 4.3 представлено изменение спектра поглощения ФДГХ **1** в процессе фотолиза этой смеси в водно-спиртовом растворе (EtOH 10 об.%).

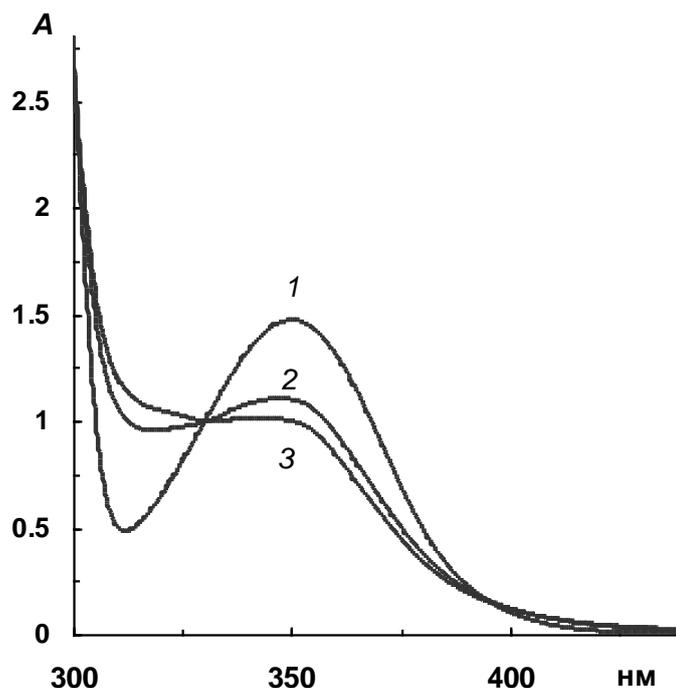


Рисунок 4.3 – Изменения в спектре поглощения при стационарном фотолизе смеси ФДГХ **1** (6.3×10^{-4} моль л⁻¹) + ТМР (1.2×10^{-2} моль л⁻¹) в растворе 10 об.% EtOH в воде в отсутствие O₂; время фотолиза, мин: (1) 0, (2) 60 и (3) 90

Смесь после фотолиза была подвергнута ESI-MS анализу до и после разделения методом ВЭЖХ. В масс-спектре фотолизата наряду с минорными пиками, характерными для продуктов фотолиза **1** в воде: гидроксипроизводного фуротетрагидрохинолина (ФТГХ) (МН⁺ 230 Да) и димера **1** (МН⁺ 425 Да), присутствуют пики с МН⁺ 580, 558 и 536 Да. На хроматограмме фотолизата (Рисунок 4.4), кроме пиков исходных веществ (ТМР (Rt 1.2 мин), тимин (Rt 3.2 мин), который присутствует в виде примеси к ТМР; **1** (Rt 11.8 мин)) и продуктов, которые наблюдали ранее при фотолизе **1** в водно-спиртовой смеси в отсутствие ТМР (Rt 6.7 (4-гидрокси-ФТГХ) и 8 мин (4-этокси-ФТГХ)) (Рисунок 3.10), появляются новые 4 продукта с временами удерживания от 5 до 6.5 мин (Рисунок 4.4). Эти продукты были выделены методом препаративной ВЭЖХ.

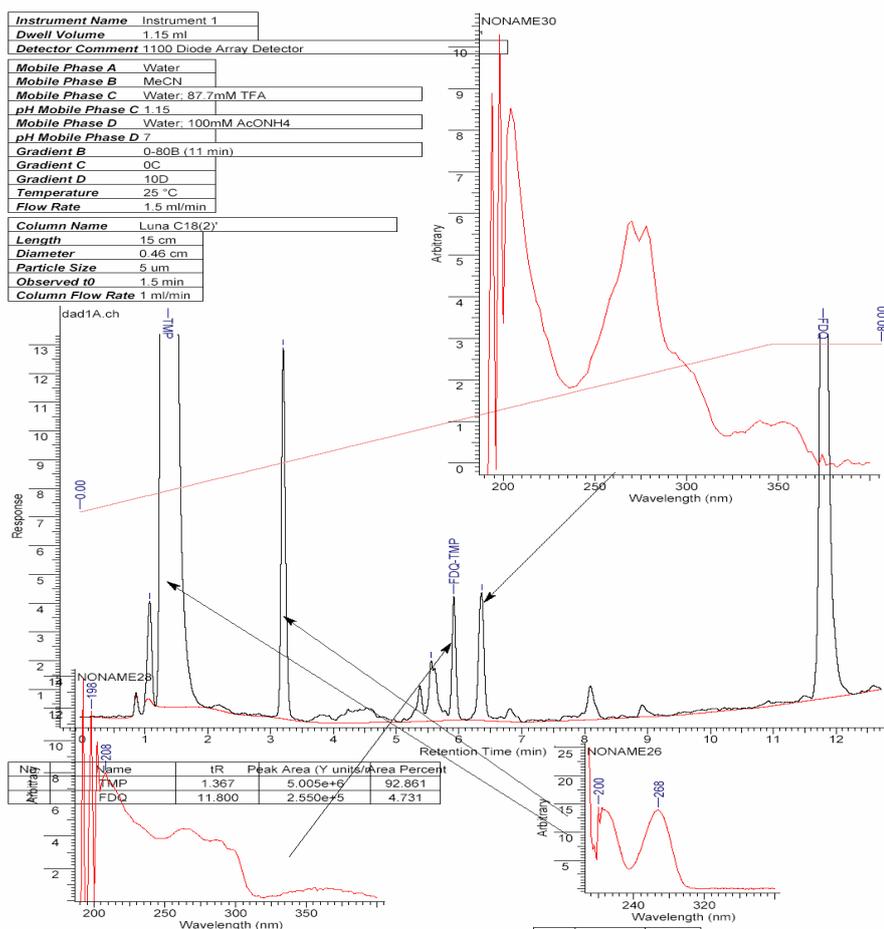


Рисунок 4.4 – Аналитическая ВЭЖХ фотолизата ФДГХ1 с ТМР в водно-спиртовом растворе

Таблица 2 – Масс-спектры фракций 1–4 и фрагментация иона с MH^+ 536 Да

Фракция	1	2	3	4
MH^+ Да (интенсивность)	580.145(8); 558.163(26); 536.181(100); 391.285(15); 316.322(10); 288.290(15); 279.159(14)	580.145(8); 558.163(26); 536.181(100); 391.285(29); 316.322(18); 288.290(30); 279.159(31)	558.163(10); 536.181(100)	558.163(12); 536.181(100); 391.285(7); 316.322(10); 288.290(12); 279.159(10)
Фрагментация MH^+ 536 Да	518.18(35); 420.27(7); 340.18(100)	340.18(100)	518.18(16); 420.27(7); 340.18(100)	340.18(100)

Масс-спектры всех четырех продуктов практически идентичны (Таблица 2, Рисунок 4.5) 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.

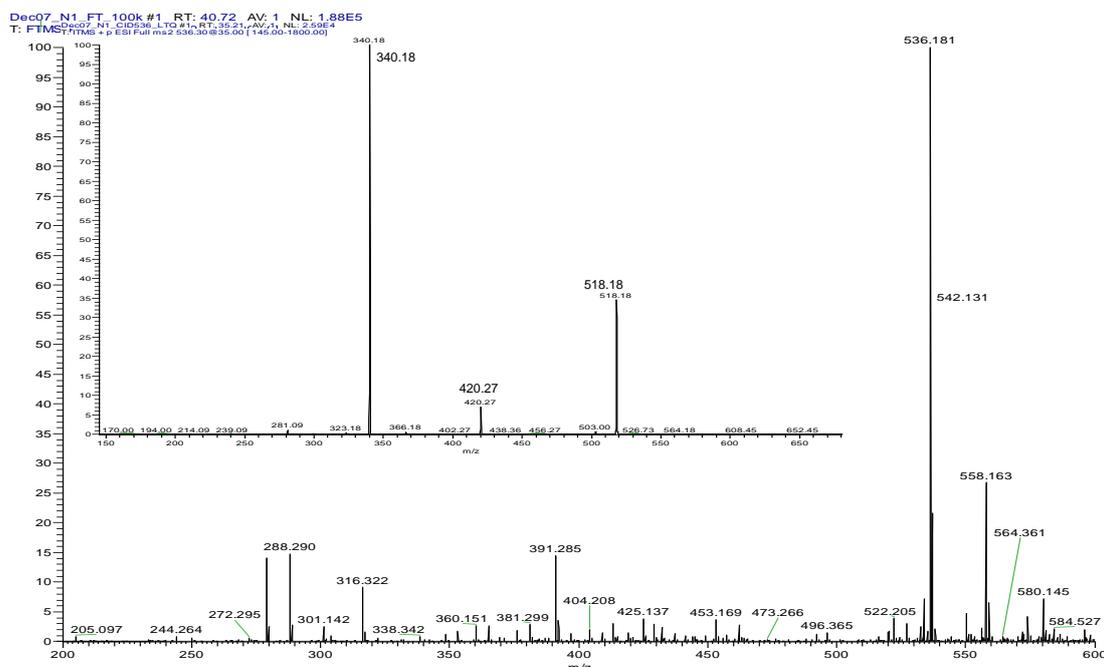


Рисунок 4.5 – Масс-спектр продуктов фотолиза в отсутствие кислорода смеси **1** + ТМР, выделенных методом ВЭЖХ (фракция 1); вставка: фрагментация молекулярного иона с $m/z = 536$ Да

Как следует из Рисунка 4.5, ион с MH^+ 536 Да, в котором Na^+ полностью замещен на H^+ , является основным. Его фрагментация дает основной ион с MH^+ 340 Да (Рисунок 4.5, вставка), который равен сумме масс **1** и тимина (М 126 Да), т.е. соответствует отщеплению сахаридного остатка от аддукта **1** + ТМР. Минорные пики с массами 518 и 420 Да соответствуют отщеплению воды и фосфата от рибофуранозы в основном ионе 536 Да. Отсутствие при фрагментации ионов с массами, относящимися к **1** и ТМР, указывает на прочность связи между **1** и тимином в аддукте. Это означает, что в процессе взаимодействия между **1** и ТМР аналогично псораленам 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** + 2TMP) с массами MH^+ 946, 924, 902, 880 и 858 Да.

