

Санкт-Петербургский государственный университет

МИХНЕВИЧ Виталия Геннадьевна

Выпускная квалификационная работа

Биосовместимые фосфоресцентные сенсоры кислорода на основе комплексов иридия(III): синтез и исследования их свойств

Уровень образования: бакалавриат

Направление 04.03.01 «Химия»

Основная образовательная программа СВ.5014.2019 «Химия»

Научный руководитель: доцент,
кафедра общей и
неорганической химии, к. х. н.,
Критченков Илья Сергеевич

Рецензент: с.н.с. Института
высокомолекулярных
соединений РАН, Дубашинская
Наталья Вадимовна

Санкт-Петербург

2023

Оглавление

Введение	3
Литературный обзор	3
1. Роль молекулярного кислорода в деятельности живых организмов	3
2. Методы измерения концентрации O ₂ в биообъектах. Их достоинства и недостатки .	7
2.1. Позитронно-эмиссионная томография (PET имиджинг)	8
2.2. ¹⁹ F магнитно-резонансная оксиметрия (MRI).....	9
2.3. Оксиметрия электронного парамагнитного резонанса (EPR имиджинг)	10
2.4. Электрохимические методы	11
2.5. Ближняя инфракрасная спектроскопия (NIRS)	12
2.6. Люминесцентные методы	13
2.6.1. Теоретические основы люминесценции	13
2.6.2. Механизм тушения фосфоресценции координационных соединений молекулярным кислородом	16
2.6.3. Ратиометрический метод.....	18
2.6.4. Метод PLIM	19
2.6.5. Сравнение PLIM и ратиометрии	22
3. Особенности комплексных соединений Ir(III)	22
Постановка задачи.....	25
Объекты исследования.....	25
Цели исследования	25
Задачи исследования	25
Экспериментальная часть	27
Результаты и обсуждение	43
Серия комплексов K1-K4	43
Серия комплексов K5-K6	52
Заключение.....	60
Благодарности	62
Список использованной литературы	63
Приложение	66

Введение

Важность молекулярного кислорода для живых организмов неоспорима, и любые нарушения в его уровне могут свидетельствовать о различных патологиях и заболеваниях, включая гипоксию тканей, которая является симптомом сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. В современной биоимиджинг-технологии большое значение имеют фосфоресцентные сенсоры кислорода, которые позволяют определять концентрацию молекулярного кислорода в живых организмах и тканях. Однако, многие существующие методы имеют ограничения, такие как токсичность или нестабильность сенсоров, а также сложность в использовании. В связи с этим, разработка новых биосовместимых и высокоэффективных фосфоресцентных сенсоров кислорода остается актуальным направлением современной химии и биоимиджинга.

В данном исследовании мною проведены обзор и сравнение существующих методов измерения концентрации кислорода в биообъектах, с подробным рассмотрением метода фосфоресцентного имиджинга с временным разрешением (PLIM), а также изучен потенциал новых комплексных соединений Ir(III), которые были синтезированы в качестве фосфоресцентных кислородных сенсоров.

Литературный обзор

1. Роль молекулярного кислорода в деятельности живых организмов

Молекулярный кислород играет ключевую роль в жизнедеятельности аэробных организмов, поскольку он принимает электроны в цепи переноса электронов в митохондриях. Гомеостаз O₂ управляет аэробным дыханием, и поэтому контроль его уровня необходим для поддержания

жизнедеятельности организмов. Нарушения гомеостаза O_2 у человека могут свидетельствовать о наличии в организме серьезных патологий, таких как сердечно-сосудистые заболевания или злокачественные опухоли. За последние годы было разработано множество методов измерения уровня O_2 в клетках и тканях в целях диагностики.

У млекопитающих имеется сложная система транспортировки кислорода в организме, которая регулирует его концентрацию. Если в клетках возникает гипоксия, то активируются механизмы её устранения, такие как ангиогенез — процесс создания новых кровеносных сосудов в тканях, повышение уровня гемоглобина в крови, ускорение гликолиза и продуцирование антиоксидантов. HIF (Hypoxia-inducible factor) — это белок, который играет важную роль в регуляции клеточного метаболизма. Его уровень в клетке зависит от наличия кислорода и может возрасти в условиях гипоксии. Лимитирующей стадией расщепления HIF является гидроксилирование ферментом пролилгидроксилазой (PHD, prolyl hydroxylase domain). PHD необходим молекулярный кислород для её ферментативной активности, поэтому она функционирует как сенсор кислорода у многоклеточных организмов. Если уровень кислорода в окружающей среде понижен, то PHD не может полноценно функционировать, что приводит к увеличению уровня HIF. Гидроксилирование HIF- α (субъединица гетеродимерного фактора транскрипции HIF-1) происходит в цитозоле, поэтому внутриклеточное осмотическое давление также может влиять на активацию HIF. Таким образом, регуляция уровня HIF — это сложный процесс, зависящий от многих факторов, и его изучение важно для понимания механизмов регуляции клеточного метаболизма.^[1] Далее кратко рассмотрим принцип работы этих белков, а также последствия их накопления в организме.

На Рисунке 1 проиллюстрирована схема работы белков HIF в ситуациях нормоксии и гипоксии. HIF- α , фактор транскрипции, может регулироваться как гипоксическими, так и негипоксическими факторами. При нормоксии субъединицы HIF- α гидроксилируются датчиками кислорода, включая ферменты PHD и HIF-1, вызывая полиубиквитинирование и протеасомальную деградацию гидроксилированных субъединиц HIF- α (красные стрелки).

