

**“Дианинови багрила. Синтетични подходи,
фотофизични свойства и изследване на различни
хромофорни системи като потенциални биомаркери“**

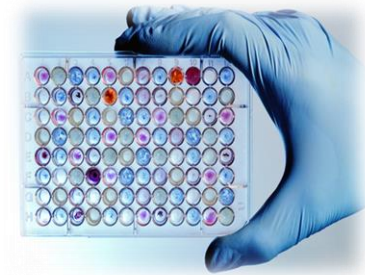
ас. д-р Атанас Курутос

София, 2018 г.

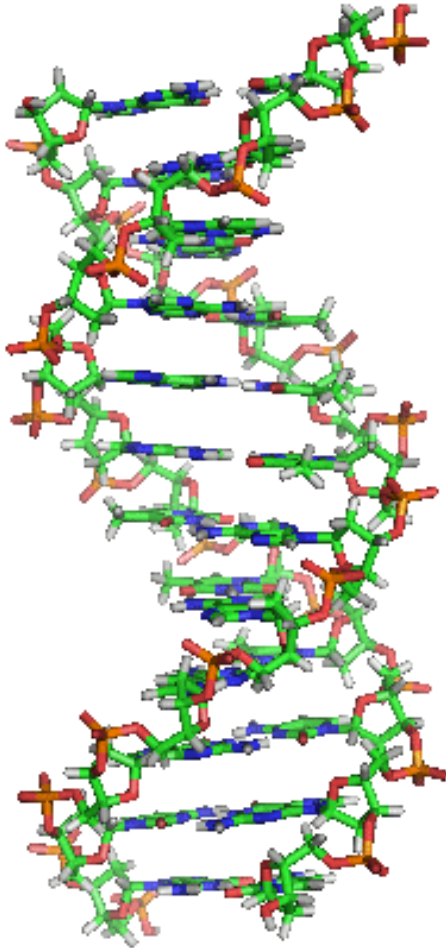
Цианинови багрила и тяхното приложение



- Фотографията, текстилната област и козметиката
- Технология за CD и DVD (Taiyo Yuden Co., Ltd.)
- Биомаркери (ДНК, РНК, протеини, липозоми)



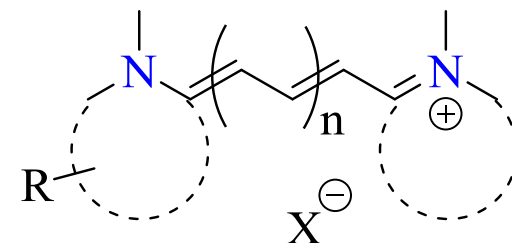
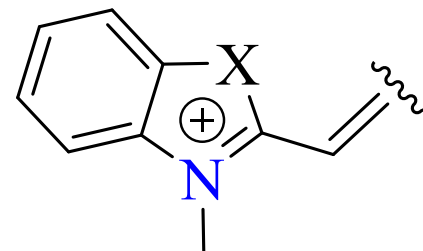
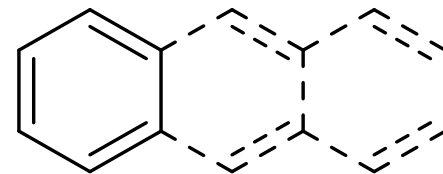
Предимства на цианиновите багрила - биомаркиране



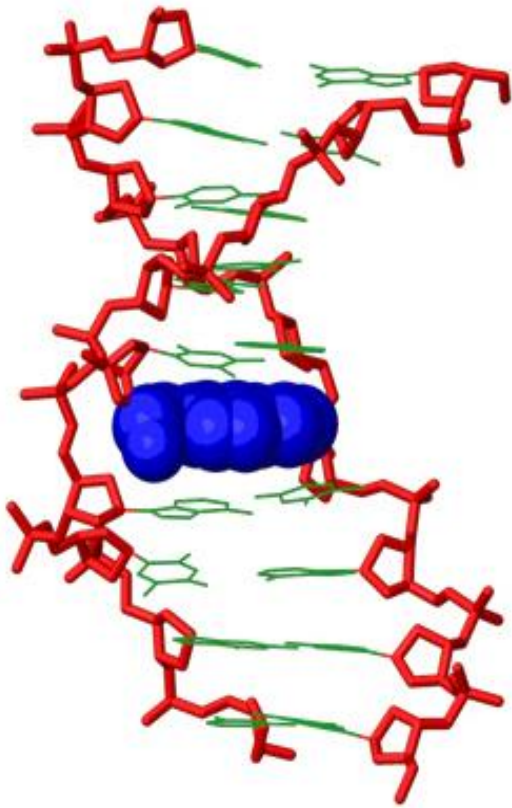
- Абсорбционни максимуми ($\lambda_{\max} \sim 400-900 \text{ nm}$).
- Моларна абсорбируемост $\varepsilon > 50.000 \text{ (mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}\text{)}$.
- Не се наблюдава припокриване с $\lambda_{\text{DNA}} (\sim 260 \text{ nm})$.
- Висока селективност към различни биообекти.
- Висока специфичност на взаимодействие.
- Спонтанно биокомплексобразуване ($t_{\text{inc.}} > 2 \text{ min}$).
- образуване на стабилни биокомплекси ($K_s = 10^6-10^9$).
- Ниска цитотоксичност (в сравнение с Ethidium Bromide).

Химична структура: Определящи фактори за биомаркиране

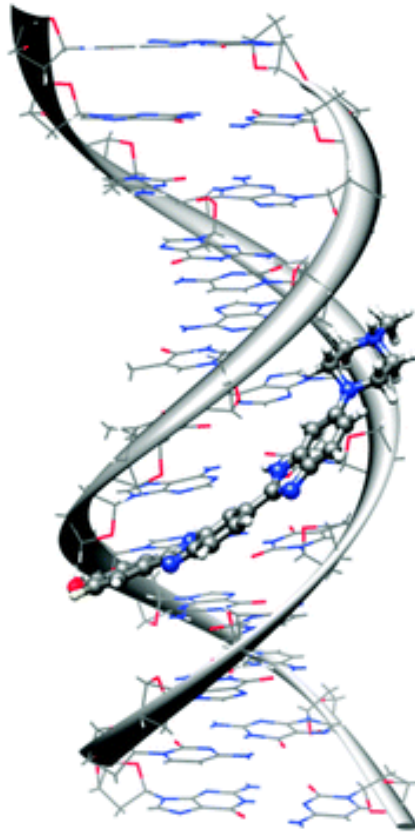
- Брой ароматни ядра
- Брой и тип хетероатоми ... $X = N, O, S, Se$
- Полиметиновата верига ... $n = 1, 3, 5 \dots$
- Разположение на заместители ... R
- Брой положителни заряди ... (+)
- Флуоресцентен квантов добив ... Q_f
- Моларна абсорбируемост ... ϵ
- Склонност към образуване на агрегати ...



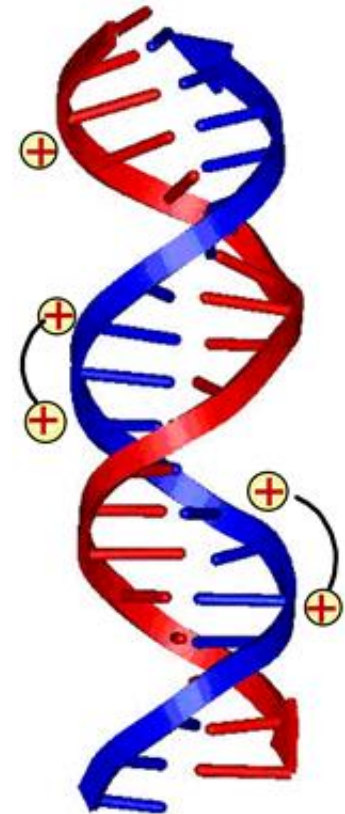
Видове взаимодействия с двойно-верижни спирали



Проникване между
съседни двойки бази
Intercalation

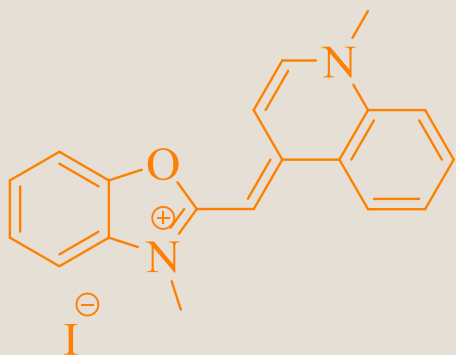


Взаимодействие с
малка бразда
minor groove binding

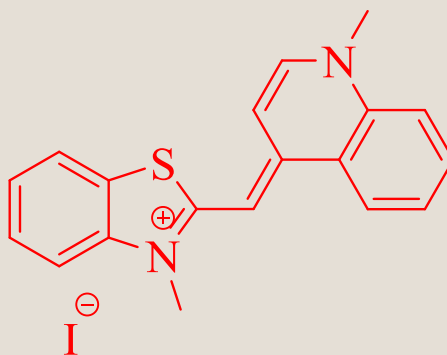


Електростатични
взаимодействия с
фосфатни остатъци

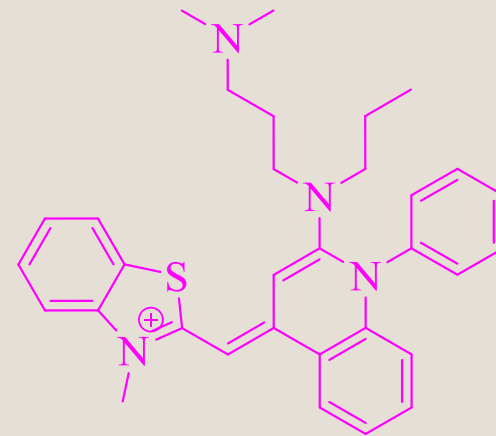
Част I. Монометин цианинови багрила



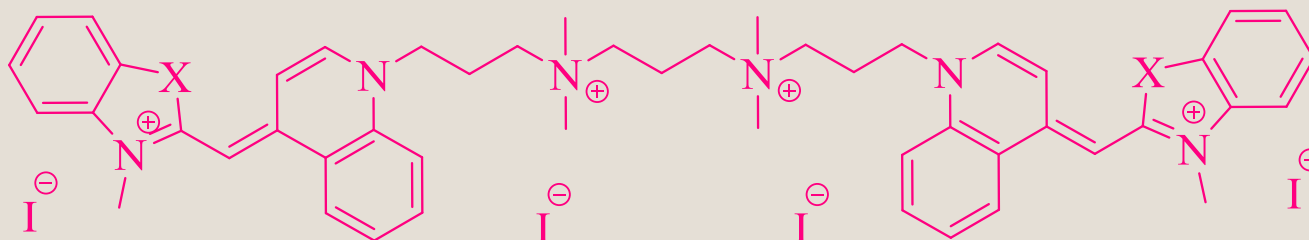
Oxazole Yellow (YO)