Анализ продуктов фотолиза смеси **1** + TMP свидетельствует об образовании аддуктов с прочной связью между компонентами. Высокая скорость взаимодействия триплетного состояния **1** с молекулами TMP приводит к тому, что образование аддуктов успешно конкурирует с T–T аннигиляцией и интрекомбинационной конверсией в основное состояние, а также с процессом образования аминильного радикала и, соответственно, димерного продукта, выход которого уменьшается в присутствии TMP (схема 4.1).

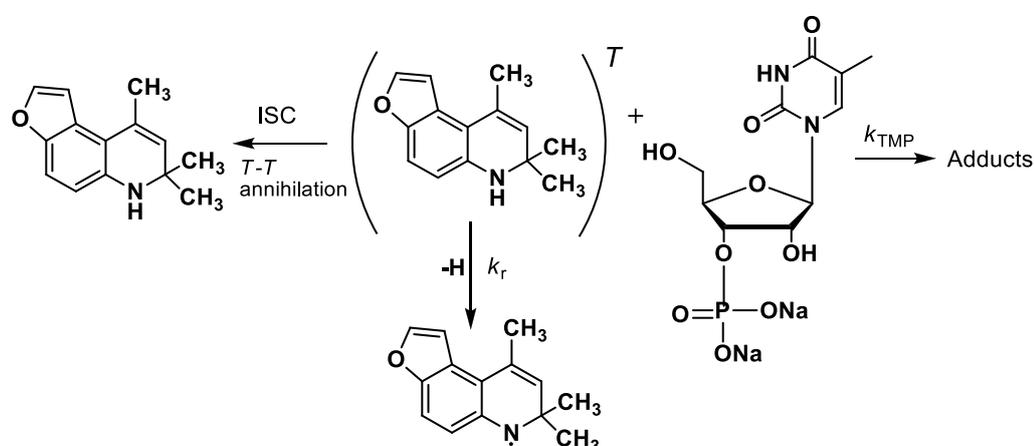
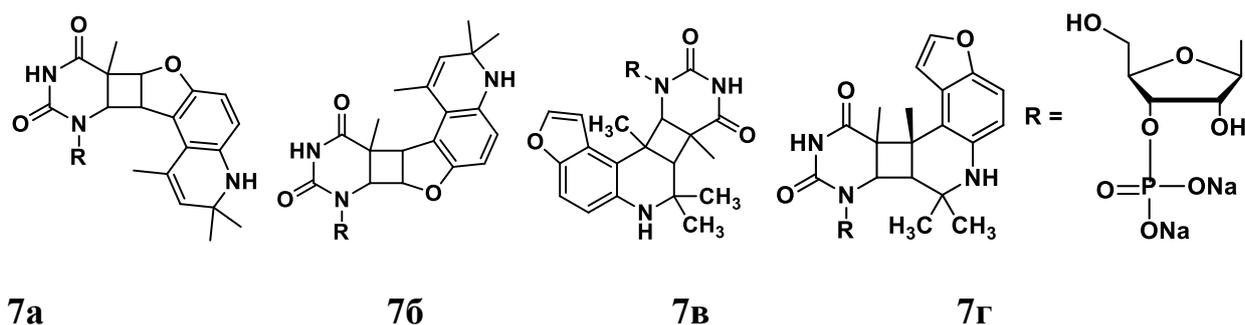


Схема 4.1 – Фотолиз ФДГХ **1** + TMP

Образование четырех аддуктов объясняется тем, что ФДГХ **1**, имеет две двойные связи, по которым возможна реакция фотоциклоприсоединения: в фурановом и дигидрохинолиновом циклах. Поэтому так же как в псораленах [2], возможно образование четырех аддуктов: двух по двойной связи фуранового цикла (**7a** и **7б**) и двух по двойной связи азотсодержащего гетероцикла (**7в** и **7г**). При этом следует иметь в виду, что возможны пространственные изомеры для каждого из изомеров.



К сожалению, не удалось выделить аддукты в количествах, необходимых для их структурной идентификации методами ИК и ЯМР спектроскопии. Однако были зарегистрированы спектры поглощения изолированных аддуктов (Рисунок 4.6) двух типов, при этом каждому типу спектра поглощения соответствуют две фракции, выделенные методом ВЭЖХ.

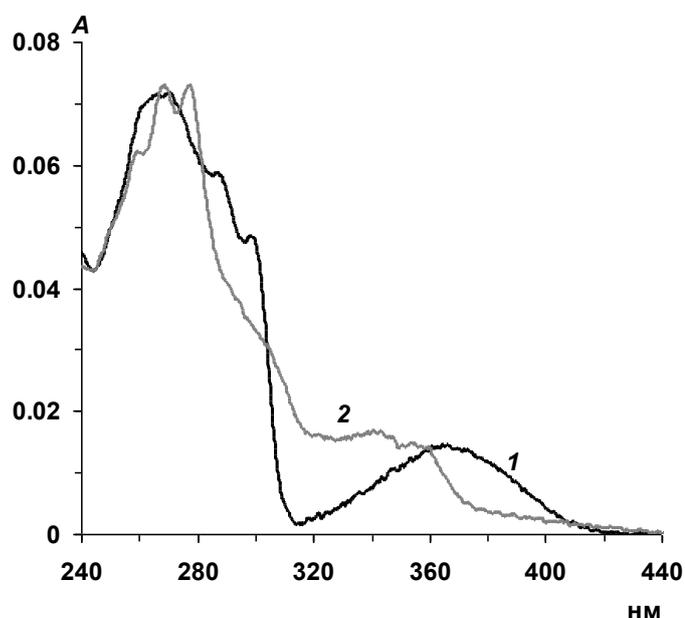
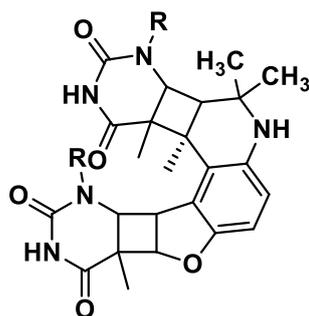


Рисунок 4.6 – Спектры поглощения продуктов фотолиза в отсутствие кислорода смеси **1** + ТМР, выделенных методом ВЭЖХ: (1) фракции 1 и 2, (2) фракции 3 и 4

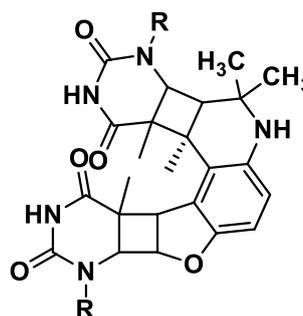
Характерным для этих спектров является наличие полос поглощения в области 320–420 нм и 250–300 нм. Различие проявляется в форме и положении полос. Наличие длинноволнового поглощения с максимумом 364 нм является характерным для соединений с дигидрохинолиновым циклом, в том числе для **1**. Поэтому спектр *1* с большой степенью вероятности принадлежит изомерам **7a** и **7б**. Тетрагидрохинолины имеют длинноволновую полосу поглощения в области 300–320 нм, в частности длинноволновый максимум ФТГХ **5** равен 320 нм, при этом для ФТГХ наблюдается отчетливо-выраженная колебательная структура спектра в области 250–260 нм. В спектре *2* длинноволновая полоса поглощения имеет гипсохромный сдвиг по сравнению со спектром *1* с максимумом поглощения в области 340–350 нм, а также наблюдается более выраженная колебательная структура полосы в области 260–280 нм. Эти различия в спектрах

продуктов могут быть обусловлены двумя причинами: образованием пространственных изомеров **7а** и **7б** за счет вращения отдельных фрагментов молекулы или спектр **2** может относиться к структурам **7в** и **7г**.

Для использования исследуемых веществ 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 **1**, фуранового кольца и азотсодержащего гетероцикла. В продуктах фотолиза смеси **1** + ТМР диаддукты не были обнаружены. Рассмотрены возможные структуры диаддуктов, при этом, поскольку показано, что при образовании аддукта по двойной связи азотсодержащего гетероцикла наиболее устойчивым является изомер **7г**, то для построения структуры диаддукта использовали именно этот фрагмент. Два изомера диаддуктов **8а** и **8б** можно представить себе следующим образом.



8a



8б

Оптимизация геометрии структур **8а** и **8б** 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. Следует отметить, что образования диаддуктов не наблюдали также для ангулярных изомеров псоралена, ангелицина и аллопсоралена, а также для ангулярных фуорохинолинонов [107; 108].