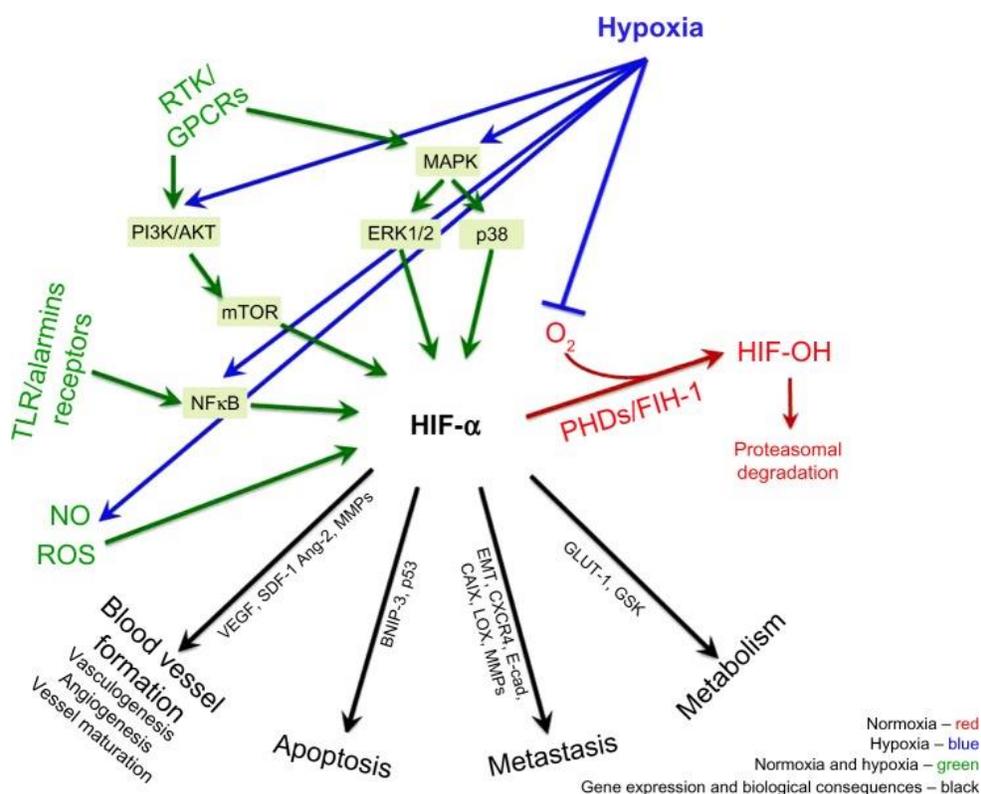


Рис. 1. Механизм работы HIF-факторов^[2]

Активность PHD и HIF-1 зависит от кислорода (красные стрелки); при гипоксии (синие стрелки) эти ферменты теряют свою активность из-за снижения насыщения кислородом, что приводит к стабилизации белка HIF- α , накоплению и транслокации в ядро, что приводит к транскрипции генов и биологическим последствиям (чёрные стрелки). HIF также модулируется независимо от гипоксии образом в ответ на оксид азота (NO), активные формы кислорода (АФК), цитокины, липополисахариды и факторы роста

посредством рецепторных тирозинкиназ (RTK), рецепторов, связанных с G-белком (GPCR), толл-подобных рецепторов (TLR) и аларминовых рецепторов. Негипоксическая регуляция HIF опосредуется рядом различных сигнальных путей, включая NFκB — универсальный фактор транскрипции, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла —, PI3K/AKT/mTOR — внутриклеточный сигнальный путь, центральными компонентами которого являются фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), киназы AKT и mTOR, отвечающий за уход от апоптоза, рост, пролиферацию клеток и метаболизм — и MAPK/ERK — один из основных внутриклеточных сигнальных путей, содержащих одну из митоген-активируемых протеинкиназ и контролирующих транскрипцию генов, метаболизм, пролиферацию и подвижность клеток, апоптоз и др. (зелёные стрелки). Эти пути, а также выработка АФК дополнительно регулируются гипоксией, что приводит к множественным уровням стимуляции HIF-α, как гипоксическим, так и нормоксическим. В результате накопление и активация HIF вызывает образование кровеносных сосудов, апоптоз, метастазирование и метаболизм с помощью ряда генов (чёрные стрелки).

Патологическая гипоксия является распространённым фактором микроокружения при опухолях, который способствует выживанию раковых клеток и их размножению. Считается, что хроническая гипоксия, в отличие от острой, играет основную роль в скорости прогрессирования рака и в том, насколько эффективна против него лучевая или химиотерапия. Это связано с тем, что изменение фенотипа клеток, связанное с хронической гипоксией, увеличивает устойчивость опухолевых клеток к химиотерапии или лучевой терапии, а также делает рак агрессивнее и способствует развитию метастазов.^[3]

Ключевые клеточные реакции на гипоксию, вызванные сверхэкспрессией субъединиц HIF-1α и HIF-2α и их нижестоящих целей, увеличивают

образование кровеносных сосудов, агрессивность раковых клеток, метастазирование и устойчивость к лечению.^[2]

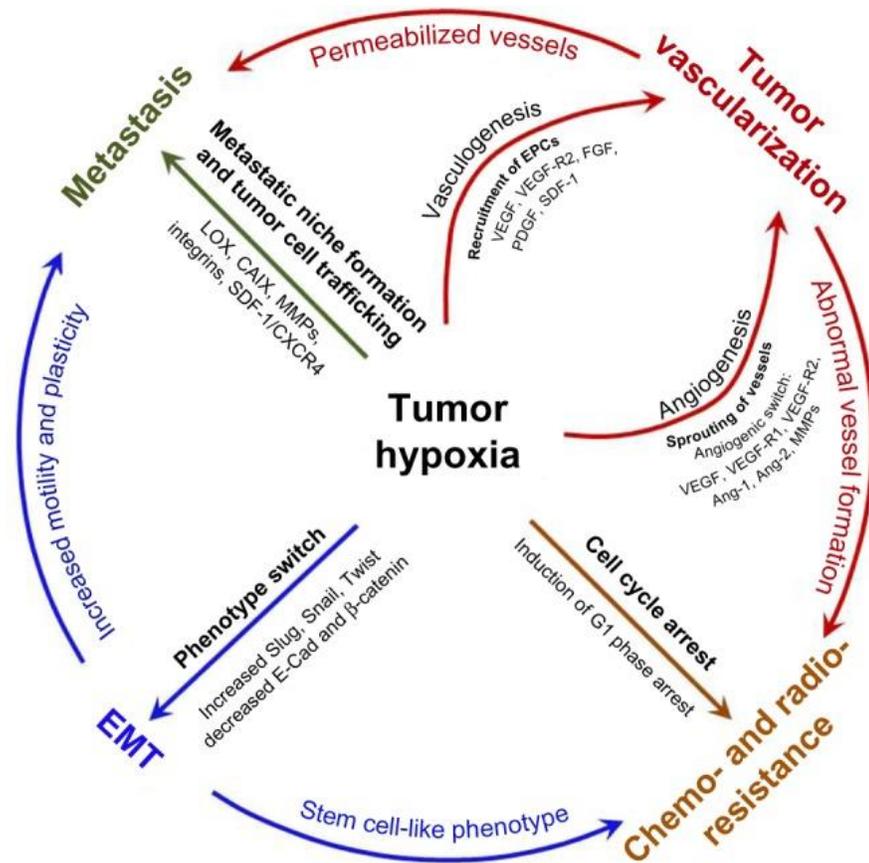


Рис. 2. Гипоксия как движущая сила развития опухолей и образования метастазов^[2]