Thiazole Orange (TO)



SYBR Green 1

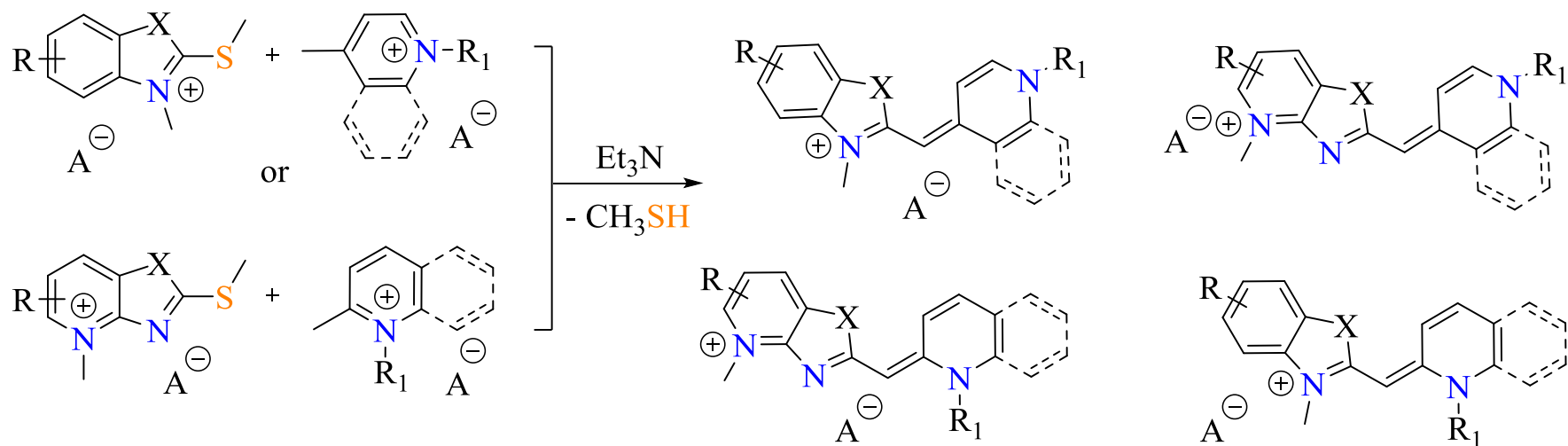


YOYO-1 : X = O

TOTO-1 : X = S

SOSO-1 : X = Se

Получаване на монометинцианинови багрила по Brooker



$\text{R} = \text{CH}_3, \text{Cl}, \text{F}, \text{NHCOCH}_3, \text{NHCOC}_6\text{H}_5$

$\text{R}_1 = \text{alkyl}, \text{aryl}, \text{alkylamino}, \text{alkoxy}$

$\text{X} = \text{O}, \text{S}$ $\text{A} = \text{anion}$

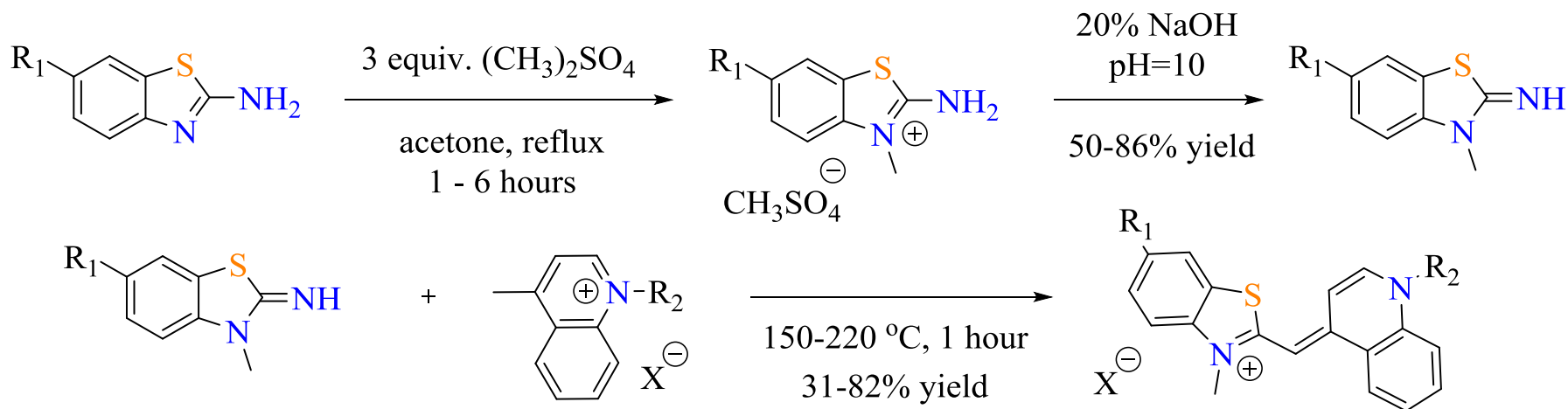
Предимства:

- ☺ Високи добиви
- ☺ Реакция при стайна температура
- ☺ Кратки реакционни времена (2-3 часа)

Недостатъци:

- ☹ отделяне на CH_3SH
(токсичен страничен продукт)

Модифицирани синтетични подходи 1



$\text{R}_1 = \text{H, Cl, NO}_2, \text{CH}_3\text{O, CH}_3\text{CONH, HOCH}_2\text{CH}_2\text{O} \quad / \quad \text{R}_2 = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{C}_2\text{H}_4\text{OH} \quad / \quad \text{X} = \text{CH}_3\text{SO}_4, \text{ClO}_4, \text{Br, I}$

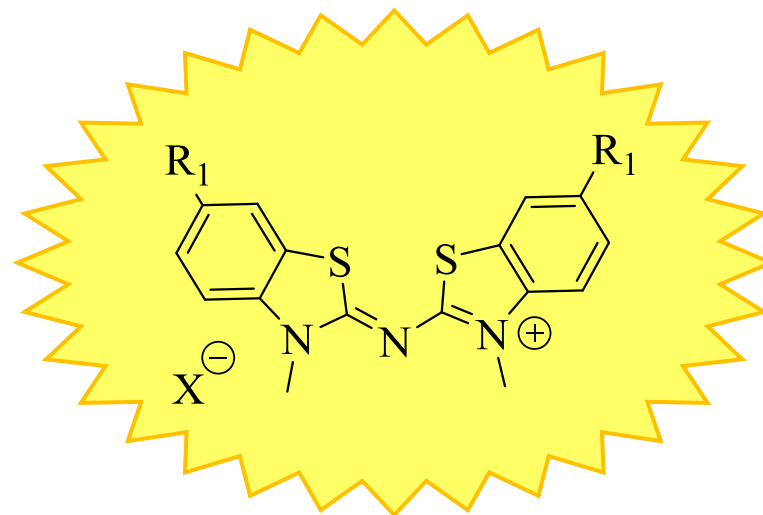
Dyes Pigments, (1995), 29, 315-3220

Предимства:

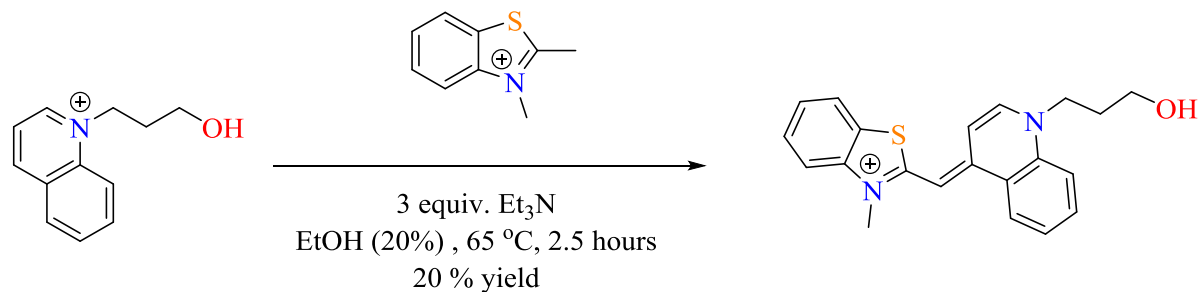
- ☺ Реакционно време = 1 час
- ☺ Умерени до високи добиви
- ☺ Не се отделя токсичен CH_3SH

Недостатъци:

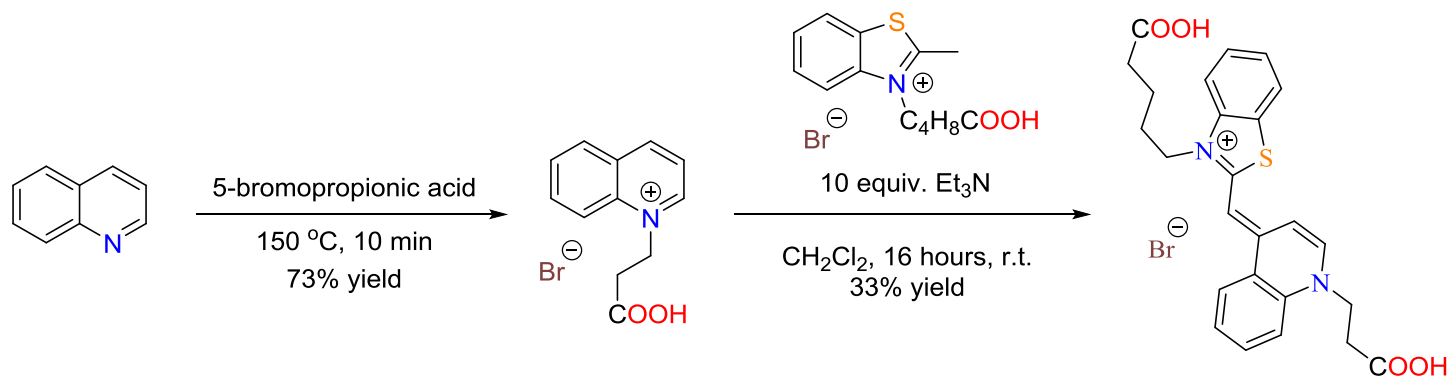
- ☹ Образуване на странични продукти (симетрични азаметинови багрила)