4.2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФДГХ 2 С ОЛИГОНУКЛЕОТИДОМ 5'-GCAAGTTGGAG-3'

В целях дальнейшего изучения взаимодействия ФДГХ с основаниями ДНК был проведен фотолиз смеси ФДГХ 2 с синтетическим олигонуклеотидом 5'-GCAAGTTGGAG-3', содержащим в своем составе два тиминовых основания (Рисунок 4.7).

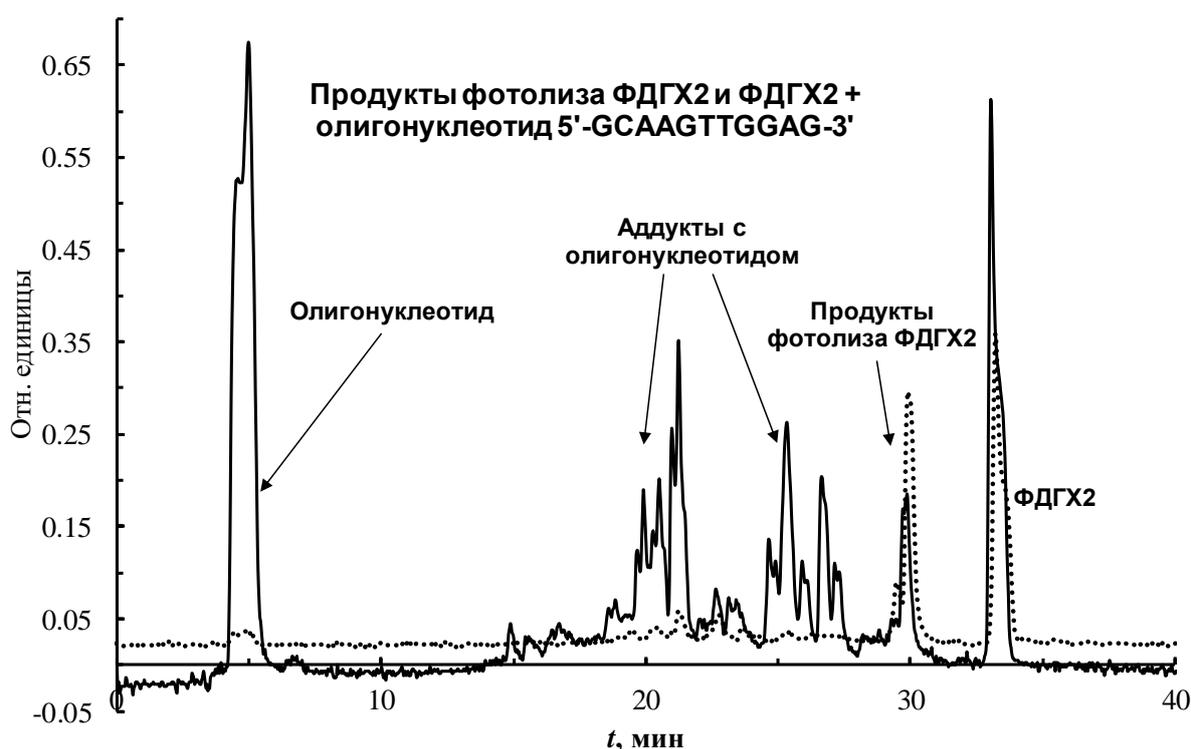


Рисунок 4.7 – Хроматограммы раствора ФДГХ 2 (точки) и смеси ФДГХ 2 + синтетический олигонуклеотид (сплошная линия) после облучения УФ-светом

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии были исследованы два раствора после УФ-облучения: первый раствор содержал только исследуемое соединение ФДГХ 2; во второй был добавлен синтетический олигонуклеотид с 11 основаниями (5'-GCAAGTTGGAG-3'). На хроматограмме (Рисунок 4.7, точки) пики с временами удерживания $R_t = 30$ и 33 мин относятся к продукту стационарного фотолиза 2, образовавшемуся в результате взаимодействия исследуемого соединения со средой, и к 2 соответственно. При добавлении в анализируемую смесь избытка синтетического олигонуклеотида

наблюдали образование новых пиков с временами удерживания от 19 до 22 мин, которые отсутствовали на хроматограмме фотолизата чистого **2**, при этом уменьшается относительное содержание продуктов взаимодействия ФДГХ с водой. Появление новых пиков свидетельствует об образовании продуктов присоединения **2** к олигонуклеотиду. Таким образом, проведенное исследование фотохимических реакций ФДГХ **2** и синтетического олигонуклеотида показало образование фотоаддуктов с тиминовыми основаниями олигонуклеотидной последовательности.

4.3. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФДГХ С ТИМИНОМ

Тимин, основание ДНК, входит в структуру биомакромолекулы в виде тимидин монофосфата (ТМР), в котором присутствует сахаридная группа с остатком фосфорной кислоты. В 4.1 было показано, что триплетные состояния ФДГХ взаимодействуют с ТМР с образованием фотоаддуктов с циклобутановым кольцом. Для выявления роли сахаридного остатка в структуре ТМР в образовании аддуктов была проведена серия экспериментов по исследованию реакции взаимодействия соединений **1–4** с тимином под действием УФ облучения. Было показано, что в случае соединений **1** и **2** расходование исходных ФДГХ и образование продуктов в стационарном фотолизе в присутствии тимина практически не отличается от стационарного фотолиза без него. При этом в масс-спектрах наблюдаются следовые количества аддукта присоединения тимина к молекуле исследуемого вещества. На Рисунке 4.8 представлен масс-спектр смеси избытка тимина с соединением ФДГХ **1** после фотолиза, где кроме масс MH^+ 127 и 214 относящихся к массам исходных тимина и **1** соответственно, присутствуют MH^+ 230 и 425 Да, которые можно отнести к продукту присоединения воды к молекуле **1** и к димеру **1** соответственно. Можно предположить, что небольшой пик с массой 338 Да является аддуктом, образованным в результате реакции циклоприсоединения тимина к молекуле ФДГХ **1**. Выход аддукта незначителен по сравнению с экспериментом, где в качестве реагента использовали ТМР, для

которого образование аддукта было зафиксировано в большом количестве (Рисунок 4.5).

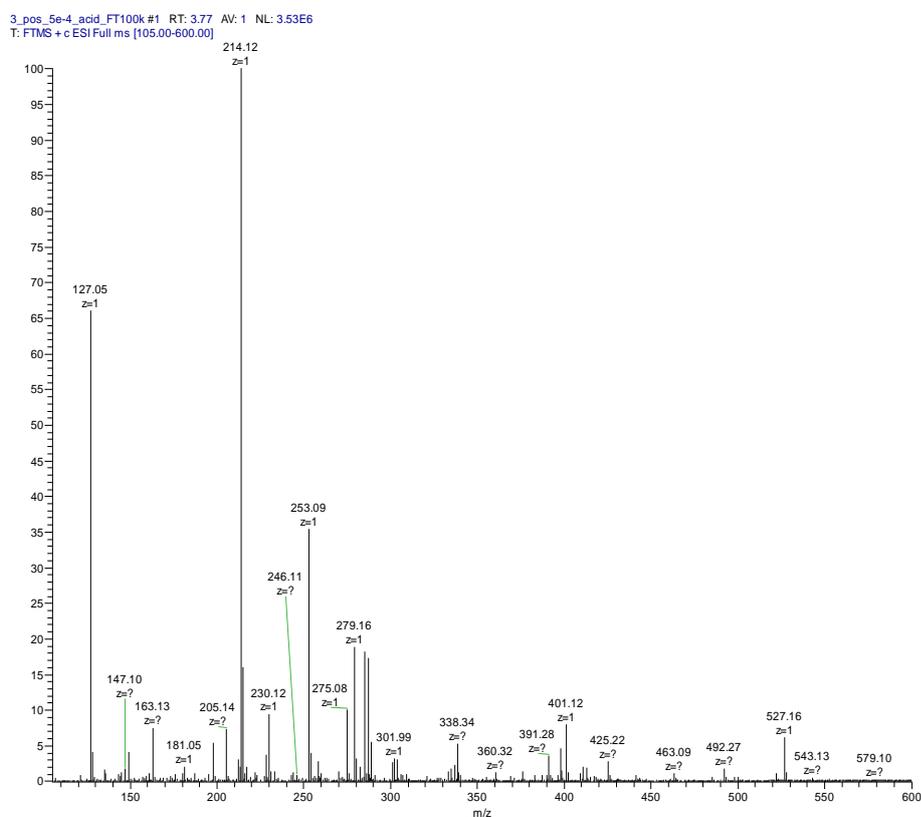


Рисунок 4.8 – Масс-спектр продуктов фотолиза в отсутствие кислорода смеси **1** + тимин

Для соединений **3** и **4** образования аддукта с тимином не было зафиксировано даже в следовых количествах. Полученные результаты означают, что образование аддукта с высоким выходом в случае ТМР по сравнению с тимином может быть обусловлено активацией двойной связи в ТМР присоединенным сахаридным остатком, что приводит к более эффективному взаимодействию с триплетом ФДГХ. Следует отметить, что аддукты псораленов в основном были получены при облучении или с ТМР, или с ДНК, или с олигонуклеотидной последовательностью, содержащей ТМР [4; 5; 47].