2. Методы измерения концентрации O_2 в биообъектах. Их достоинства и недостатки

Для определения концентрации O_2 в клетках и тканях существует множество методов, которые основаны на различных физических явлениях и обладают своими преимуществами и недостатками. Среди известных методов определения молекулярного кислорода можно выделить электрохимические методы, позитронно-эмиссионную томографию (PET), магнитно-резонансную томографию (MRI), электронный парамагнитный резонанс (EPR), ряд люминесцентных методов (FLIM, PLIM, ратиометрия) и спектроскопию в ближней инфракрасной области (NIRS). Одними из самых

важных критериев выбора метода определения молекулярного кислорода являются: инвазивность, воспроизводимость измерений, точность и надёжность результата, стоимость используемого оборудования, глубина проникновения для проведения измерений, разрешение изображения, наличие на нём фонового шума, время сбора сигнала, простота метода и полезность полученного результата для клинических исследований.^[4,5]

2.1. Позитронно-эмиссионная томография (PET имиджинг)

Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) является одним из методов имиджинга *in vivo*, который использует короткоживущие радионуклиды, испускающие позитроны (β^+ -распад). Метод ПЭТ может быть успешно применён для определения уровня гипоксии в организме. Комбинация методов ПЭТ и компьютерной томографии важна, так как позволяет получить информацию одновременно об анатомии и о функциональных изменениях. Для имиджинга кислорода при помощи метода ПЭТ используются маркеры гипоксии. Это класс имидазольных сенсоров, содержащих ^{18}F , которые присоединяются к макромолекулам в клетках, подверженных гипоксии. Этот метод широко используется в клинических исследованиях с целью определения факторов, связанных с гипоксией, а также планирования и мониторинга её лечения.

Один из главных плюсов этого подхода – возможность получения высококачественных изображений с высоким уровнем детализации на уровне организма или его тканей. Однако, для этого необходим позитронно-эмиссионный томограф, который имеет высокую стоимость, а также требует тщательного контроля при работе с радиоактивными метками, которые сами по себе являются дорогостоящими и нестабильными.

2.2. ^{19}F магнитно-резонансная оксиметрия (MRI)

Описываемый метод основан на явлении ядерного магнитного резонанса, но для проведения исследования необходимо использовать специальные сенсоры на основе перфторуглеводородов (PFC). Вводят эти датчики внутривенно в форме эмульсии. Скорость спин-решеточной релаксации атомов ^{19}F (R_1) пропорциональна концентрации кислорода в растворе. Поэтому с помощью ^{19}F -оксиметрии можно измерить концентрацию кислорода в тканях. Это позволяет отслеживать изменение уровня кислорода в опухолях и динамику этого процесса. Изображения ^{19}F -оксиметрии можно также комбинировать с анатомическими ^1H изображениями, чтобы получить информацию о концентрации кислорода и его пространственном распределении.

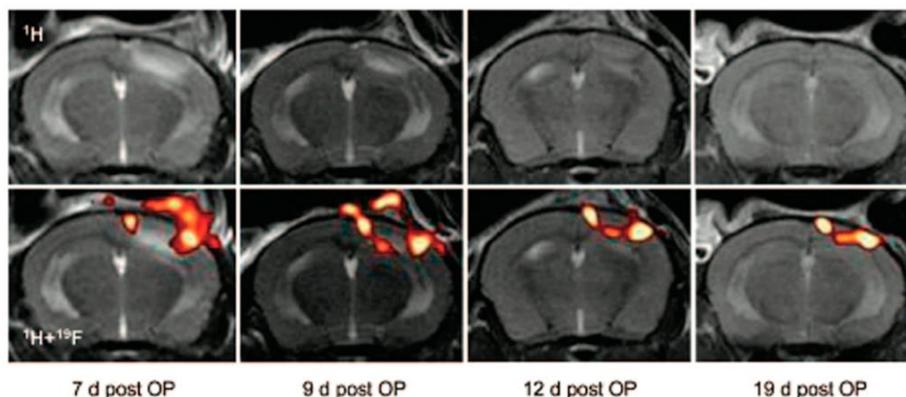


Рис. 3. Инфильтрация PFC в головной мозг после индукции фокальной ишемии головного мозга путём фототромбоза, демонстрирующая перемещение метки с течением времени.^[6]

PFC малотоксичны, поэтому их безопасно вводить внутривенно. Их также можно инкапсулировать в проницаемые оболочки, которые не повреждают ткани и могут длительное время удерживать датчики в организме. Более того, PFC нечувствительны к эмульсификации, рН, разбавлению, распространённым белкам и компонентам крови, что является их основным преимуществом.^[5]

2.3. Оксиметрия электронного парамагнитного резонанса (EPR имиджинг)

Спектроскопия ЭПР имеет уникальную возможность обнаруживать вещества с неспаренными электронами и характеризовать локальное окружение вещества, включая присутствие кислорода. Одним из основных применений ЭПР *in vivo* является измерение концентрации кислорода в тканях, выражаемое в pO_2 . Измерение проводится с помощью внешних датчиков, состоящих из имплантированных парамагнитных частиц или растворимых веществ, которые физически взаимодействуют с O_2 , но не поглощают его. pO_2 определяется по изменению ширины линий ЭПР, вызванному взаимодействием двух парамагнитных частиц, O_2 и сенсора. Существует множество чувствительных к кислороду парамагнитных молекул, различных по структуре и химическим свойствам. Особенно часто используются нитроксиды и тритильные (производные трифенила) радикалы. Большинство нитроксидов демонстрирует трёхлинейное сверхтонкое расщепление, характерное для азота в NO-группе. Ширина линии имеет зависимость от концентрации кислорода. Тритилы же в отсутствие кислорода имеют более узкие линии, поэтому их уширение в его присутствии можно точнее измерить.^[7]

Метод ЭПР-оксиметрии малоинвазивен и позволяет получить абсолютное значение pO_2 или концентрации O_2 в биологических тканях, не повреждая их. Метод высокочувствителен и может быть применён для получения локальных изображений. Сенсоры имеют допустимый период полураспада, хорошее распределение внутри ткани, обладают высокой специфичностью и не являются токсичными. На результаты измерений не влияет окружение. Этот метод также позволяет проводить мониторинг насыщения тканей кислородом. Одной из главных проблем метода является длительное время сбора сигнала, что может затруднять пространственный имиджинг.