Модифицирани синтетични подходи 2



J. Org. Chem., (2008), 73, 4263-4266



Org. Biomol. Chem., (2012), 11, 362-371

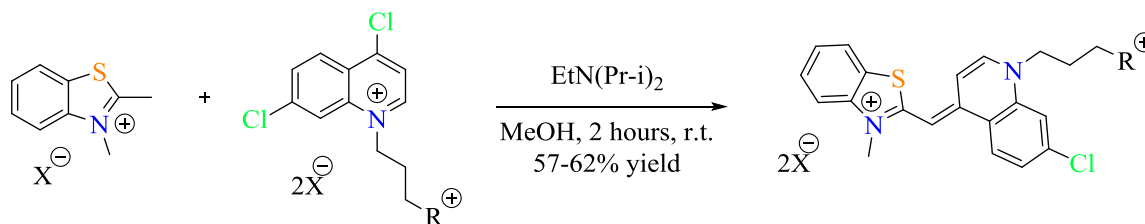
Предимства:

- ☺ Реакцията при стайна температура
- ☺ Не се отделя токсичен CH₃SH

Недостатъци:

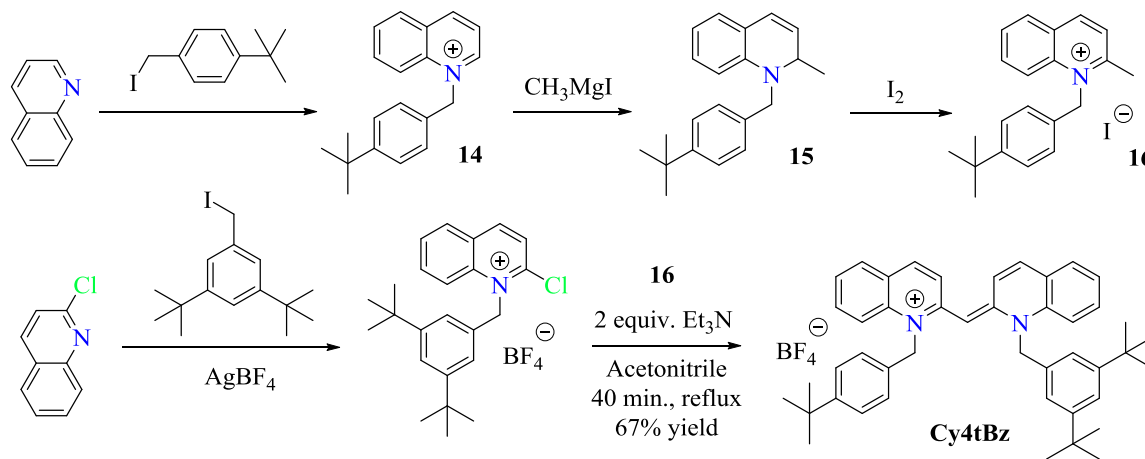
- ☹ **Ниски добиви !!!**

Модифицирани синтетични подходи 3



R = 1-methylpyrrolidine, 4-methylmorpholine, pyridine, 3-(N,N-dimethylamino)propan-1-ol
 X = Br, I

Dyes Pigments, (2010), 86, 133-142



J. Am. Chem. Soc., (1998), 120 (8), 1705-1717

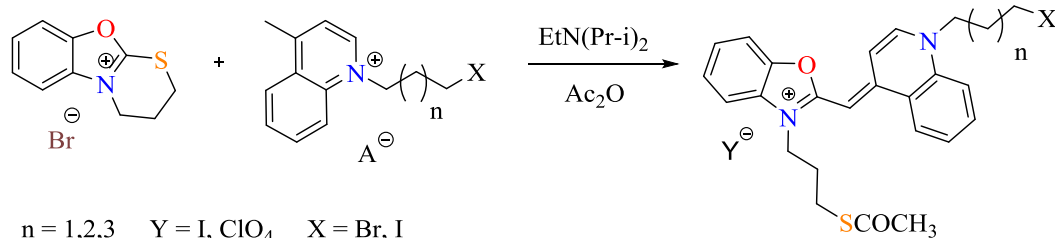
Предимства:

- ☺ Реакционно време = 2 часа
- ☺ Не се отделя токсичен CH_3SH
- ☺ Реакция при стайна температура

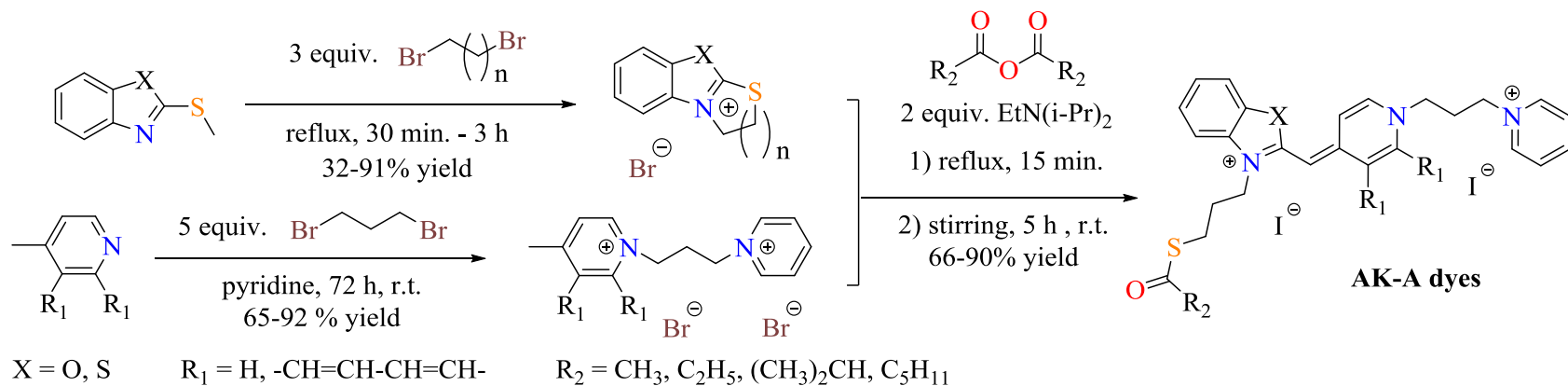
Недостатъци:

- ☹ Получаване на странични продукти
(трудно пречистване)

Модифицирани синтетични подходи 4



Dyes Pigments, (2007), 72, 28-32



Dyes Pigments, (2018), 148, 452-459

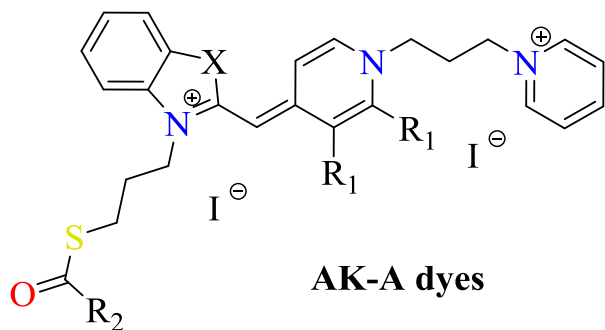
Предимства:

- ☺ Реакция при стайна температура
- ☺ Умерени до високи добиви
- ☺ Не се отделя токсичен CH_3SH

Недостатъци:

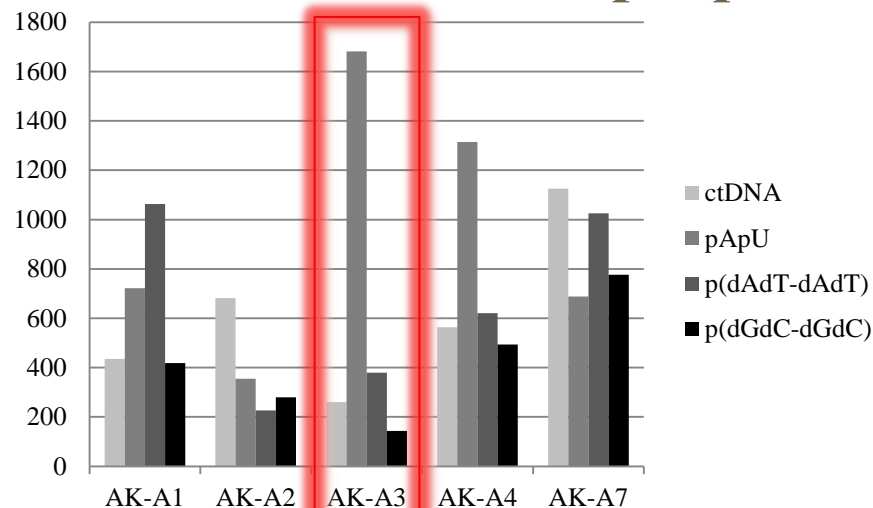
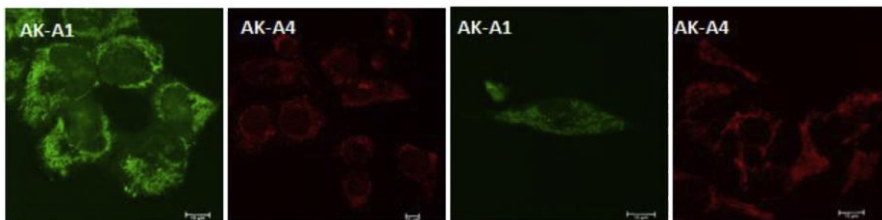
- ☹ Повишено реакционно време (8 часа)