4.4. ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕМНОВОЙ И ФОТОЦИТОТОКСИЧНОСТИ СОЕДИНЕНИЙ

Токсичность исследуемых соединений **1–6** была определена на клетках карциномы молочной железы человека MCF-7 и толстой кишки человека НСТ116 согласно протоколам, описанным в экспериментальной части. Исследования показали, что соединения **1–6** не проявляют темновой токсичности в концентрациях до 50 мкМ при инкубации в течение 72 час (Рисунок 4.9).

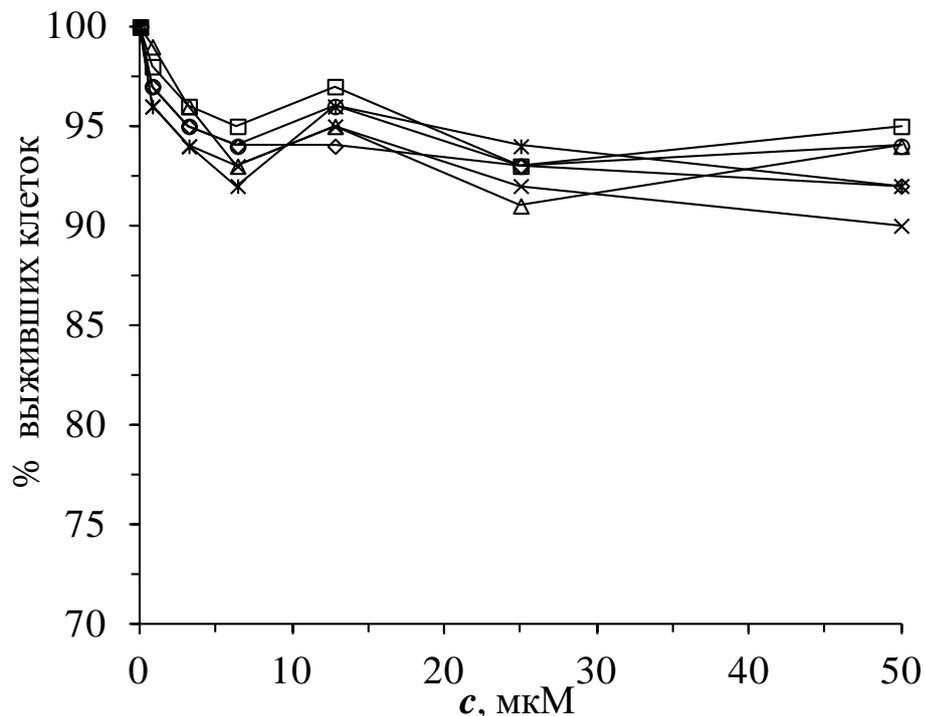


Рисунок 4.9 – Исследование темновой токсичности на клетках линии карциномы толстой кишки НСТ116 в зависимости от концентрации исследуемых веществ: ФДГХ **1** (квадрат); **2** (крестик); **3** (треугольник); ТДГХ **4** (круг); ФТГХ **5** (ромб); **6** (звездочка)

При обработке клеток соединениями **1** и **2** в концентрации 10 мкМ с последующим облучением диодным лазером $\lambda_{\text{ит}} = 365$ 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. Облучение клеток в отсутствие ФДГХ не приводит к гибели клеток. Соединение **1** обладает умеренной фототоксичностью на клетках карциномы толстой кишки человека НСТ116 и сильной фототоксичностью на клетках карциномы молочной

железы человека MCF-7 (Рисунок 4.10). 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 фотоцитотоксичностью.



Рисунок 4.10 – Морфология клеток рака молочной железы MCF-7 до и после облучения лазером ($\lambda = 365$ нм, 15 мин, мощность дозы $W = 15$ мВт) в присутствии соединения **1**. После облучения клетки инкубировали в полной питательной среде: (а) контроль; (б) 2 ч; (в) 24 ч.

Длинноволновая полоса поглощения соединений **5** и **6** находится в УФ-В диапазоне, и они практически не поглощают свет УФ-А диапазона (Рисунок 3.1 (б)). Поскольку облучение клеток проводили светом с $\lambda_{\text{irr}} = 365$ нм, то фототоксического эффекта с этими соединениями не наблюдали.

Предварительные эксперименты на животных (мыши) показали, что на модели химического ожога, индуцируемого обработкой динитробензолом, обработка ФДГХ **1** с последующим облучением светом $\lambda = 365$ нм ускоряет заживление ожога.

4.5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ ГЛАВЫ 4

Таким образом, проведенное исследование взаимодействия триплетов ФДГХ **1** и **2** с ТМР и олигонуклеотидом однозначно показало, что при этом взаимодействии происходит образование моноаддуктов ФДГХ с ТМР и не образуются диаддукты. В результате цитотоксикологического исследования было установлено, что все исследованные соединения не обладают темновой токсичностью, при этом соединения **1** и **2** демонстрируют фотоцитотоксичность

при облучении светом УФ-А диапазона по механизму апоптоза на клетках карциномы молочной железы человека MCF-7 и толстой кишки человека HCT116. Результаты, полученные при исследовании взаимодействия ФДГХ с основаниями ДНК (ТМР), синтетическими олигонуклеотидами и ДНК, указывают на перспективность дальнейшего исследования соединений этого класса с целью выявления наиболее эффективных препаратов для фототерапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках представленной диссертационной работы были охарактеризованы фотохимические и фотофизические свойства новых производных гидрированных фууро- 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 в анализируемых соединениях, протекают различным путем в зависимости от наличия кислорода воздуха в реакционной среде, а также от структуры фууропроизводного. ФДГХ **3** с нитрозаместителем является фотостабильным соединением и не подвергается фотохимическим 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 увеличивается с увеличением полярности растворителя. Установлен диапазон энергии низшего триплетного уровня ФДГХ **1** и его спектр поглощения.

Константа скорости тушения триплетного состояния ФДГХ динатриевой солью тимидин 5-мнфофосфата 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 карциномы прямой кишки и молочной железы человека 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 $19\ 000 > E_T > 14\ 700\ \text{см}^{-1}$. Таким образом в результате фотофозбуждения ФДГХ образуется реакционноспособное долгоживущее триплетное состояние с энергией, превышающей энергию основного состояния на ~ 2 эВ.

2. Установлена определяющая роль триплетного возбужденного состояния в фотохимических реакциях ФДГХ в различных растворителях, в том числе в 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 диадуктов, 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 моноаддуктов с тиминным основанием ДНК.

5. Все исследуемые фуридригидро- и фуротетрагидрохинолины не обладают цитотоксичностью в контрольном темновом эксперименте. Однако, 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ПУВА-терапия (англ. PUVA) – образовано из начальных букв слов "psoralens" и "ultraviolet A", метод фототерапии кожных заболеваний

CNDO/S – метод полного пренебрежения дифференциальным перекрыванием

5-MOP – 5-метоксипсорален

8-MOP – 8-метоксипсорален

5,8-MOP – 5,8-диметоксипсорален

4,5',8-TMP – 4,5',8-триметилпсорален

3-CPs – 3-карбетоксипсорален

МеруPs – 7-метилпиридо[3,4-с]псорален

2N-MePyPs – 7-метилпиридо[4,3-с]псорален

НМР – 4'-(гидроксиметил)-4,5',8-триметилпсорален

АМТ – 4'-аминометил-4,5',8-триметилпсорален

АТ – аденин тимин последовательность оснований

АТ-ДНК – синтетическая двух-цепочечная ДНК, включающая только адениновые и тиминовые основания

А – аденин

Т – тимин

ГС – гуанин цитозин последовательность оснований

ГМР – гуанозин монофосфат

FQ – 1,4,6,8-тетраметилфуоро[2,3-h]хинолин-2(1H)-он

HFQ – 4,6,9-триметилфуоро[2,3-h]хинолин-2(1H)-он

Fc – фуорокумарин

ФДГХ – фуородигидрохинолин

ТДГХ – тиенодигидрохинолин

ФТГХ – фуротетрагидрохинолин

SBP – тетранатриевая соль сульфобенз(а)пирена

ТМР – тимидин 5'-монофосфат динатриевая соль

РОРОР – 1,4-ди-[2-(5-фенилоксазолил)]-бензол

ТГХ – тетрагидрохинолин

ДГХ – дигидрохинолин

АФК – активная форма кислорода

ФС – фотосенсибилизатор

ЦБД – циклобутановый димер

МА – моноаддукт

ДА – диаддукт

ФМА – моноаддукт, образованный по фурановому циклу

ПМА – моноаддукт, образованный по пироновому циклу

ИКК – интеркомбинационная конверсия

ВК – безызлучательная внутренняя конверсия

СО – спин-орбитальное взаимодействие

ДРС – кросс-сшивки между молекулами ДНК и белками посредством псораленового мостика