2.4. Электрохимические методы

Одним из самых первых методов определения pO_2 является амперометрический метод с использованием электрода Кларка (Рис. 4). Он состоит из платинового электрода, покрытого кислородопроницаемой мембраной, обычно изготовленной из органического фторполимера. При подаче напряжения кислород электрохимически восстанавливается на поверхности электрода. Электрод Кларка обладает недостатками, включая потребление кислорода (что может быть вредным в случае очень маленьких образцов и/или образцов с гипоксией); трудность определения напряжения кислорода на больших площадях (например, при кислородной гистографии); повреждение ткани иглой датчика и необходимость присутствия по крайней мере следов воды для протекания реакции восстановления.^[8]

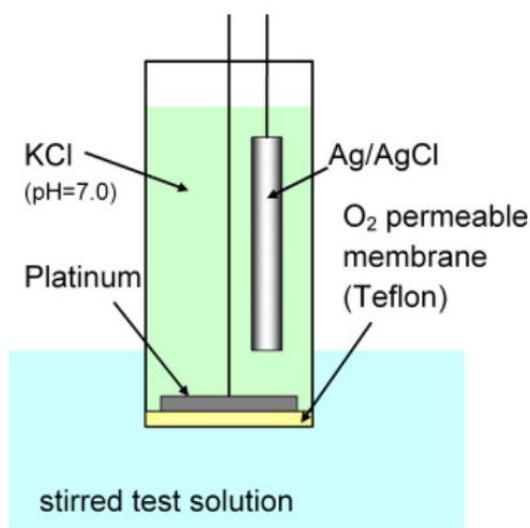


Рис. 4. Схема электрода Кларка. Поляризуемый Pt-электрод находится в бескислородном буферном растворе, отделённом от тестируемого раствора тонкой тефлоновой мембраной. Электрод Ag/AgCl служит электродом сравнения.^[9]

2.5. Ближняя инфракрасная спектроскопия (NIRS)

В настоящее время метод NIRS широко применяется в исследованиях изменений концентрации кислорода в тканях. Этот метод использует свет ближнего ИК диапазона (700-1000 нм), который проходит через биологические ткани, кости и мышцы. Сигнал, полученный при помощи NIRS, основан на поглощении света гемоглобином в кровеносных сосудах сосудистой системы. Поглощение света в мелких сосудах минимально, а крупные поглощают его полностью. Таким образом, разница в поглощении света мелкими и крупными сосудами обеспечивает специфичность этого метода в сосудистой системе. Так как спектры поглощения оксигемоглобина и дезоксигемоглобина различны, можно определять уровень насыщения крови кислородом по соотношению полос поглощения этих форм. NIRS-метод обладает множеством преимуществ, таких как неинвазивность, высокая мобильность, быстрота, высокое разрешение, низкая стоимость и воспроизводимость.

Однако, при использовании этого метода невозможно измерить уровень кислорода в тканях. Метод предоставляет информацию только о насыщении кислородом сосудов, что позволяет выявить баланс между доставкой и потреблением кислорода. Более того, изменения в рассеянии света и длине оптического пути могут возникнуть при переходе от одного объекта к другому, а многие клинические исследования требуют установки определённых границ тканей, что затрудняет определение оптической длины пути и коэффициента светопоглощения ткани. Тем не менее, метод NIRS обладает возможностью проводить измерения в режиме реального времени, что позволяет проследить процессы лечения или изменения патологических состояний. ^[5]

2.6. Люминесцентные методы

Подходы, основанные на тушении люминесценции, позволяют непосредственно измерять и количественно определять концентрацию кислорода в тканях, даже в отсутствие крови. Они выгодны своей простотой и могут быть легко адаптированы к существующим системам визуализации. Хотя метод может быть ограничен неоднородным освещением и неравномерным распределением молекул сенсора, эти проблемы можно преодолеть путем введения независимого от кислорода эталонного хромофора, который совместно локализуется с фосфоресцирующим датчиком.^[10] Подробнее этот вопрос будет рассмотрен далее.

Для того чтобы подробнее рассмотреть люминесцентные методы, необходимо кратко напомнить об основных терминах, связанных с этим явлением.

2.6.1. Теоретические основы люминесценции

Люминесценция возникает, когда вещество излучает фотоны, переходя из возбуждённого состояния в основное. Этот процесс может быть вызван различными способами, например, светом (фотолюминесценция), химической реакцией (хеомлюминесценция) и т.д. В зависимости от природы возбуждённого состояния фотолюминесценцию можно разделить на два типа: флуоресценцию и фосфоресценцию. *Флуоресценция* происходит, когда мультиплетность системы в основном и возбуждённом состояниях не меняется. Этот переход квантово-механически разрешен, поэтому интенсивность люминесценции может быть достаточно высокой. При флуоресценции время, за которое интенсивность эмиссии упадет в e

раз, то есть *время жизни возбуждённого состояния*, составляет приблизительно от десятых до десятков наносекунд.

Фосфоресценция, напротив, происходит, когда система переходит из триплета в синглет, что запрещено принципом Паули, поэтому интенсивность люминесценции может затухать за период времени от десятков наносекунд до секунд.

Качественной характеристикой люминесценции является спектр испускания, который отображает зависимость интенсивности света от его длины волны. Спектры испускания могут отличаться в зависимости от структуры люминофора и условий окружающей среды. Проиллюстрировать процессы поглощения и испускания света можно с помощью диаграммы Яблонского, изображённой на Рисунке 5.

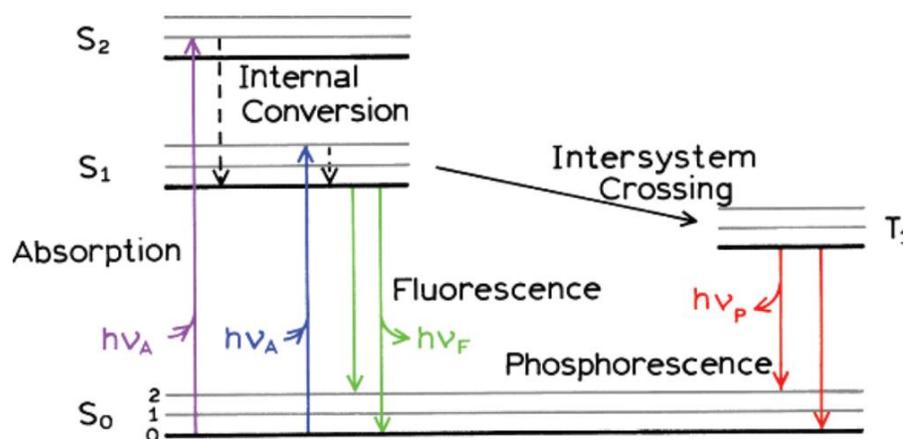


Рис.5. Диаграмма Яблонского^[11]

На диаграмме Яблонского изображены уровни энергии, через которые проходит система при возбуждении и релаксации. Они обозначаются как S_0 , S_1 и S_2 — основное состояние, первое и второе возбуждённые состояния, соответственно. Каждый из этих уровней содержит колебательные уровни энергии, которые обозначаются цифрами 0, 1, 2 на диаграмме. Переходы между электронными уровнями обозначаются прямыми линиями. Как правило, возбуждение происходит на уровни, расположенные выше

нижнего колебательного подуровня состояния S_1 . Затем, за время около 10^{-12} - 10^{-8} секунд, происходит релаксация на нижний колебательный уровень состояния S_1 , называемая внутренней конверсией. Этот процесс настолько быстрый, что считается, что релаксация происходит с нижнего колебательного подуровня S_1 .