Цианинови багрила– ДНК / РНК селективни маркери



HeLa cell line

HEK 293 cell line

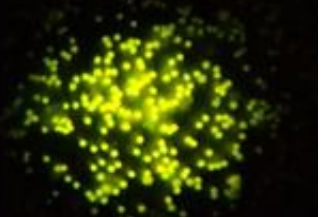
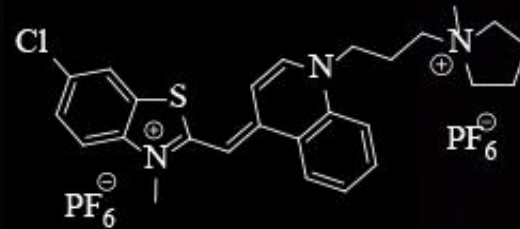
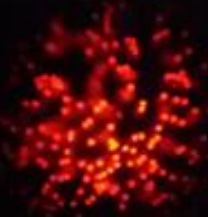
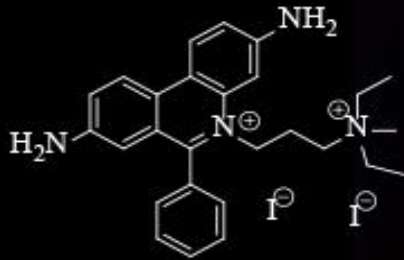
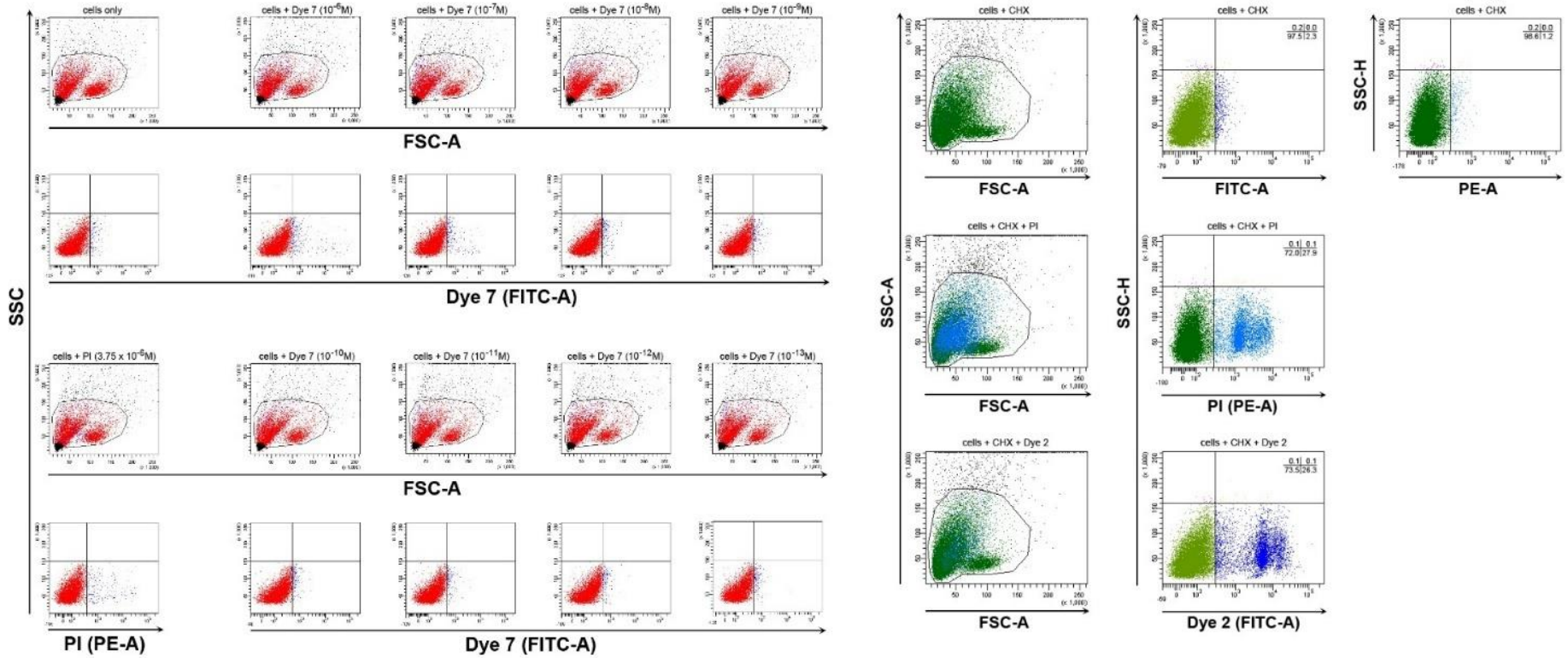


Dyes Pigments, (2018), 148, 452-459

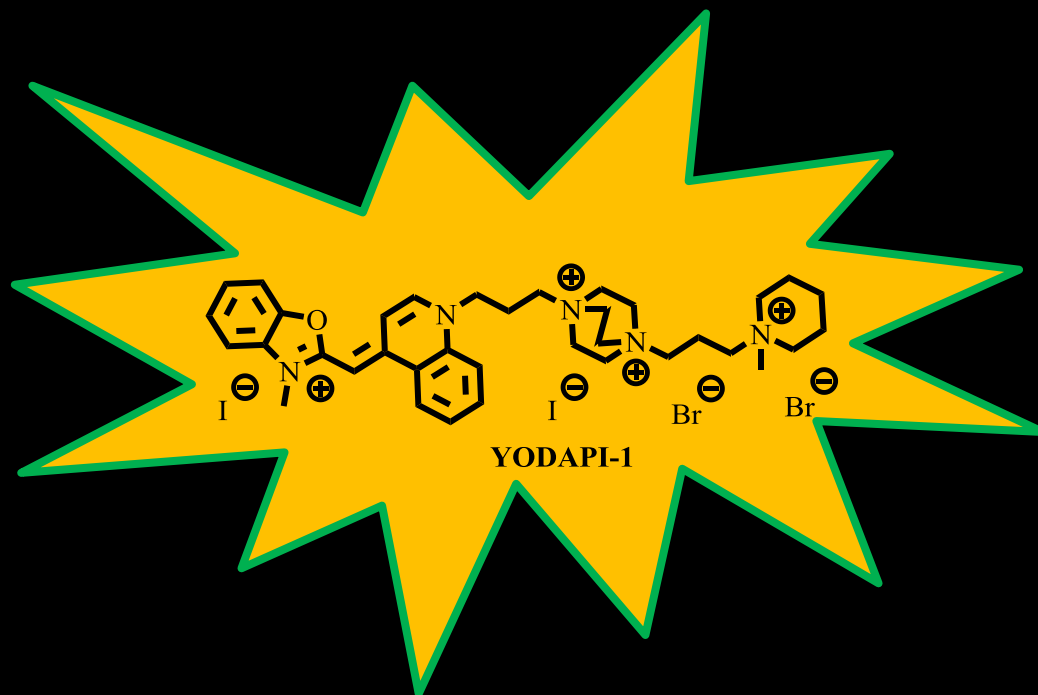
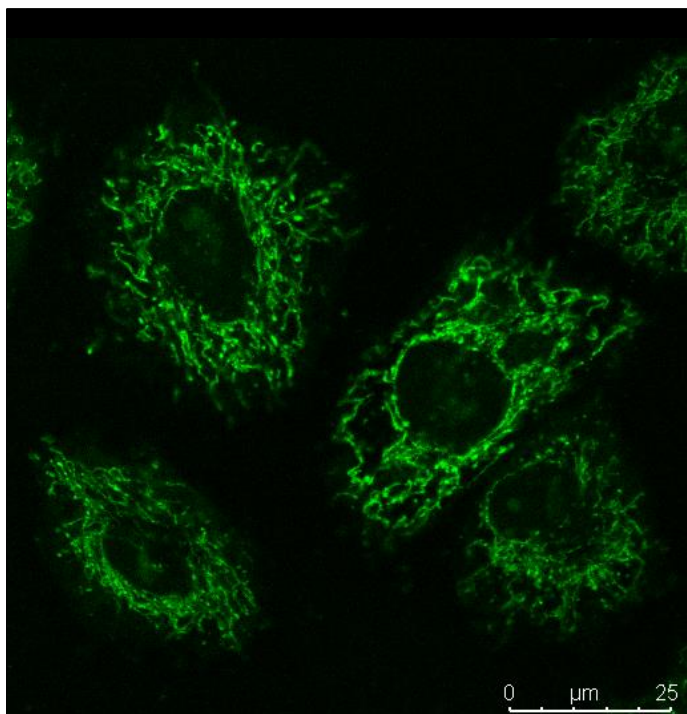
HEK293 = Human embryonic kidney cells
HeLa cells (Henrietta Lacks) = cervical cancer

Съединение	X	R ₁	R ₂	ctDNA	log K _s		
					p(dAdT) ₂	p(dGdC) ₂	pApU
AK-A1	O	-CH=CH-CH=CH-	(CH ₃) ₂ CH	5.33	5.37	6.41	6.11
AK-A2	S	H	CH ₃	6.89	5.44	6.08	5.63
AK-A3	S	H	(CH ₃) ₂ CH	5.51	6.91	5.93	5.30
AK-A4	S	-CH=CH-CH=CH-	C ₂ H ₅	5.90	5.50	5.40	5.18
AK-A7	O	-CH=CH-CH=CH-	C ₅ H ₁₁	5.44	5.17	5.87	5.09

Визуализиране на мъртви клетки и проследяване на апоптоза



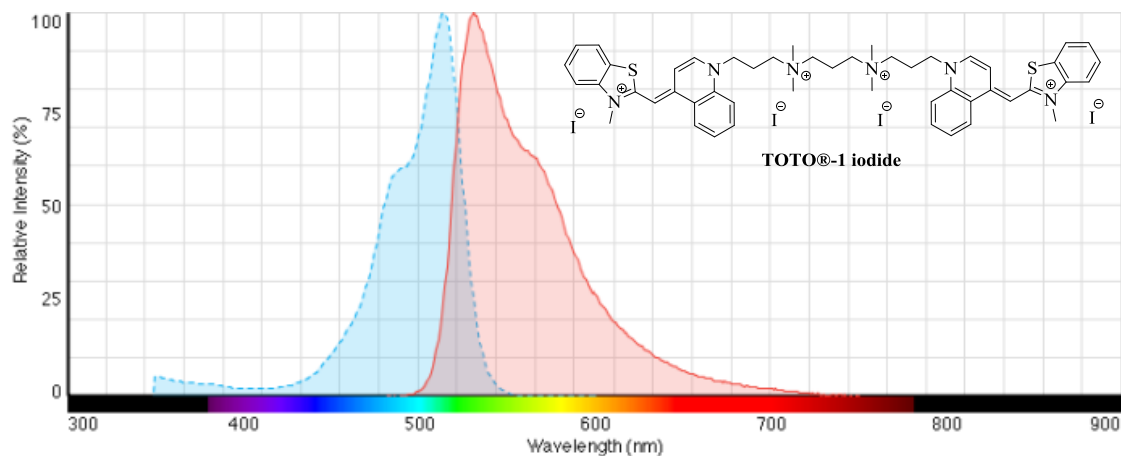
Конфокална микроскопия – маркиране на митохондрии