МСF-7 – клетки рака молочной железы

НСТ116 – клетки рака толстой кишки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Richard E. G. The Science and (Lost) Art of Psoralen Plus UVA Phototherapy / Richard E. G. // *Dermatologic Clinics*. 2020. Vol. 38. № 1. P. 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.det.2019.08.002>
2. Bethea D. Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine / Bethea D., Fullmer B., Syed S., Seltzer G., Tiano J., Rischko C., Gillespie L., Brown D., Gasparro F. P. // *Journal of Dermatological Science*. 1999. Vol. 19. № 2. P. 78–88. [https://doi.org/10.1016/S0923-1811\(98\)00064-4](https://doi.org/10.1016/S0923-1811(98)00064-4)
3. Kitamura N. Molecular aspects of furocoumarin reactions: Photophysics, photochemistry, photobiology, and structural analysis / Kitamura N., Kohtani S., Nakagaki R. // *J. Photochem. Photobiol. C: Photochemistry Reviews*. 2005. Vol. 6. P. 168–185.
4. Diekmann J. The Photoaddition of a Psoralen to DNA Proceeds via the Triplet State / Diekmann J., Gontcharov J., Fröbel S., Ziegenbein C. T., Zinth W., Gilch P. // *J. Am. Chem. Soc.* 2019. Vol. 141, № 34, P. 13643–13653. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b06521>
5. Kanne D. Isolation and characterization of pyrimidine-psoralen-pyrimidine photodiadducts from DNA / Kanne D., Straub K., Hearst J. E., Rapoport H. // *J. Am. Chem. Soc.* 1982. Vol. 104. № 24. P. 6754–6764. <https://doi.org/10.1021/ja00388a046>
6. Westerhof W. Treatment of Vitiligo With UV-B Radiation vs Topical Psoralen Plus UV-A / Westerhof W., Nieuweboer-Krobotova L. // *Arch Dermatol*. 1997. Vol. 133. № 12. P. 1525-1528. <https://doi.org/10.1001/archderm.1997.03890480045006>
7. Stern R. S. Psoralen and Ultraviolet A Light Therapy for Psoriasis / Stern R. S. // *New England Journal of Medicine*. 2007. Vol. 357. P. 682-690. <https://doi.org/10.1056/NEJMct072317>
8. Stern R. S. Oral Psoralen and Ultraviolet-A Light (PUVA) Treatment of Psoriasis and Persistent Risk of Nonmelanoma Skin Cancer / Stern R. S., Liebman E. J.,

- Väkevä L. // *Journal of the National Cancer Institute*. 1998. Vol. 90. № 17. P. 1278–1284. <https://doi.org/10.1093/jnci/90.17.1278>
9. Raquet N. Relative Photomutagenicity of Furocoumarins and Limettin in the Hypoxanthine Phosphoribosyl Transferase Assay in V79 Cells / Raquet N., Schrenk D. // *Chem. Res. Toxicol.* 2009. Vol. 22. № 9. P. 1639–1647. <https://doi.org/10.1021/tx9002287>
 10. Chen X. Photosensitized cross-linking and cleavage of pBR322 and M13 DNA: Comparison of 4,4',6-trimethylangelicin and 3-carbethoxypsoralen / Chen X., Kagan J., Dall'Acqua F., Averbeck D., Bisagni E. // *J. Photochem. Photobiol. B*. 1994. Vol. 22. № 1. P. 51. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(93\)06953-Z](https://doi.org/10.1016/1011-1344(93)06953-Z)
 11. Derheimer F. A. Psoralen-Induced DNA Interstrand Cross-Links Block Transcription and Induce p53 in an Ataxia-Telangiectasia and Rad3-Related-Dependent Manner / Derheimer F. A., Hicks J. K., Paulsen M. T., Canman C. E., Ljungman M. // *Mol. Pharmacol.* 2009. Vol. 75. № 3. P. 599–607. <https://doi.org/10.1124/mol.108.051698>
 12. Hanson. C. V. Cross-Linking of DNA in Situ as a Probe for Chromatin Structure / Hanson C. V., Shen C.-K. J., Hearst J. E. // *Science*. 1976. Vol. 193. № 4247. P. 62-64.
 13. Cech T. R. Cross-linking of DNA with trimethylpsoralen is a probe for chromatin structure / Cech T. R., Pardue J. L. // *Cell*. 1977. Vol. 11. № 3. P. 631-640.
 14. Ling T.C. British Association of Dermatologists and British Photodermatology Group guidelines for the safe and effective use of psoralen-ultraviolet A therapy 2015 / Ling T.C., Clayton T.H., Crawley J., Exton L.S., Goulden V., Ibbotson S., McKenna K., Mohd M.F., Rhodes L.E., Sarkany R. // *Br. J. Dermatol.* 2016. Vol. 174. P. 24–55.
 15. Lindelöf B. PUVA and cancer: a large-scale epidemiological study / Lindelöf B., Sigurgeirsson B., Tegner E., // *Lancet*. 1991. Vol. 338. № 8759. P. 91–93.
 16. Stern R.S. Risk of squamous cell carcinoma and methoxsalen (psoralen) and UV-A radiation (PUVA). A meta-analysis / Stern R.S., Lunder E.J. // *Arch Dermatol.* 1998. Vol. 134. № 12. P. 1582–1585.

17. Stern R.S. PUVA Follow-Up Study. The risk of squamous cell and basal cell cancer associated with psoralen and ultraviolet A therapy: a 30-year prospective study / Stern R.S. // *J. Am. Acad. Dermatol.* 2012. Vol. 66. P. 553.
18. Marcil I. Squamous-cell cancer of the skin in patients given PUVA and ciclosporin: nested cohort crossover study / Marcil I., Stern R.S. // *Lancet.* 2001. Vol. 358. P. 1042.
19. Stern R.S. PUVA Follow Up Study. The persistent risk of genital tumors among men treated with psoralen plus ultraviolet A (PUVA) for psoriasis / Stern R.S., Bagheri S., Nichols K. // *J. Am. Acad. Dermatol.* 2002. Vol. 47. P. 33.
20. Stern R.S. Malignant melanoma in patients treated for psoriasis with methoxsalen (psoralen) and ultraviolet A radiation (PUVA). The PUVA Follow-Up Study / Stern R.S., Nichols K.T., Väkevä L.H. // *N. Engl. J. Med.* 1997. Vol. 336. P. 1041.
21. Morison W.L. Consensus workshop on the toxic effects of long-term PUVA therapy / Morison W.L., Baughman R.D., Day R.M., Forbes P.D., Hoenigsmann H., Krueger G.G., Lebwohl M., Lew R., Naldi L., Parrish J.A., Piepkorn M., Stern R.S., Weinstein G.D., Whitmore S.E. // *Arch Dermatol.* 1998. Vol. 134. № 5. P. 595-598.
22. Reddy S.P. The risk of melanoma and hematologic cancers in patients with psoriasis / Reddy S.P., Martires K., Wu J.J. // *J Am Acad Dermatol.* 2017. Vol. 76. P. 639.
23. Margolis D. The risk of malignancy associated with psoriasis / Margolis D., Bilker W., Hennessy S., Vittorio C., Santanna J., Strom B.L. // *Arch Dermatol.* 2001. Vol. 137. № 6. P. 778-783.
24. Malanos D. Psoralen plus ultraviolet A does not increase the risk of cataracts: a 25-year prospective study / Malanos D., Stern R.S. // *J Am Acad Dermatol.* 2007. Vol. 57. P. 231.
25. Menter A. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 5. Guidelines of care for the treatment of psoriasis with phototherapy and photochemotherapy / Menter A., Korman N.J., Elmets C.A., Feldman S.R., Gelfand J.M., Gordon K.B., Gottlieb A., Koo J.Y., Lebwohl M., Lim H.W., Van Voorhees A.S., Beutner K.R., Bhushan R. // *J Am Acad Dermatol.* 2010. Vol. 62. № 1. P. 114.

26. Meffert H. Photo(chemo)therapie der Psoriasis / Meffert H., Piazena H. // *Akt Dermatol.* 2001. Vol. 27. P. 255–261.
27. Ravenscroft J. Systemic allergic contact dermatitis to 8-methoxypsoralen (8-MOP) / Ravenscroft J., Goulden V., Wilkinson M. // *J. Am. Acad. Dermatology.* 2001. Vol. 45. P. 218–219.
28. Shephard S.E. Measurement of 5-methoxypsoralen and 8-methoxypsoralen in saliva of PUVA patients as a noninvasive, clinically relevant alternative to monitoring in blood / Shephard S.E., Zogg M., Burg G., Panizzon R.G. // *Arch Dermatol. Res.* 1999. Vol. 291. P. 491–499.
29. Lebwohl M. Should we switch from combination UVA/UVB phototherapy units to narrowband UVB? / Lebwohl M. // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 2002. Vol. 18. P. 44–46.
30. Shirsath N. 8-methoxypsoralen plus UVA (PUVA) therapy normalizes signalling of phosphorylated component of mTOR pathway in psoriatic skin of K5.hTGF β 1 transgenic mice / Shirsath N., Mayer G., Singh T.P., Wolf P. // *Exp. Dermatol.* 2015. Vol. 24. P. 889.
31. Liszewski W. Psoralen with ultraviolet A-induced apoptosis of cutaneous lymphoma cell lines is augmented by type I interferons via the JAK1-STAT1 pathway / Liszewski W., Naym D.G., Biskup E., Gniadecki R. // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 2017. Vol. 33. P. 164.
32. Lim H.W. What's new in phototherapy / Lim H.W. // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 2000. Vol. 16. P. 232–233.
33. Lerche C.M. Few X-ray and PUVA treatments accelerate photocarcinogenesis in hairless mice / Lerche C.M., Al-Chaer R.N., Glud M., Philipsen P.A., Wulf H.C. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2021. Vol. 20. P. 1299–1307.
34. Абилев С.К. Изучение индукции 8-метоксипсораленом (8-МОП) SOS-ответа у бактерий *Escherichia coli* / Абилев С.К., Игонина Е.В., Лебедева А.А., Жошибекова С.Б. // *Вестник КазНУ. Серия экологическая.* 2020. Т. 63. №. 2. С. 44-52. <https://doi.org/10.26577/EJE.2020.v63.i2.05>