Когда электроны переходят на уровень T_1 , в триплетное состояние, это называется интеркомбинационной конверсией. Возвращение на основной уровень S_0 с возбуждённого триплетного уровня запрещено, поэтому такой процесс занимает от $\sim 10^{-7}$ до 10^1 с.

Спектр испускания, как правило, сдвинут в сторону больших длин волн относительно спектра поглощения, то есть наблюдается потеря энергии, и этот эффект называется *Стоксовым сдвигом*. Причиной Стоксова сдвига служат безызлучательные потери.

Важно отметить, что спектр испускания обычно не зависит от длины волны возбуждения, потому что избыток энергии тратится при внутренней конверсии. Также стоит упомянуть, что спектры испускания и поглощения (особенно на больших длинах волн) часто являются зеркально симметричными, поскольку при возбуждении и испускании происходят переходы через одни и те же состояния.

Одним из важных количественных показателей люминесценции является *квантовый выход*, который определяется как отношение количества испущенных квантов света к количеству поглощенных квантов. Квантовый выход определяется выражением

$$\Phi = \frac{I}{I_0}, \quad (1)$$

где I_0 — интенсивность возбуждающего света, I — интенсивность эмиссии.

Квантовый выход может быть определен с использованием интегрирующей сферы или путем сравнения с эталоном. Во втором случае для определения квантового выхода используется следующая формула:

$$\Phi_s = \frac{\Phi_r \eta_s^2 A_r I_s}{\eta_r^2 A_s I_r}, \quad (2)$$

где Φ_s — квантовый выход образца, Φ_r — квантовый выход эталона, η — показатель преломления растворителя, A_s и A_r — абсорбция образца и эталона на длине волны возбуждения, соответственно, I_s и I_r — интегральные интенсивности эмиссии.

Так, квантовый выход является количественной мерой эффективности люминесценции рассматриваемого вещества.

2.6.2. Механизм тушения фосфоресценции координационных соединений молекулярным кислородом

В этой работе мы сосредотачиваем внимание на методе оксиметрии с использованием координационных соединений Ir(III) в качестве фосфоресцентных датчиков. Для этого кратко рассмотрим природу взаимодействия этих соединений с O_2 .

Определение концентрации кислорода с помощью фосфоресцентных сенсоров основано на бимолекулярном тушении возбуждённых молекул кислородом. На рис. 6 показана диаграмма энергетических уровней, которая демонстрирует, как возбуждённое триплетное состояние молекулы люминесцентного соединения тушится молекулярным кислородом, а также указаны константы основных релаксационных процессов.

Тушение фосфоресценции молекулы молекулярным кислородом обусловлено двумя путями перехода с возбуждённого триплетного уровня, которые включают перенос заряда (СТ) и отсутствие переноса заряда (non-СТ).

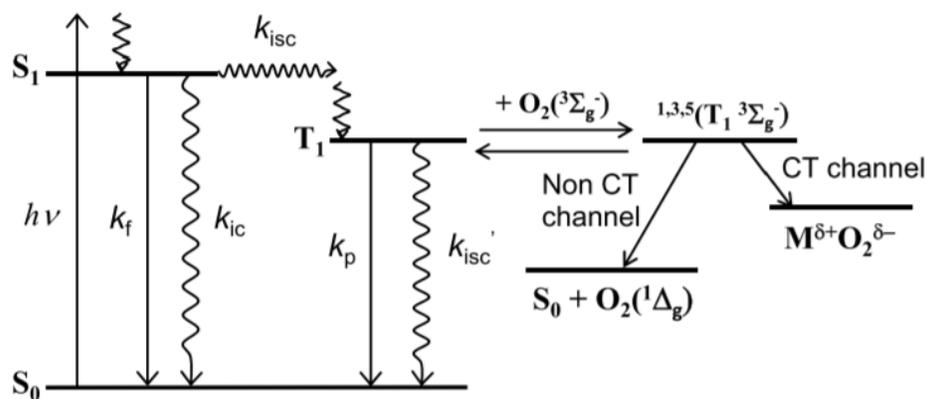


Рис. 6. Уровни энергии, вовлечённые во взаимодействие комплексов с O₂^[4]

Кинетика этого процесса может быть описана с помощью уравнения Штерна-Фольмера, которое показывает связь между отношением времён жизни/квантовых выходов и парциальным давлением/концентрацией кислорода в растворе:

$$\frac{\Phi_p^0}{\Phi_p} = \frac{\tau_p^0}{\tau_p} = 1 + k_q \tau_p^0 p O_2 = 1 + K_{SV} p O_2 = 1 + k'_q \tau_p^0 [O_2] = 1 + K'_{SV} [O_2] \quad (3)$$

где Φ_p^0 и τ_p^0 — квантовый выход и время жизни фосфоресценции в дегазированном растворе, Φ_p и τ_p — эти величины при данном парциальном давлении pO_2 либо концентрации $[O_2]$, а k_q (k'_q) и K_{SV} (K'_{SV}) — бимолекулярные константы скорости тушения и константы Штерна-Фольмера, соответственно.

Некоторые катионы металлов, включая Ru(II), Ir(III), Pt(II), Re(I), Os(II) и металлопорфирины Pt(II) и Pd(II), проявляют отчётливую фосфоресценцию в растворе при комнатной температуре благодаря "эффекту тяжелого атома" центрального иона металла. Среди них наиболее распространены Re(I), Ir(III) и порфирины Pt(II) и Pd(II).