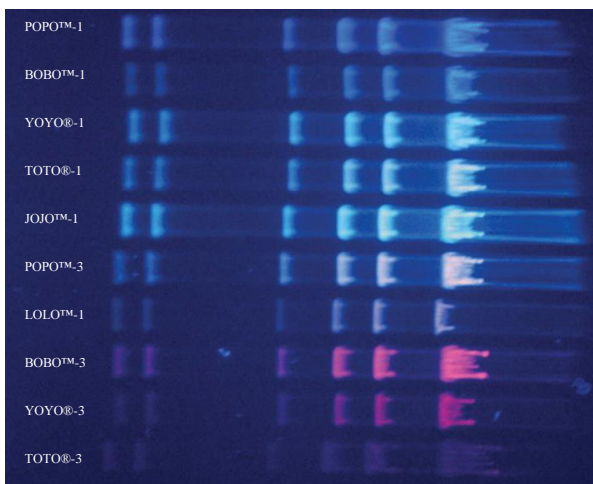
(Какодилатен буфер, pH=7, C = 0.05 M)

Полинуклеотиди	I/I ₀ (λ _{fl})	Log K _s (r=0.01)	ΔT _m (r = 0.05)
ct-DNA	31 (509nm)	7.33	*
поли rA-поли rU	31 (509nm)	7.23	24.3
поли (dA-dT) ₂	215 (509nm)	7.75	26.1
поли (dGdC) ₂	85 (508nm)	8.04	-

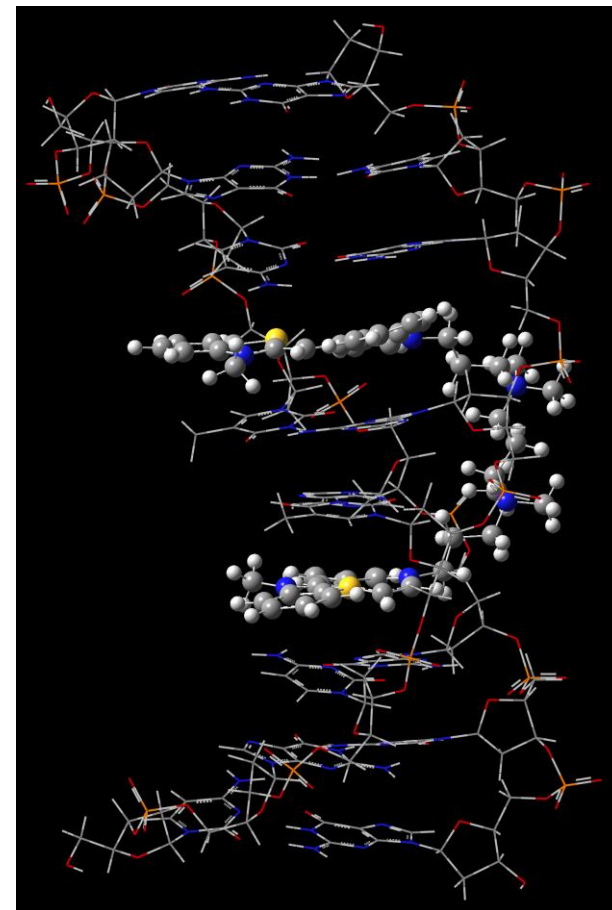
Взаимодействие с ДНК / РНК – Интеркалиране



ThermoFisher
SCIENTIFIC

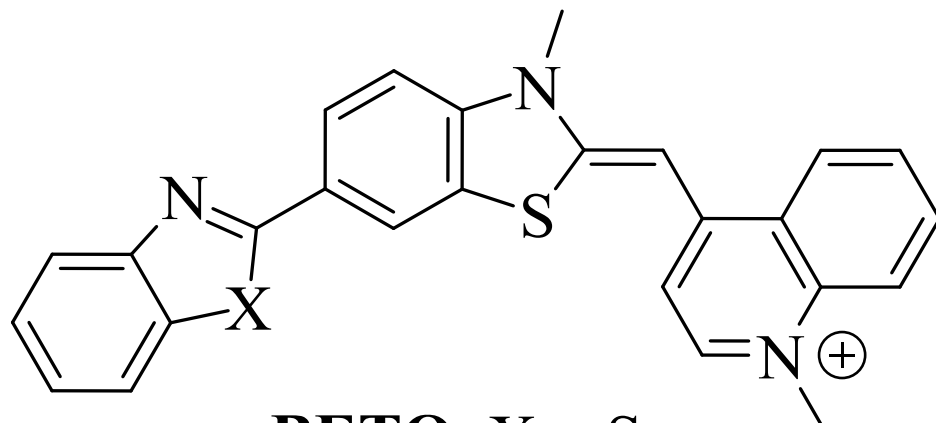


Съединение	λ_{\max} (nm)	λ_{π} (nm)	ϵ ($\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$)
POPO™-1	434	456	92.400
BOVO™-1	462	481	113.600
YOYO®-1	491	509	98.900
TOTO®-1	514	533	117.000
JOJO™-1	529	545	171.400
POPO™-3	534	570	146.400
LOLO™-1	565	579	108.400
BOVO™-3	570	602	147.800
YOYO®-3	612	631	167.000
TOTO®-3	642	660	154.100



PDB-108D:
Biochemistry, (1995) 34, 8542-8553

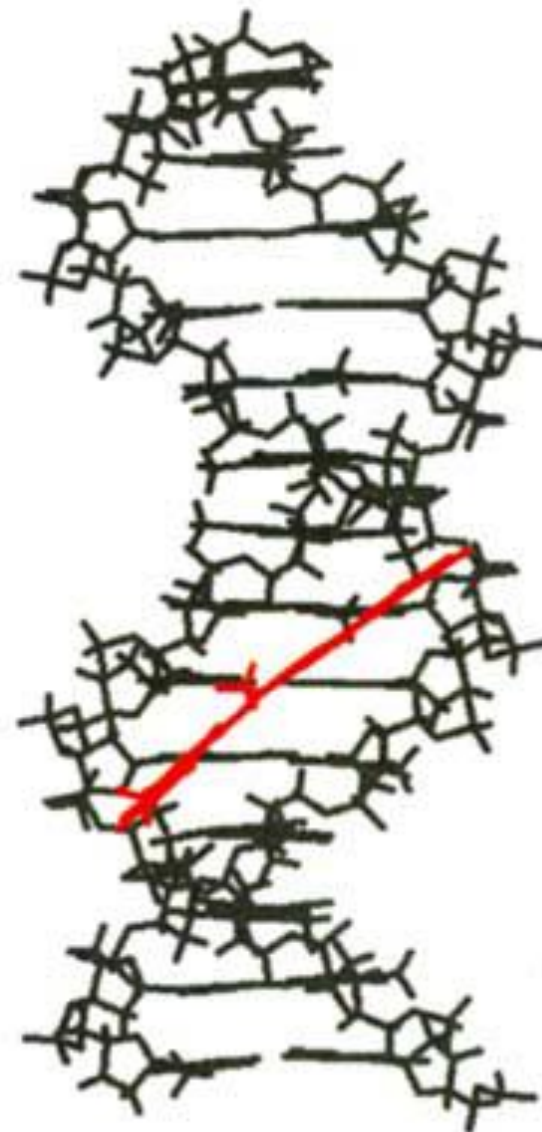
Взаимодействие на цианинови багрила с малката бразда



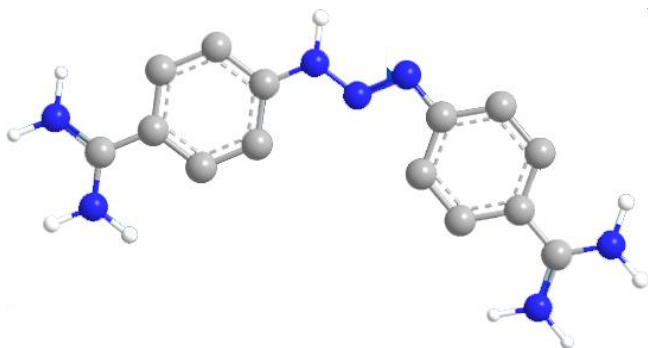
ВЕТО: X = S
ВОХТО: X = O

Bioorganic & Medicinal Chemistry, (2004), 12, 2369-2384

Съединение	λ_{\max} (nm)	λ_{fl} (nm)	Мотив на свързване
ВЕТО	516	561	Minor groove (димер)
ВОХТО	515	552	Minor groove (мономер)

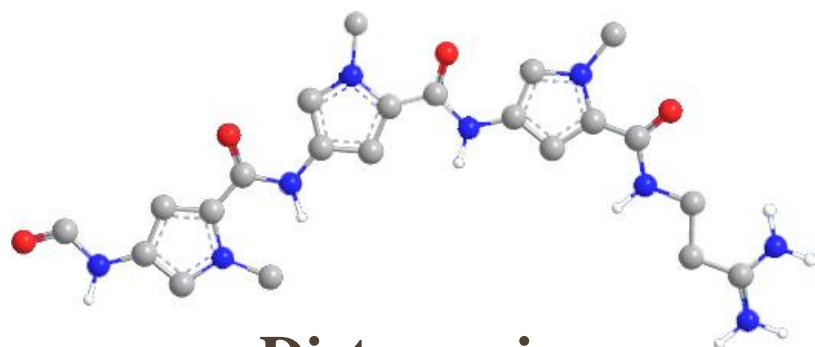
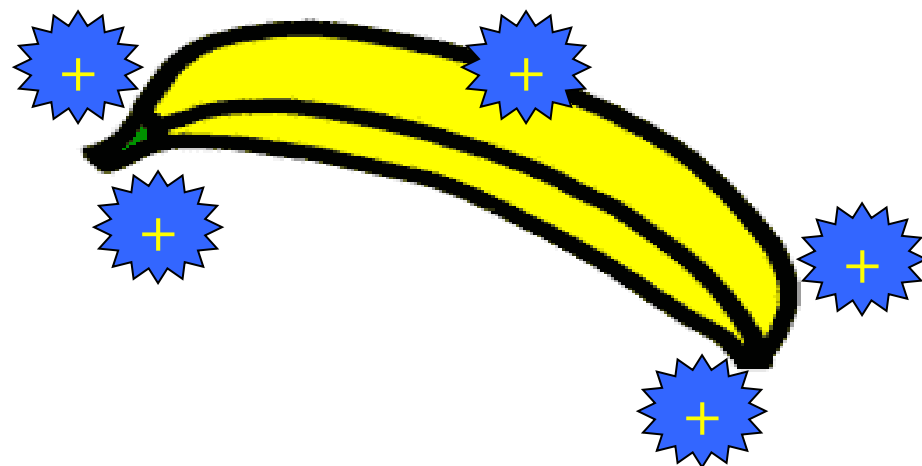