35. Knobler R. Guidelines on the use of extracorporeal photopheresis / Knobler R., Berlin G., Calzavara-Pinton P., Greinix H., Jaksch P., Laroche L., Ludvigsson J., Quaglino P., Reinisch W., Scarisbrick J., et al. // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2014. Vol. 28. P. 1–37.
36. Aubry M. Inactivation of Zika virus in plasma with amotosalen and ultraviolet A illumination / Aubry M., Richard V., Green J., Broult J., Musso D. // *Transfusion.* 2016. Vol. 56. № 1. P. 33–40. <https://doi.org/10.1111/trf.13271>
37. Drexler B. Extracorporeal Photopheresis in Graft-versus-Host Disease / Drexler B., Buser A., Infanti L., Stehle G., Halter J., Holbro A. // *Transfus. Med. Hemother.* 2020. Vol. 47. P. 214–224. DOI: 10.1159/000508169
38. Bonnett R. Chemical Aspects of Photodynamic Therapy / Bonnett R. // Gordon and Breach Science: Amsterdam, The Netherlands. 2000.
39. Baptista M.S. Photosensitization Reactions of Biomolecules: Definition, Targets and Mechanisms / Baptista M.S., Cadet J., Greer A., Thomas A.H. // *Photochemis. Photobiol.* 2021. Vol. 97. P. 1456–1483. doi: 10.1111/php.13470
40. Buhimschi A.D. Psoralen Derivatives with Enhanced Potency / Buhimschi A.D., Gooden D.M., Jing H., Fels D.R., Hansen K.S., Beyer W.F., Dewhirst M.W., Walder H., Gasparro F.P. // *Photochem. Photobiol.* 2020. Vol. 96. № 5. P. 1014–1031. <https://doi.org/10.1111/php.13263>
41. Demaret J.P. Geometry of intercalation of psoralens in DNA approached by molecular mechanics / Demaret J.P., Brunie S., Ballini J.P., Vigny P. // *Photochem. Photobiol.* 1989. Vol. 50. № 1. P. 7–21. doi: 10.1111/j.1751-1097.1989.tb04124.x.
42. Fröbel S. DNA Intercalated Psoralen Undergoes Efficient Photoinduced Electron Transfer / Fröbel S., Reiffers A., Torres Ziegenbein C., Gilch P. // *J. Phys. Chem. Lett.* 2015. Vol. 6. P. 1260–1264.
43. Fröbel S. Photoinduced Electron Transfer between Psoralens and DNA: Influence of DNA Sequence and Substitution / Fröbel S., Levi L., Ulamec S.M., Gilch P. // *ChemPhysChem.* 2016. Vol. 17. P. 1377–1386.

44. El-Gogary T.M. Noncovalent attachment of psoralen derivatives with DNA: Hartree-Fock and density functional studies on the probes / El-Gogary T.M., El-Gendy E.M. // *Spectrochimica Acta. Part A*. 2003. Vol. 59. № 11. P. 2635–2644.
45. Saenz-Mendez P. Theoretical Study of Sequence Selectivity and Preferred Binding Mode of Psoralen with DNA / Saenz-Mendez P., Guedes R.C., dos Santos D.J. V.A., Eriksson L.A. // *Research Letters in Physical Chemistry*. 2007. Vol. 2007. Article ID 60623. 5 pages. doi:10.1155/2007/60623
46. Saenz-Mendez P. Theoretical prediction of binding modes and hot sequences for allopsoralen–DNA interaction / Saenz-Mendez P., Guedes R.C., dos Santos D. J. V. A., Eriksson L.A. // *Chem. Phys. Lett.* 2007. Vol. 450. № 1-3. P. 127-131. doi: 10.1016/j.cplett.2007.10.105
47. Diekmann J. Tracing the Photoaddition of Pharmaceutical Psoralens to DNA / Diekmann J., Theves I., Thom K.A., Gilch P. // *Molecules*. 2020. Vol. 25. P. 5242. doi:10.3390/molecules25225242
48. Potapenko A.Y. New trends in photobiology: Mechanisms of photodynamic effects of furocoumarins / Potapenko A.Y. // *J. Photochem. Photobiol. B*. 1991. Vol. 9. № 1. P. 1–33.
49. Douki T. Individual Determination of the Yield of the Main UV-Induced Dimeric Pyrimidine Photoproducts in DNA Suggests a High Mutagenicity of CC Photolesions / Douki T., Cadet J. // *Biochemistry*. 2001. Vol. 40. № 8. P. 2495–2501. <https://doi.org/10.1021/bi0022543>
50. Ravanat J-L. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components / Ravanat J-L., Douki T., Cadet J. // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*. 2001. Vol. 63. P. 88–102.
51. Durbeej B. On the Formation of Cyclobutane Pyrimidine Dimers in UV-irradiated DNA: Why are Thymines More Reactive? / Durbeej B., Eriksson L.A. // *Photochem. Photobiol.* 2003. Vol. 78. № 2. P. 159-167. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2003\)0780159OTFOCP2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2003)0780159OTFOCP2.0.CO2)

- 52.Llano J. Theoretical study of phototoxic reactions of psoralens / Llano J., Raber J., Eriksson L.A. // *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*. 2003. Vol. 154. № 2-3. P. 235–243.
- 53.Joshi P. C. Production of singlet oxygen and superoxide radicals by psoralens and their biological significance / Joshi P. C., Pathak M. A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983. Vol. 112. № 2. P. 638–642.
- 54.De Mol N.J. Relation between some photobiological properties of furocoumarins and their extent of singlet oxygen production / De Mol N.J., Beijersbergen van Henegouwen G.M. // *J. Photochem. Photobiol.* 1981. Vol. 33. № 6. P. 815–819. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1981.tb05497.x>
- 55.Knox C. N. Singlet oxygen generation by furocoumarin triplet states—I. Linear furocoumarins (psoralens) / Knox C.N., Land E.J., Truscott T.G. // *Photochem. Photobiol.* 1986. Vol. 43. № 4. P. 359–363.
- 56.Poppe W. Research note photodynamic sensitization by 8-methoxypsoralen via the singlet oxygen mechanism / Poppe W., Grossweiner L.I. // *Photochem. Photobiol.* 1975. Vol. 22. № 5. P. 217–219. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1975.tb06739.x>
- 57.Ronfard-Haret J. C. Some properties of the triplet excited state of the photosensitizing furocoumarin: 3-carbethoxypsoralen / Ronfard-Haret J. C., Averbeck D., Bensasson R.V., Bisagni E., Land E.J. / *Photochem. Photobiol.* 1982. Vol. 35. № 4. P. 479–489. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1982.tb02597.x>
- 58.Wood P.D. Reactions of Psoralen Radical Cations with Biological Substrates / Wood P.D., Mnyusiwalla A., Chen L., Johnston L.J. // *Photochem. Photobiol.* 2000. Vol. 72. № 2. P. 155–162.
- 59.Mantulin W.W. Excited States of Skin-Sensitizing Coumarins and Psoralens. Spectroscopic Studies / Mantulin W.W., Song P.-S. // *J. Am. Chem. Soc.* 1973. Vol. 95. P. 5122.
- 60.Song P.-S. Luminescence spectra and photocycloaddition of the excited coumarins to DNA bases / Song P.-S., Harter M.L., Moore T.A., Herndon W.C. // *Photochem. Photobiol.* 1971. Vol. 14. № 4. P. 521–530. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1971.tb06191.x>

61. Ishikawa M. Solvation effect on the picosecond fluorescence lifetimes and anisotropy decays of a hydrogen-bonded biologically active furocoumarin derivative: 4,5',8-trimethylpsoralen / Ishikawa M. // *Chem. Phys. Lett.* 1990. Vol. 173. № 1. P. 76–82. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(90\)85306-W](https://doi.org/10.1016/0009-2614(90)85306-W)
62. Bensasson R.V. Triplet excited state of furocoumarins: reaction with nucleic acid bases and amino acids / Bensasson R.V., Land E.J., C. Salet // *Photochem. Photobiol.* 1978. Vol. 27. № 3. P. 273–280. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1978.tb07600.x>
63. Sa E Melo T. Some furocoumarins and analogs: comparison of triplet properties in solution with photobiological activities in yeast / Sa E Melo T., Averbeck D., Bensasson R.V., Land E.J., Salet C. // *Photochem. Photobiol.* 1979. Vol. 30. № 6. P. 645–651. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1979.tb07194.x>
64. Lai T. Photophysical Properties of Biologically Important Molecules Related to Proximity Effects: Psoralens / Lai T., Lim B.T., Lim E.C. // *J. Am. Chem. Soc.* 1982. Vol. 104. P. 7631.
65. Sá e Melo T. Quantification of the solvent effects on the triplet quantum yield of psoralen by the “Linear solvation energy relationship” / Sá e Melo T., Bazin M., Ronfard-Haret J.-C., Santus R. // *Photochem. Photobiol.* 1993. Vol. 58. № 1. P. 19–21. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1993.tb04897.x>
66. Sloper R.W. The triplet state of 8-methoxypsoralen / Sloper R.W., Truscott T.G., Land E.J. // *Photochem. Photobiol.* 1979. Vol. 29. № 5. P. 1025-1029. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1979.tb07808.x>.
67. Gurzadyan G.G. Excited singlet state and photoionization of 8-methoxypsoralen. Picosecond transient absorption study / Gurzadyan G.G. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2002. Vol. 1. P. 757–762. DOI: 10.1039/b206099j.
68. Bensasson R.V. Triplet, radical anion and radical cation spectra of furocoumarins / Bensasson R.V., Chalvet O., Land E.J., Ronfard-Haret J.C. // *Photochem. Photobiol.* 1984. Vol. 39. P. 287–291. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1984.tb08179.x>.