В последнее время механизмы тушения фосфоресценции комплексов вышеперечисленных металлов активно изучались.^[12-17]

Уравнение (3) показывает, что при постоянной интенсивности возбуждающего света квантовый выход фосфоресценции соединений с

относительно большими значениями K_{sv} будет снижаться по мере увеличения парциального давления кислорода (pO_2) или концентрации $[O_2]$ в растворе. Аналогично, увеличение интенсивности флуоресценции датчиков, введенных в клетки или ткани, говорит о снижении концентрации кислорода до тех пор, пока интенсивность возбуждающего света и распределение метки остаются постоянными. Таким образом, наблюдение за изменением интенсивности эмиссии позволяет исследовать изменение концентрации кислорода в режиме реального времени как *in vitro*, так и *in vivo*. Если молекулы сенсора равномерно распределяются в тканях, можно картировать концентрацию кислорода, подбирая подходящий датчик и используя люминесцентный микроскоп.^[4]

2.6.3. Ратиометрический метод

Чтобы преодолеть барьер чувствительности, был создан ратиометрический метод. В этом методе используют два различных хромофора и одновременно измеряют их сигналы люминесценции на разных длинах волн, а затем вычисляют отношение их интенсивностей. Это служит встроенной калибровкой при коррекции ряда параметров, не зависящих от концентрации аналита, которые могут влиять на сигнал люминесценции. Такая коррекция, встроенная в ратиометрический метод, уменьшает воздействие окружающей среды и обеспечивает чувствительное обнаружение анализируемого вещества.

Как показано на Рисунке 7, ратиометрические измерения могут быть выполнены с использованием комбинации эталонного люминофора (нечувствительного к присутствию анализируемого вещества) и динамического люминофора (наблюдается увеличение/уменьшение/сдвиг сигнала при наличии анализируемого вещества), или можно использовать

два динамических люминофора, которые изменяют свой сигнал в противоположных направлениях. [18]

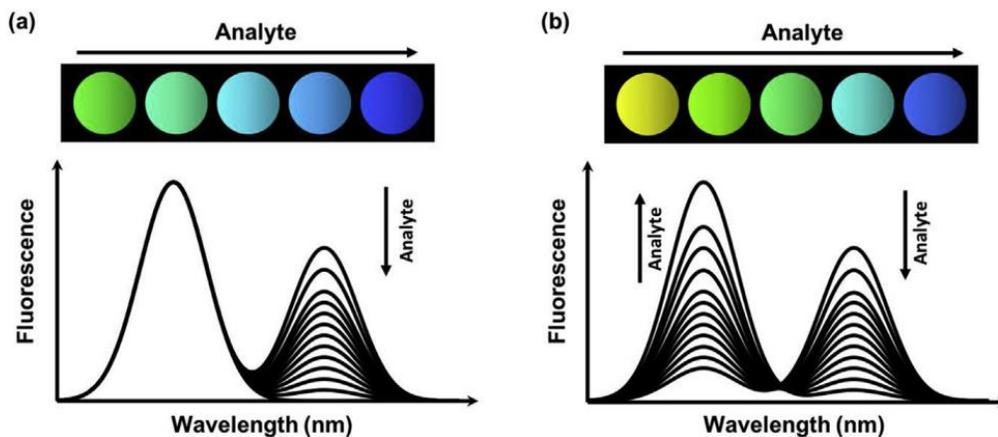


Рис. 7. Схематическая иллюстрация получения ратиометрического сигнала при использовании (а) одного эталонного и одного динамического люминофора или (б) двух динамических люминофоров. Каждая из полос излучения представляет собой излучение одного из них. [18]

2.6.4. Метод PLIM

В данной работе мы сконцентрируемся именно на методе фосфоресцентного имиджинга с временным разрешением, называемого далее PLIM (Phosphorescence Lifetime Imaging).

Наиболее часто используемыми сенсорами для имиджинга FLIM (флуоресцентный имиджинг) являются флуорофоры, имеющие короткое время жизни (0,1-10 нс) и маленький Стоксов сдвиг (<100 нм). Однако существует проблема автофлуоресценции биообъектов, которая может искажать результаты исследований. Более того, из-за малого Стоксова сдвига возбуждающее излучение может накладываться на полезный сигнал. Напротив, фосфоресцентные сенсоры, используемые в PLIM, в том числе комплексы переходных металлов, обладают значительно бóльшим временем жизни (до миллисекунд) и большим Стоксовым сдвигом (>100 нм),

что позволяет исключить фоновую флуоресценцию и обеспечить точность и надёжность результатов эксперимента.

Методы, основанные на измерении времени жизни, такие как FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging) и PLIM, позволяют отслеживать изменения концентрации или давления кислорода, используя время жизни возбуждённого состояния. FLIM достаточно широко применяется в биомедицинских исследованиях, но применение PLIM всё ещё находится в стадии разработки.

Один из распространённых подходов к реализации PLIM — это комбинация растрового сканирования и скоррелированного во времени подсчёта одиночных фотонов (Time-correlated single photon counting или TCSPC). Для захвата фотонов фосфоресценции и измерения спада интенсивности излучения молекул датчика, образец сканируется пиксель за пикселем, во время сканирования каждого пикселя люминофор возбуждается импульсным лазером, а затем, после его отключения, идёт сбор фотонов фосфоресценции, по которым строится распределение времени жизни. На рис. 8 схематично показан данный процесс.

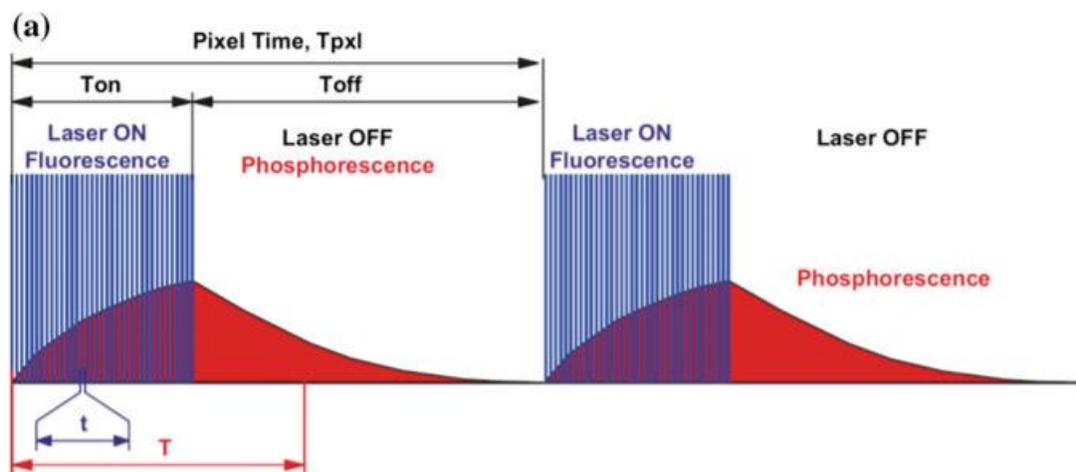


Рис. 8. Схема FLIM/PLIM с TCSPC^[19]