Взаимодействие с малката бразда – minor groove binding



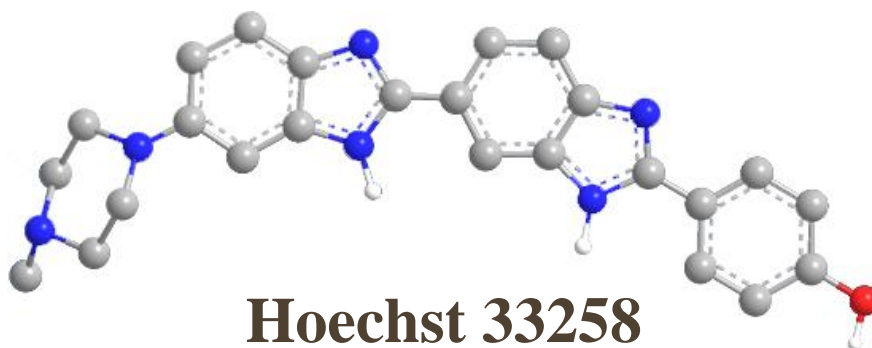
Diminazen

(anti-infective medication for animals)



Distamycin

(antibiotic)

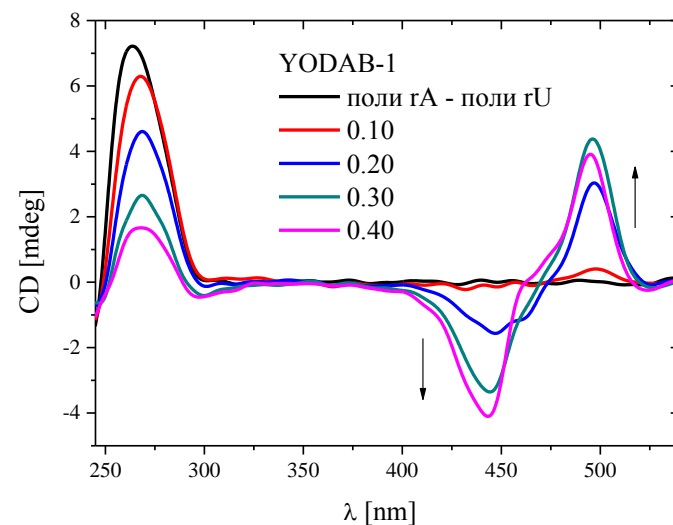
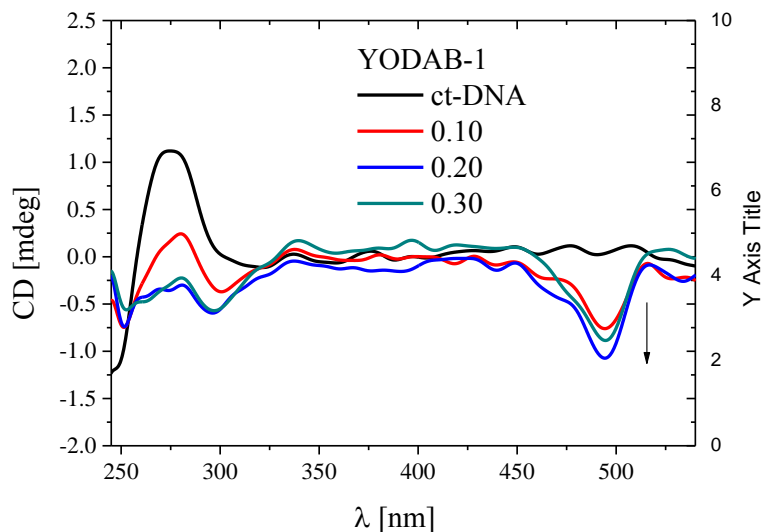


Hoechst 33258

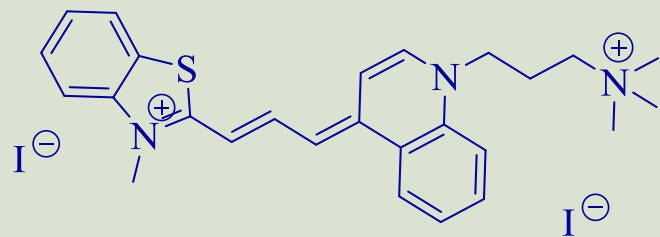
(fluorescent DNA stain)

Методи за установяване на вида на взаимодействие

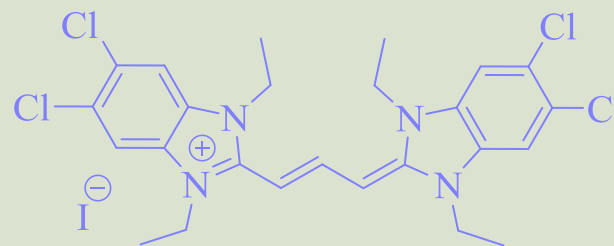
- Вискозиметрия ... интеркалаторите водят до повишаване (η).
- Константи на свързване $K_s \dots > 10^6$ (характерно за интеркалатори).
- T_m на биокомплекса ... стабилизиране на двойно верижната спирала.
- r [багрило][полинуклеотиди] ... ≤ 0.25 (интеркалация) , ≥ 0.25 (groove binding).
- Кръгов дихроизъм (CD) ... ориентация на сигнала (отрицателен, дв. индуциран, няма)



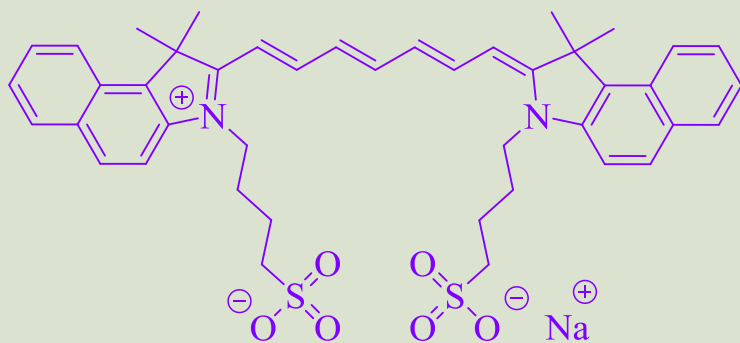
Част II. Полиметинови багрила



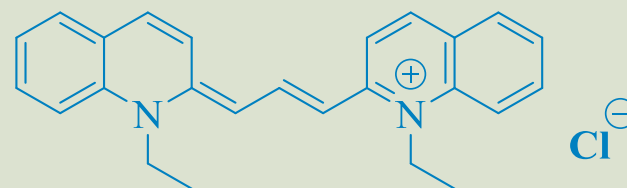
TO-PRO-3



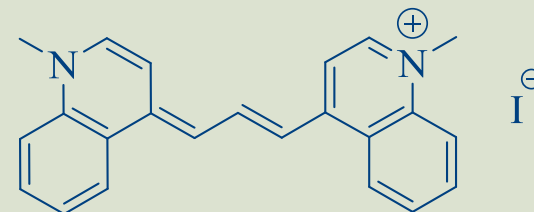
JC-1



Indocyanine green (IR-125)

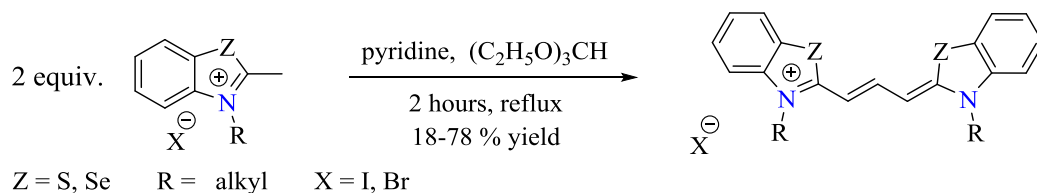


pynacyanol

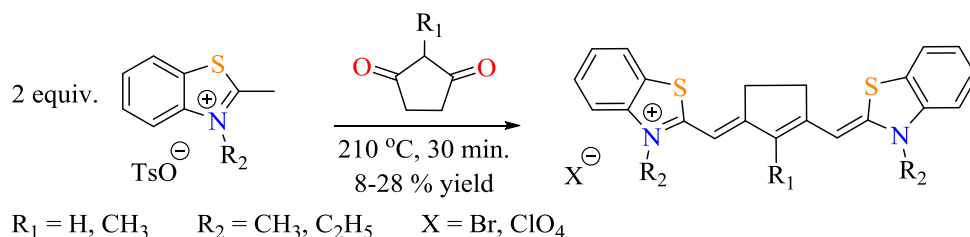


cryptocyanine

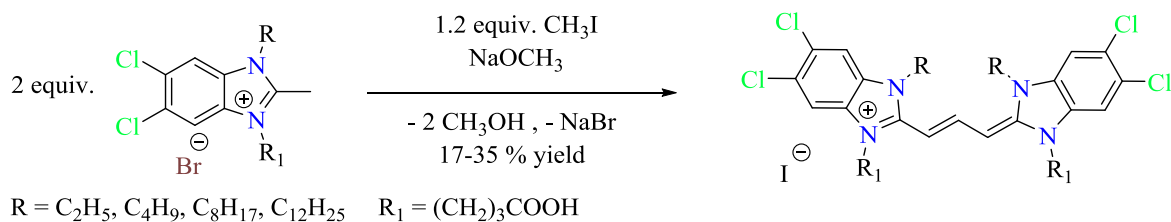
Методи за получаване на полиметинови багрила



Polymer, (2011), 52, 2110-2119



J. Fluoresc., (2005), 15, 849-857



J. prakt. Chem., (1995), 337, 203-208

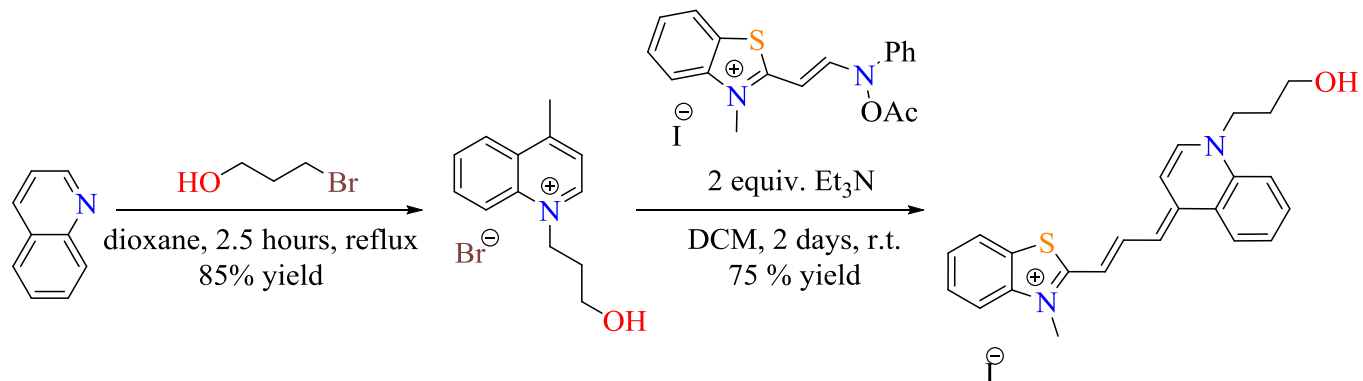
Предимства:

- ☺ Кратки реакционни времена
(5 мин. - 2 часа)

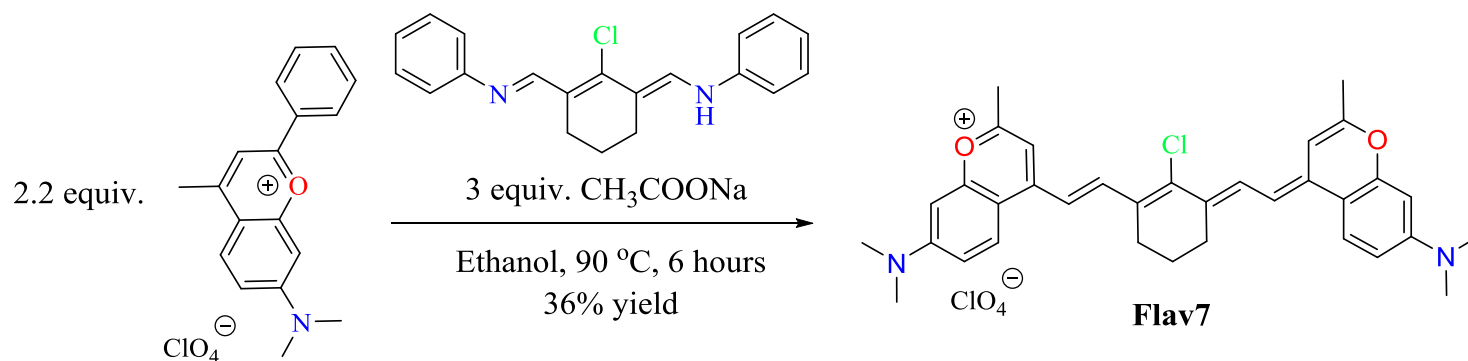
Недостатъци:

- ☹ Получаване на симетрични продукти
- ☹ Ниски добиви на целевите багрила

Несиметрични полиметинови багрила алтернативни синтетични подходи



J. Org. Chem., (2008), 73, 4263-4266
Eur. J. Org. Chem., (2010), 1239-1248



Angew. Chem. Int. Ed., (2017), 56, 13126-13129

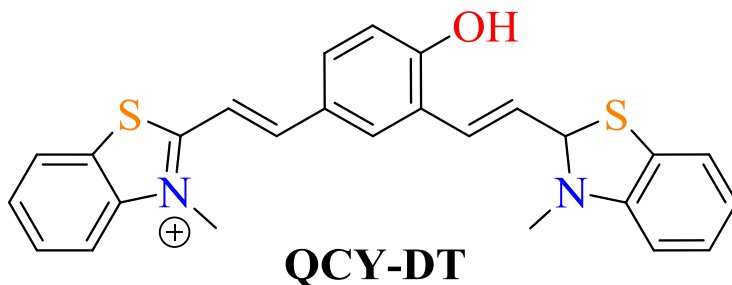
Предимства:

☺ Повишени добиви (> 40%)

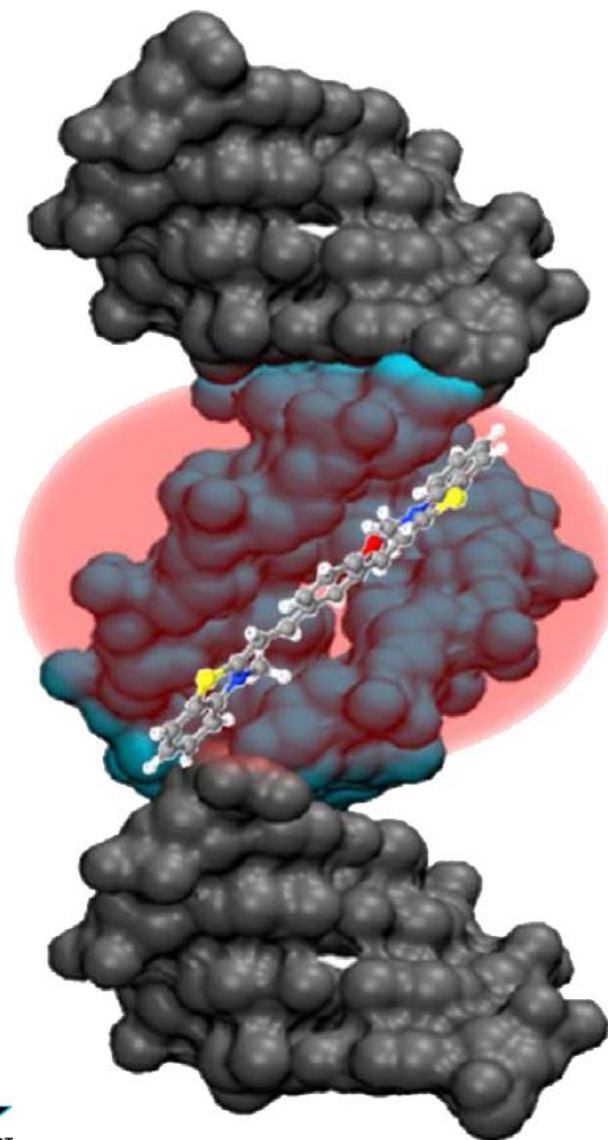
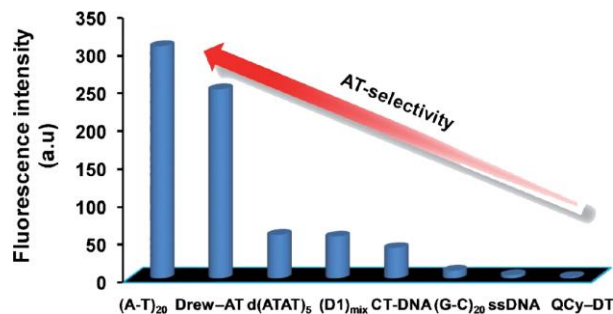
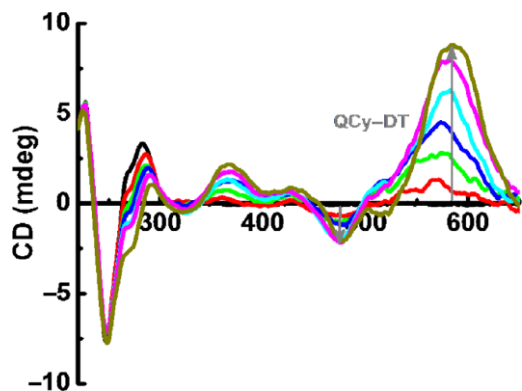
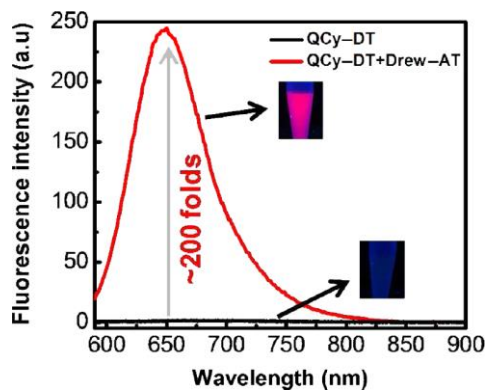
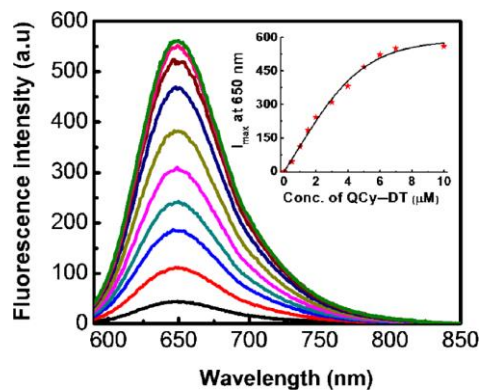
☺ Симетрични и несиметрични багрила

☺ Реакции при стайна температура и кипене

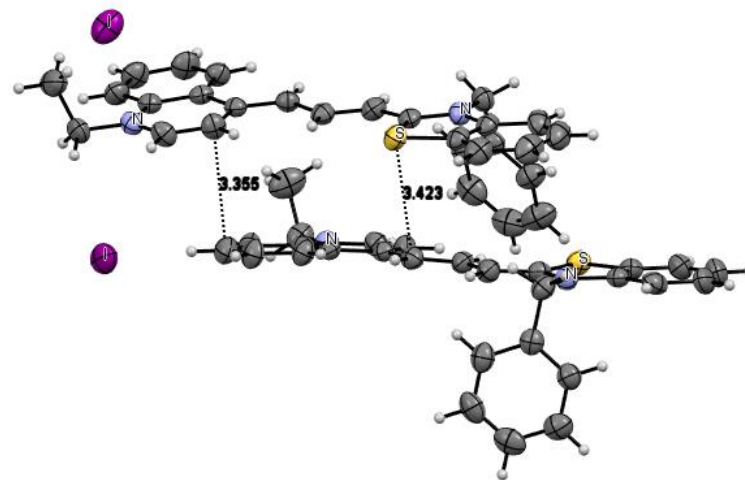
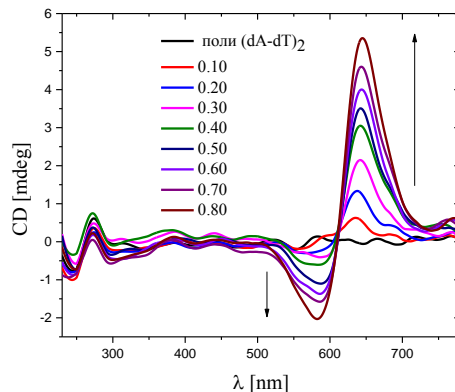
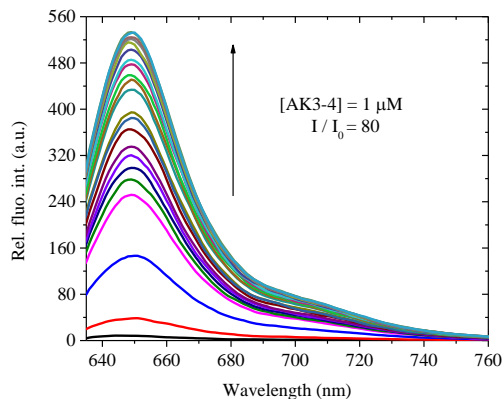
Взаимодействие на цианинови багрила с малката бразда 2