69. Serrano-Pérez J.J. A theoretical insight into the photophysics of psoralen / Serrano-Pérez J.J., Serrano-Andrés L., Merchán M. // *J. Chem. Phys.* 2006. Vol. 124. P. 124502.
70. Serrano-Pérez J.J. Quantum chemical study on the population of the lowest triplet state of psoralen / Serrano-Pérez J.J., Merchán M., Serrano-Andrés L. // *Chem. Phys. Lett.* 2007. Vol. 434. P. 107.
71. Ковальская Н.Е. Природа электронно-возбужденных состояний и фотопроцессов в молекулах псоралена и их комплексов / Ковальская Н.Е., Соколова И.В. // *Химия высоких энергий.* 2002. Т. 36. № 3. С. 224–227.
72. Tatchen J. Vibronic absorption, fluorescence, and phosphorescence spectra of psoralen: a quantum chemical investigation / Tatchen J., Marian C.M. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2006. Vol. 8. P. 2133–2144.
73. Tatchen J. Intersystem crossing driven by vibronic spin-orbit coupling: a case study on psoralen / Tatchen J., Gilka N., Marian C.M. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2007. Vol. 9. P. 5209–5221.
74. Tchaikovskaya O.N. Migration of Excitation Energy in Furocoumarins / Tchaikovskaya O.N., Dmitrieva N.G., Bocharnikova E.N., Chaidonova V.S., Avramov P.V. // *Front. Chem.* 2021. Vol. 9. P. 754950. doi: 10.3389/fchem.2021.754950
75. Straub K. Isolation and characterization of pyrimidine-psoralen photoadducts from DNA / Straub K., Kanne D., Hearst J.E., Rapoport H.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 1981. Vol. 103. № 9. P. 2347-2355.
76. Kanne D. The psoralen-DNA photoreaction. Characterization of the monoaddition products from 8-methoxypsoralen and 4,5',8-trimethylpsoralen / Kanne D., Straub K., Rapoport H., Hearst J.E. // *Biochemistry.* 1982. Vol. 21. № 5. P. 861–871. <https://doi.org/10.1021/bi00534a008>
77. Nakata A. Theoretical study on the excited states of psoralen compounds bonded to a thymine residue / Nakata A., Baba T., Takahashi H., Nakai H. // *J. Comput. Chem.* 2004. Vol. 25. P. 179–188.

78. Omar S. Interaction and photobinding between 8-methoxypsoralen and thymine / Omar S., Eriksson L.A. // *Chem. Phys. Lett.* 2009. Vol. 471. P. 128–132.
79. Huang X. A theoretical rationale why furanside monoadduct is more favorable toward diadduct formation in 8-methoxypsoralen and thymine complexes / Huang X., Zhang R. // *Photochem. Photobiol.* 2013. Vol. 89. P. 891–899.
80. Spielmann H.P. DNA structural reorganization upon conversion of a psoralen furanside monoadduct to an interstrand cross-link: Implications for DNA repair / Spielmann H.P., Dwyer T.J., Sastry S.S., Hearst J.E., Wemmer D.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. Vol. 92. P. 2345–2349.
81. Blais J. Triplet excited states of 4',5'-photomonoadducts of 3-carbethoxypsoralen and 8-methoxypsoralen with DNA nucleosides / Blais J., Ronfard-Haret J.C., Vigny P., Cadet J., Voituriez L. // *Photochem. Photobiol.* 1985. Vol. 42. № 5. P. 599–602. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1985.tb01616.x>
82. Moysan A. Chemical structure of 3-carbethoxypsoralen-DNA photoadducts / Moysan A., Gaboriau F., Vigny P., Voituriez L., Cadet J. // *Biochimie.* 1986. Vol. 68. № 6. P. 787–795. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(86\)80094-3](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(86)80094-3)
83. Woodward R.B. The Conservation of Orbital Symmetry / Woodward R.B., Hoffmann R. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 1969. Vol. 8. № 11. P. 781–853. <https://doi.org/10.1002/anie.196907811>
84. Serrano-Pérez J.J. Photoreactivity of Furocoumarins and DNA in PUVA Therapy: Formation of Psoralen-Thymine Adducts / Serrano-Pérez J.J., Merchán M., Serrano-Andrés L. // *J. Phys. Chem. B.* 2008. Vol. 112. P. 14002–14010.
85. Cadet J. Photoinduced damage to cellular DNA: Direct and photosensitized reactions / Cadet J., Mouret S., Ravanat J.L., Douki T. // *Photochem. Photobiol.* 2012. Vol. 88. P. 1048–1065.
86. Schreier W.J. Early Events of DNA Photodamage / Schreier W.J., Gilch P., Zinth W. // *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2015. Vol. 66. P. 497–519.
87. Liu L. Quantum Yield of Cyclobutane Pyrimidine Dimer Formation Via the Triplet Channel Determined by Photosensitization / Liu L., Pilles B.M., Gontcharov J., Bucher D.B., Zinth W. // *J. Phys. Chem. B.* 2016. Vol. 120. P. 292–298.

88. Anselmino C. Characterization of the cis-syn and cis-anti Diastereoisomers of 5-Methoxypsoralen Pyrone-Side Monocycloadducts to Thymidine / Anselmino C., Voituriez L., Cadet J. // *Chem. Res. Toxicol.* 1993. Vol. 6. P. 858–865.
89. Caffieri S. Structure of a psoralen—linolenic acid methyl ester photocycloadduct / Caffieri S., Lefeber A.W.M., Dall'Acqua F., van Henegouwen G.M. J.B. // *J. Photochem. Photobiol. B.* 1990. Vol. 7. № 2–4. P. 347–352. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(90\)85167-U](https://doi.org/10.1016/1011-1344(90)85167-U)
90. Cadet J. Photoreactions of furocoumarins with biomolecules / Cadet J., Vigny P., Midden W.R. // *J. Photochem. Photobiol. B.* 1990. Vol. 6. № 1–2. P. 197–206. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(90\)85090-J](https://doi.org/10.1016/1011-1344(90)85090-J)
91. Dall'Acqua F. Photosensitizing action of furocoumarins on membrane components and consequent intracellular events / Dall'Acqua F., Martelli P. // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* 1991. Vol. 8. № 3. P. 235–254. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(91\)80082-S](https://doi.org/10.1016/1011-1344(91)80082-S)
92. Zarębska Z. New trends in photobiology: Cell membrane, a target for PUVA therapy / Zarębska Z. // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* 1994. Vol. 23. № 2–3. P. 101–109. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(94\)06944-1](https://doi.org/10.1016/1011-1344(94)06944-1)
93. Zarębska Z. Photoreactions of psoralens with lecithins / Zarębska Z., Waszkowska E., Caffieri S., Dall'Acqua F. // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* 1998. Vol. 45. № 2–3. P. 122–130. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00170-5](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00170-5)
94. Li X.Y. Photoreaction of Skin-sensitizing Trimethyl Psoralen with Lipid Membrane Models / Li X.Y., Eriksson L.A. // *Photochem. Photobiol.* 2005. Vol. 81. № 5. P. 1153–1160. <https://doi.org/10.1562/2005-03-21-RA-467>
95. Bordin F. Furocoumarin sensitization induces DNA-protein cross-links / Bordin F., Carlassare F., Busulini L., Baccichetti F. // *Photochem. Photobiol.* 1993. Vol. 58. № 1. P. 133–136. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1993.tb04914.x>
96. dos Santos D.J. V.A. Properties and behaviour of tetracyclic allopsoralen derivatives inside a DPPC lipid bilayer model / dos Santos D.J. V.A., Saenz-Méndez P., Eriksson L.A., Guedes R.C. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011. Vol. 13. P. 10174–10182.