Для достижения максимально возможной чувствительности и устранения нежелательных эффектов, таких как наложение импульсов и перегрузка детектора, широко используется метод последовательных импульсов вместо одиночного импульса. ^[19]

Как описано выше, тушение фосфоресценции комплексов металлов O_2 в воде или органических растворителях подчиняется уравнению Штерна-Фольмера (3), и, следовательно, концентрация кислорода, выраженная в pO_2 или $[O_2]$, может быть точно определена путём измерения времени жизни фосфоресценции с использованием значений k_q (k_q') и τ_p^0 , измеренных заранее в том же растворителе и при той же температуре. Однако, в физиологических средах тушение фосфоресценции необязательно происходит в соответствии с уравнением (3), и экспериментальное значение k_q часто оказывается ниже по сравнению с аналогичным значением в растворе, поскольку молекулы сенсора оказываются в сложных гетерогенных средах и могут взаимодействовать с присутствующими в них биологическими компонентами, например, белками. Взаимодействие кислородных датчиков с биологическими веществами оказывает особенно сильное влияние при использовании низкомолекулярных хромофоров, которые оказываются не защищёнными от воздействия внешней среды. В биологических средах часто наблюдается ситуация, когда затухание излучения сенсора не является моноэкспоненциальным, предположительно из-за того, что его молекулы взаимодействуют с белками и/или что они распределены неоднородно в клетках или тканях. Чтобы точнее измерить время жизни возбуждённого состояния в таких условиях, спад фосфоресценции аппроксимируют биэкспоненциальной функцией с временами жизни τ_1 и τ_2 и относительными амплитудами A_1 и A_2 . Усреднённое время жизни, определяемое как

$$\langle \tau_p \rangle = \frac{A_1 \tau_1^2 + A_2 \tau_2^2}{A_1 \tau_1 + A_2 \tau_2}, \quad (4)$$

используется для более точного измерения концентрации кислорода в биообъекте.

2.6.5. Сравнение PLIM и ратиометрии

Измерения, основанные на времени жизни, требуют специальных инструментов, таких как импульсный лазер и прибор для подсчёта фотонов. Однако, использование ратиометрических датчиков может избавить от этой необходимости. Ратиометрические сенсоры могут содержать нечувствительный к кислороду флуорофор и чувствительный к нему фосфоресцентный датчик, которые соединены между собой прочной, к примеру, пептидной связью. Этот подход хорошо применим, когда поглощение возбуждающего и детектируемого света незначительны. Однако этот метод предполагает использование двух различных по природе хромофоров, и выбор оптимальной пары веществ представляет трудность. Также, важным преимуществом PLIM является возможность получения количественного распределения кислорода в тканях.

3. Особенности комплексных соединений Ir(III)

Октаэдрические комплексы иридия (III) уже давно изучаются и являются очень популярными фосфоресцентными веществами, используемыми в медицине и биологии^[20,21], при создании OLED светодиодов и дисплеев^[22], а также в качестве различных сенсоров^[23], так как обладают рядом полезных свойств, выделяющих их из множества других похожих люминофоров. Так, активное использование комплексов иридия для визуализации биообъектов (биоимиджинг) возможно благодаря следующим характеристикам этих веществ: во-первых, многие комплексы Ir(III) проявляют высокие квантовые выходы фосфоресценции в растворе при комнатной температуре. Во-вторых, параметрами их спектров эмиссии можно управлять и смещать их в необходимый диапазон, вплоть до красного и ближнего ИК излучения, для

того чтобы они попали в область 650-900 нм, которую называют окном прозрачности биологических тканей. В-третьих, значения времён жизни возбуждённых состояний данных соединений достаточно высоки, по сравнению с типичными временами жизни флуоресценции, что позволяет применять те техники визуализации, которые, посредством временной задержки, позволяют избавиться от автофлуоресценции, присущей исследуемым биообъектам и затрудняющей проведение измерений. В-четвёртых, простота модификации этих комплексов позволяет регулировать важные характеристики, такие как гидро- либо липофильность, биосовместимость и векторизация. В-пятых, эти комплексы обладают достаточно высокой инертностью к окислительно-восстановительным процессам, а также фотовыгоранию. Более того, многие из комплексных соединений иридия нетоксичны и проявляют высокую чувствительность к присутствию кислорода в растворе. Все эти преимущества позволяют использовать данные соединения в медицине и биологии.^[20]

Тем не менее, при исследовании свойств данных комплексных соединений, в том числе полученных в настоящей работе, часто возникают существенные трудности, связанные с тем, что данные вещества малорастворимы в водных средах, проявляют токсичность^[24], а также взаимодействуют с белками и другими биомолекулами, что может непредсказуемо сказаться на фотофизических характеристиках и исказить результаты при измерении pO_2 .^[25] Для того чтобы решить эти проблемы, было разработано несколько подходов. Один из них заключается во внедрении хромофора в полимерные наночастицы^[26], тогда как другой основан на обёртывании хромофора в дендритные поли(этиленгликолевые) (ПЭГ) заместители, присоединённые к порфириновому ядру^[27]. Оба подхода не только делают зонд водорастворимым, но и защищают хромофор от нежелательных взаимодействий с компонентами физиологических сред. Эта защита оказалась одним из ключевых требований для эффективного использования датчиков в PLIM экспериментах, которые в настоящее время становятся

одним из самых эффективных инструментов в современной люминесцентной микроскопии. Однако некоторые особенности этих зондов несколько затрудняют их применение в биологических экспериментах. Прежде всего, оба типа меток имеют довольно длительное время жизни фосфоресценции (десятки/сотни микросекунд). В типичных физиологических условиях это неудобно для быстрого получения изображений в фосфоресцентной микроскопии и препятствует получению изображений в реальном времени. Также стоит отметить, что дендритные формы ПЭГ имеют большой размер, что затрудняет их интернализацию в клетки и ограничивает их использование для изучения концентрации кислорода в кровотоке. В данной работе будет исследован новый подход к повышению биосовместимости данных комплексов, а именно модификация их лигандного окружения олиго(этиленгликолем) (ОЭГ) фрагментом с «двойным хвостом» $\{-C(O)NHCH(CH_2OC_2H_4OC_2H_4OCH_3)_2\}$.^[25] Такая модификация не увеличивает размер частиц настолько, чтобы затруднить интернализацию в клетки, однако положительно сказывается на биосовместимости и эффективности в PLIM эксперименте.