Nucleic Acids Research, (2015), 43 (18), 8651-8663



Н-агрегати: специфични взаимодействия с полинуклеотиди



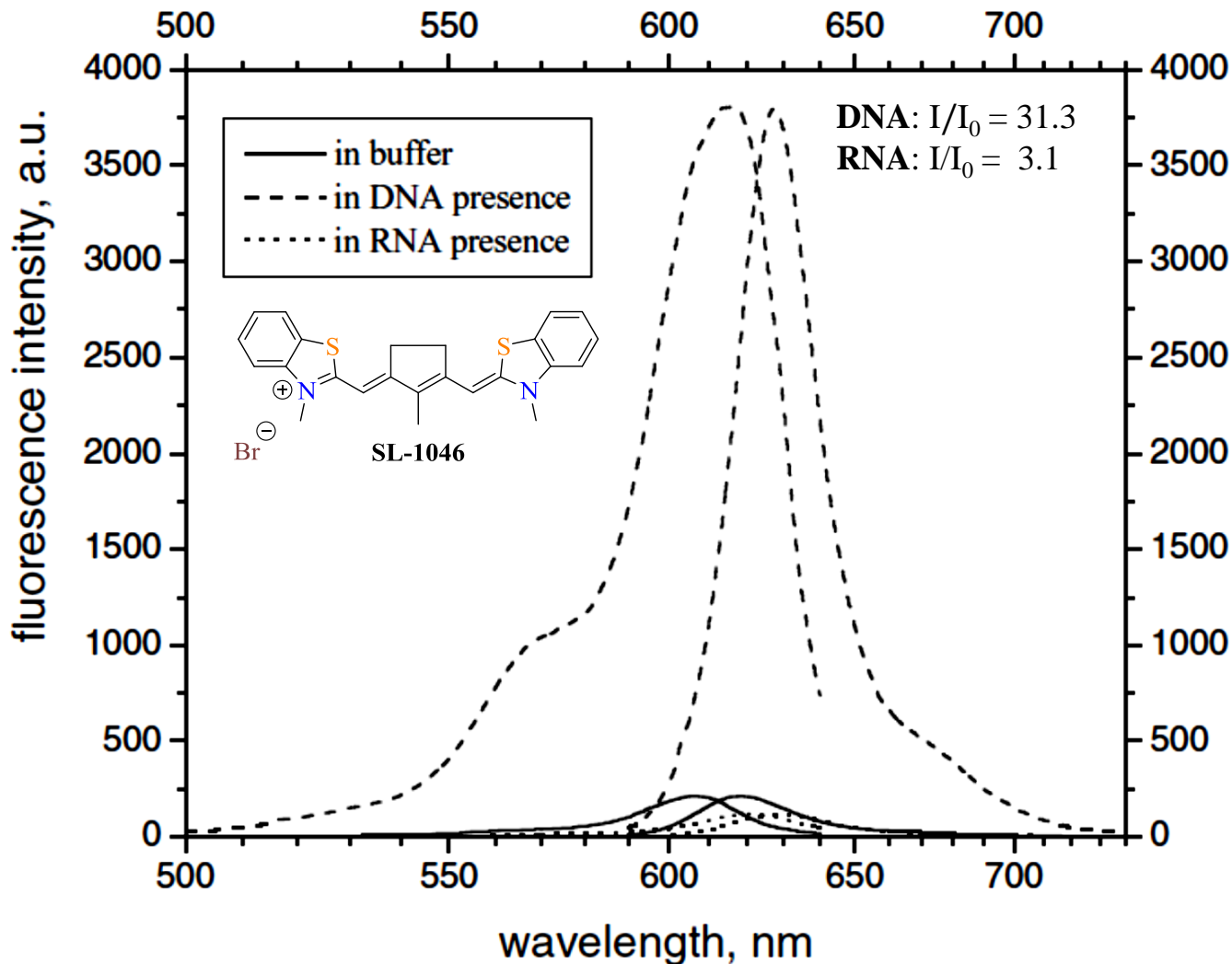
J Luminesc., (2016), 174, 70-76

	log K_s	ΔI calc.
A_nU_n	-	1.3
aB -DNA	6.5	14
(dGdC) _n	5.4	80
(dAdT) _n	5.4	24



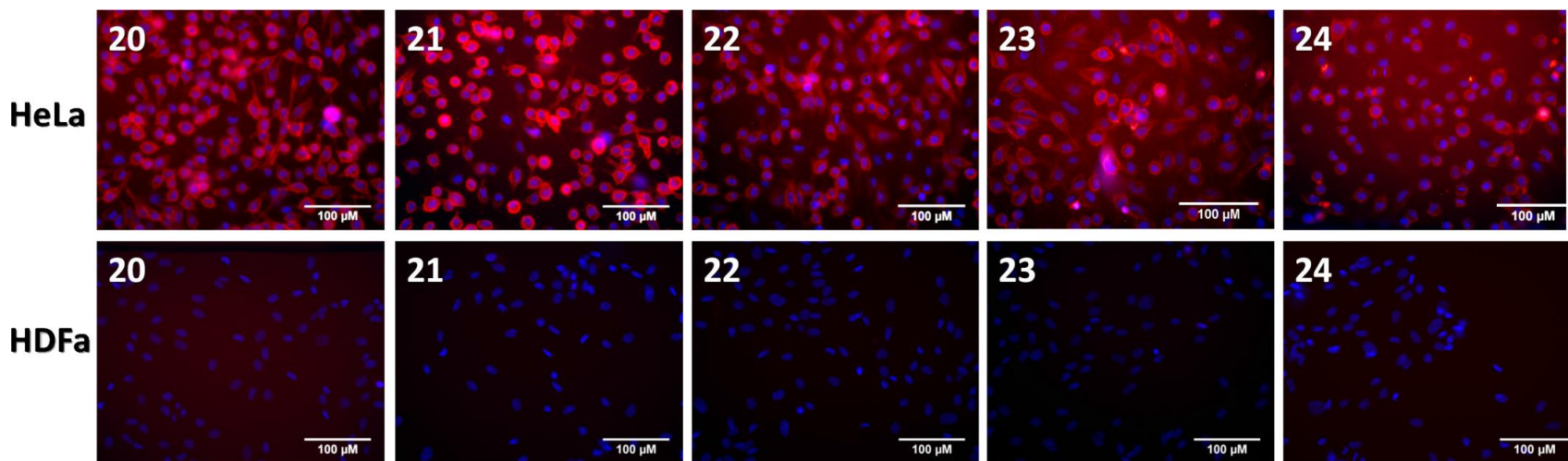
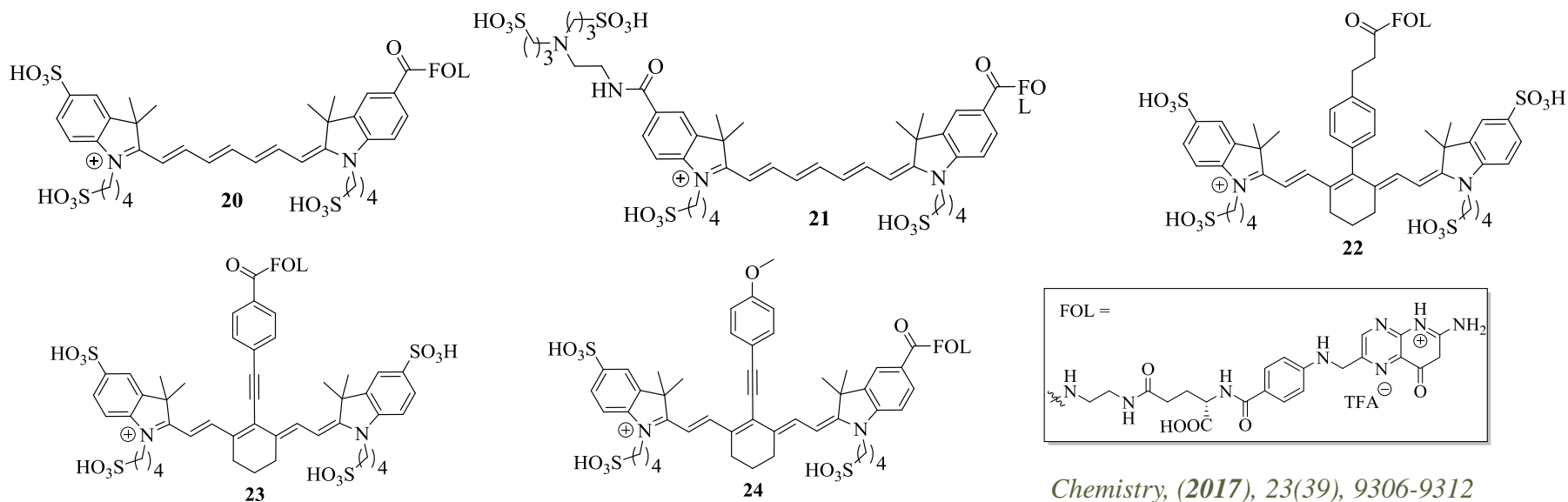
	браздова ширина [Å]		Браздова дълбочина [Å]	
	голяма	малка	голяма	малка
A_nU_n	3.8	10.9	-	-
aB -DNA	11.7	5.7	8.5	7.5
(dGdC) _n	13.5	9.5	10.0	7.2
(dAdT) _n	11.2	6.3	-	-

ДНК / РНК селективно маркиране при симетрични полиметинови багрила



J. Fluoresc., (2005), 15, 849-857

Полиметинови багрила в образната диагностика



HeLa cells (Henrietta Lacks) = cervical cancer

HDFa = Primary human dermal fibroblasts

Бъдещи цели и задачи по тематиката

- Протичане на реакции без образуване на странични продукти.
- Редуциране на реакционните времена и повишаване на добивите.
- Синтез на багрилни структури с повишена селективност за биомаркиране.
- Подобряване на настоящи и/или разработване на нови синтетични подходи
- Синтез в твърдо състояние или използване на минимално количество разтворител.





Благодаря за вниманието