97. Böhm F. PUVA therapy damages psoriatic and normal lymphoid cells within milliseconds / Böhm F., Meffert H., Bauer E. // *Arch. Dermatol. Res.* 1986. Vol. 279. P. 16–19. <https://doi.org/10.1007/BF00404352>
98. van Henegouwen G.M.B. A method for the determination of PUVA-induced in vivo irreversible binding of 8-methoxypsoralen (8-MOP) to epidermal lipids, proteins and DNA/RNA / van Henegouwen G.M.B., Wijn E.T., Schoonderwoerd S.A., Dall'Acqua F. // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* 1989. Vol. 3. № 4. P. 631–635. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(89\)80086-7](https://doi.org/10.1016/1011-1344(89)80086-7)
99. Blan Q.A. Singlet oxygen generation by furocoumarins: effect of DNA and liposomes / Blan Q.A., Grossweiner L.I. // *Photochem. Photobiol.* 1987. Vol. 45. P. 177–183. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1987.tb05361.x>,
100. Land E.J. Triplet excited state of coumarin and 4'5' dihydro-psoralen: reaction with nucleic acid bases and amino acids / Land E.J., Truscott T.G. // *Photochem. Photobiol.* 1979. Vol. 29. P. 861–866. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1979.tb07783.x>
101. Paul S. Ground- and Excited-State Interactions of a Psoralen Derivative with Human Telomeric G-Quadruplex DNA / Paul S., Samanta A. // *J. Phys. Chem. B.* 2018. Vol. 122. P. 2277–2286. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b12475>.
102. Wood P.D. Generation and characterization of psoralene radical cations / Wood P.D., Johnston L.J. // *Photochem. Photobiol.* 1997. Vol. 66. P. 642–648.
103. Wood P.D. Photoionization and Photosensitized Electron-Transfer Reactions of Psoralens and Coumarins / Wood P.D., Johnston L.J. // *J. Phys. Chem. A.* 1998. Vol. 102. P. 5585–5591.
104. Buglak A.A. Triplet state generation by furocoumarins revisited: a combined QSPR/DFT approach / Buglak A.A., Kononov A.I. // *New Journal of Chemistry.* 2018. Vol. 42. № 17. P. 14424–14432. <https://doi.org/10.1039/C8NJ03002B>
105. Bertling J. Synthesis and Photophysics of Water-Soluble Psoralens with Red-Shifted Absorption / Bertling J., Thom K.A., Geenen S., Jeuken H., Presser L., Müller T.J.J., Gilch P. // *Photochemistry and Photobiology.* 2021. Vol. 97. P. 1534–1547. DOI: 10.1111/php.13480.

106. Bordin F. DNA damage induced by 4,6,8,9-tetramethyl- 2*H*-furo[2,3-*h*]quinolin-2-one, a new furocoumarin analog: photochemical mechanism / Bordin F., Baccichetti F., Marzano C., Carlassare F., Miolo G., Chilin A., Guiotto A. // Photochem. Photobiol. 2000. Vol. 71. P. 254–262.
107. Marzano C. DNA damage and biological effects induced by photosensitization with new N1-unsubstituted furo[2,3-*h*]quinolin-2(1*H*)-ones / Marzano C., Chilin A., Bordin F., Baccichetti F., Guiotto A. // Bioorg. Med. Chem. 2002. Vol. 10. № 9. P. 2835–2844. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(02\)00145-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(02)00145-1)
108. Chilin A. Synthesis and Biological Evaluation of a New Furo[2,3-*h*]quinolin-2(1*H*)-one / Chilin A., Marzano C., Guiotto A., Baccichetti F., Carlassare F., Bordin F. // J. Med. Chem. 2002. Vol. 45. № 5. P. 1146–1149. <https://doi.org/10.1021/jm010993r>
109. Pryor W.A. Comparison of the Efficiencies of Several Natural and Synthetic Antioxidants in Aqueous Sodium Dodecyl Sulfate Micelle Solution / Pryor W.A., Strickland T., Church D.F. // J. Am. Chem. Soc. 1988. Vol. 110. P. 2224–2229.
110. Taimr L. Antioxidants and stabilizers, CXIII. Oxidation products of the antidegradant ethoxyquin / Taimr L., Prusikova M., Pospisil J. // Angew. Makromol. Chem. 1991. Vol. 190. № 1. P. 53–65. <https://doi.org/10.1002/apmc.1991.051900104>
111. Thorisson S. Some oxidation products of ethoxyquin including those found in autoxidising systems / Thorisson S., Gunstone F.D., Hardy R. // Chem. Phys. Lipids. 1992. Vol. 60. № 3. P. 263–271. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(92\)90078-4](https://doi.org/10.1016/0009-3084(92)90078-4)
112. Pospisil J. Aromatic and Heterocyclic Amines in Polymer Stabilization / Pospisil J. // Adv. Pol. Sci. 1995. Vol. 124. P. 87–189.
113. Skaare J.U. Studies on the metabolism of the antioxidant ethoxyquin, 6-ethoxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline in the rat / Skaare J.U., Solheim E. // Xenobiotica. 1979. Vol. 11. P. 649–657.
114. Skaare J.U. Studies on the biliary excretion and metabolites of the antioxidant ethoxyquin, 6-ethoxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline in the rat / Skaare J.U. // Xenobiotica. 1979. Vol. 11. P. 659–668.

115. Некипелова Т.Д. Превращение 1,2-дигидрохинолинов под действием света: раскрытие гетероцикла, образование радикалов и реакции фотоиндуцированного переноса протона / Некипелова Т.Д., Кузьмин В.А. // Успехи химии. 2012. Т. 81. № 11. С. 983–993.
116. Пирогов Н.О. Фотодиссоциация связи NH из высших триплетных состояний 1,2-гидрохинолинов / Пирогов Н.О., Малкин Я.Н., Кузьмин В.А. // Докл. АН СССР. 1982. Т. 264. С. 636.
117. Malkin Ya.N. Primary Photochemical and Photophysical Processes in 2,2,4-Trimethyl-1,2-dihydroquinolines / Malkin Ya.N., Pirogov N.O., Kuzmin V.A. // J. Photochemistry. 1984. Vol. 26. P. 193–203.
118. Кузьмин В.А. Синтез и антиоксидантные свойства 7,7,9-триметил-6,7-дигидрофуоро[3,2-*f*] хинолина / Кузьмин В.А., Мазалецкая Л.И., Некипелова Т.Д., Ходот Е.Н. // Известия Акад. наук. Сер. хим. 2008. № 11. С. 2356–2360.
119. Ходот Е.Н., Кузьмин В.А. и др. // Патент РФ 2614248.2016.
120. Ходот Е.Н. Исследование фототоксического эффекта новых замещенных производных фурудигидрохинолина – потенциальных средств для фототерапии псориаза / Ходот Е.Н., Шевелев А.Б., Шibaева А.В., Смирнова М.С., Позднякова Н.В., Рябая О.О., Богданова Е.С., Гусева М.А., Волнухин В.А., Кузьмин В.А. // Биоорг. химия. 2020. Т. 46. №. 2. С. 189–200. DOI: 10.31857/S0132342320020116.
121. Кузьмин В.А. Фурудигидрохинолины – 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. // Хим. физика. 2019. Т 38. № 12. С. 3–10. DOI: 10.1134/S0207401X19120124
122. Лыго О.Н. Спектрально-люминесцентные свойства и фотохимические превращения 7,7,9-триметил-6,7-дигидрофуоро[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.

123. **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.
124. Некипелова Т.Д. Превращения радикалов при фотолизе 2,2-диметилдигидрохинолинов/ Некипелова Т.Д., Малкин Я.Н., Кузьмин В.А. // *Изв. Акад. наук СССР. Сер. хим.* 1980. № 1. С. 80–86.
125. Некипелова Т.Д. Влияние растворителя на спектральные характеристики и квантовые выходы фотолиза алкилзамещенных 1,2-дигидрохинолинов / Некипелова Т.Д., Шишков В.С. // *Химия высоких энергий*. 2004. Т. 38. № 5. С. 355–363.
126. Laikov D.N. Fast evaluation of density functional exchange-correlation terms using the expansion of the electron density in auxiliary basis sets / Laikov D.N. // *Chem. Phys. Lett.* 1997. Vol. 281. № 1–3. P. 151–156. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(97\)01206-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(97)01206-2)
127. Лыго О.Н. Влияние длины волны возбуждения и строения нитропроизводных 1,2-дигидрохинолинов на динамику первичных фотофизических и фотохимических процессов / Лыго О.Н., Шелаев И.В., Гостев Ф.Е., Некипелова Т.Д., Ходот Е.Н., Центалович Ю.П., Титов А.А., Кузьмин В.А., Саркисов О.М. // *Химия высоких энергий*. 2013. Т. 47. № 5. С. 357–364.
128. Некипелова Т.Д. Первичные фотофизические и фотохимические процессы при фотолизе 1,2-дигидрохинолинов в различных растворителях / Некипелова Т.Д., Кузьмин В.А. // *Химия высоких энергий*. 2005. Т. 39. № 6. С. 449–454.
129. Некипелова Т.Д. Механизм фотоиндуцированного присоединения воды и метанола к двойной связи 1,2-дигидрохинолинов / Некипелова Т.Д., Кузьмин В.А., Шишков В.С. // *Химия высоких энергий*. 2002. Т. 36. С. 212–218.
130. Некипелова Т.Д. Образование хинолинового производного при взаимодействии 6-этоксидигидрохинолина с кислородом / Некипелова Т.Д., Гагарина А.Б. // *Докл. АН СССР*. 1976. Т. 231. С. 392–395.

131. Некипелова Т.Д. Спектрально-кинетические характеристики триплетного состояния 7,7,9-триметил-6,7-дигидрофуоро[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.
132. Shafirovich V.Y. Photoinduced electron transfer and enhanced triplet yields in benzo(a)pyrene derivative – nucleic acid complexes and covalent adducts / Shafirovich V.Y., Levin P.P., Kuzmin V.A., Thorgeirsson T.E., Kliger D.S., Geacintov N.E. // J. Am. Chem. Soc. 1994. Vol. 116. P. 63–72.
133. El-Sayed M.A. Spin–Orbit Coupling and the Radiationless Processes in Nitrogen Heterocyclics / El-Sayed M.A. // J. Chem. Phys. 1963. Vol. 38. № 12. P. 2834. <https://doi.org/10.1063/1.1733610>
134. Лыго О.Н. Реакция фотоциклоприсоединения между 7,7,9-триметил-6,7-дигидрофуоро[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.