Постановка задачи

Объекты исследования

В качестве объектов исследования были выбраны циклометаллированные комплексы иридия(III), которые зарекомендовали себя в качестве фосфоресцентных датчиков кислорода, так как они проявляют высокие квантовые выходы эмиссии в растворе, имеют отчётливый сенсорный отклик на концентрацию кислорода, а также их лигандное окружение можно настраивать и модифицировать, тем самым улучшая их характеристики для применения в биологических системах. Интерес также представляет природа их взаимодействий с компонентами живых систем, таких как белки, и влияние этих взаимодействий на фотофизические свойства сенсоров. В данной работе был синтезирован ряд таких комплексов — четыре комплекса, имеющих общий фенантридин-бензотиофеновый циклометаллирующий N⁴C лиганд, а затем был выбран другой циклометаллирующий лиганд, который был модифицирован олиго(этиленгликолевым) заместителем для повышения биосовместимости итоговых комплексов. С ним было синтезировано ещё два комплекса, а затем были получены нековалентный аддукт и ковалентный конъюгат этих комплексов в бычьим сывороточным альбумином для дальнейшего исследования их фотофизических свойств.

Цели исследования

Цель работы — синтез ряда новых фосфоресцентных комплексов иридия(III) для применения их в качестве кислородных сенсоров в эксперименте PLIM, а также разработка подходов для повышения их биосовместимости.

Задачи исследования

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

- Синтез ряда дииминовых и циклометаллирующих лигандов, в том числе модифицированных короткими разветвлёнными (олиго)этиленгликолевыми группами
- Синтез целевых бис-циклометаллированных комплексов иридия(III) с общей формулой $[\text{Ir}(\text{N}^{\wedge}\text{C})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]\text{PF}_6$
- Установление состава и строения полученных промежуточных и целевых соединений методами ^1H ЯМР, ^1H - ^1H COSY, NOESY ЯМР спектроскопии, масс-спектрометрии, элементного анализа
- Исследование фотофизических свойств полученных соединений: измерение спектров поглощения, возбуждения и эмиссии, измерение квантовых выходов и времён жизни возбуждённого состояния в дегазированных и аэрированных растворах; выбор одного наиболее перспективного соединения из серии гидрофобных комплексов
- Разработка методики солюбилизации данного соединения в водных средах
- Модификация циклометаллирующего $\text{N}^{\wedge}\text{C}$ лиганда с целью повышения биосовместимости комплексов
- Синтез, характеристика и изучение фотофизических свойств нековалентного аддукта и ковалентного конъюгата комплексов иридия, модифицированных олиго(этиленгликолевыми) фрагментами, с бычьим сывороточным альбумином
- Анализ и обобщение полученных данных

Экспериментальная часть

Общие положения

^1H и ^1H - ^1H COSY, NOESY (400 МГц) ЯМР спектры были зарегистрированы на спектрометре Bruker 400 МГц Avance; Шкала химических сдвигов была откалибрована с использованием сигналов остаточных протонов растворителя. Масс-спектры были получены на спектрометре Bruker maXis HRMS-ESI-QTOF в режиме ESI+. Элементный анализ был проведён в аналитической лаборатории Университета Восточной Финляндии.

Лиганды: $\text{N}^{\wedge}\text{C}$ — 6-(бензо[b]тиофен-2-ил)фенантридин, $\text{N}^{\wedge}\text{N}1$ — 1-(4-метоксифенил)-2-(пиридин-2-ил)-1H-фенантро[9, 10-d]имидазол, $\text{N}^{\wedge}\text{N}2$ — 4-(2-(3-бромфенил)-1H-имидазо[4,5-f][1,10]фенантролин-1-ил)бензойная кислота, $\text{N}^{\wedge}\text{N}3$ — 2-(пиридин-2-ил)-1H-бензо[d]имидазол, $\text{N}^{\wedge}\text{N}4$ — 1,10-фенантролин, а также прекурсоры для других лигандов — метил-6-хлороникотинат, бензо[b]тиофен-2-илборная кислота, тетракис(трифенилфосфин)палладий, 2,5,8,12,15,18-гексаоксанодекан-10-амин, триэтиламин, 4-оксо-4-(проп-2-ин-1-илокси)бутановая кислота и проп-2-ин-1-илбензоат были получены ранее и взяты в готовом виде. Другие прекурсоры: 1,3-дициклогексилкарбодиимид, 2-бромпиридин, N-гидроксисукцинимид, 4-диметиламинопиридин, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), а также NaN_3 , аскорбат натрия, бычий сывороточный альбумин (BSA), лимонная кислота, CuI , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, KPF_6 , $\text{IrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Na_2SO_4 , K_2CO_3 и органические растворители были приобретены из коммерческих источников и использованы без дополнительной очистки. Метанол для фотофизических измерений, а также диэтиловый эфир и тетрагидрофуран были перегнаны и высушены перед использованием.

Синтез

Синтез димерного комплекса $\text{Ir}_2(\text{N}^{\wedge}\text{C1})_4\text{Cl}_2$. Было взято 25.0 мг (0.061 ммоль) $\text{IrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и 38.0 мг (0.122 ммоль) лиганда $\text{N}^{\wedge}\text{C1}$. Вещества поместили в круглодонную колбу на 25 мл, оснащенную обратным холодильником, и туда же залили в качестве растворителя смесь 1 мл воды и 3 мл 2-этоксиэтанола. Колбу поставили на масляную баню при перемешивании на 120°C на 18 часов.

После этого реакционную смесь отцентрифугировали, последовательно промыли 4 мл воды, два раза 4 мл метанола и один раз 4 мл диэтилового эфира. После этого полученный ярко-красный осадок димера тщательно просушили при небольшом нагревании и вакуумировании и использовали в дальнейших реакциях. Масса полученного продукта составила 49.1 мг при теоретическом значении 51.7 мг. Выход составил 95%.

Общая процедура синтеза комплексов K1-K4. В баночку объемом 5 мл добавили в качестве реагентов: димерный комплекс $\text{Ir}_2(\text{N}^{\wedge}\text{C1})_4\text{Cl}_2$ (0.018 ммоль), $\text{N}^{\wedge}\text{N}\#$ лиганд (0.038 mmol), KPF_6 (0.380 mmol), а также ацетон в качестве растворителя (2 мл). Реакционную смесь оставили на сутки при перемешивании при комнатной температуре.

Потом реагенты перенесли в круглодонную колбу объемом 25 мл, выпарили досуха, растворили в 0.3 мл ацетона и добавили 5 мл воды, для того чтобы высадить нерастворимый в воде целевой комплекс. Полученную суспензию перенесли в баночку, отцентрифугировали и ещё раз промыли водой. После этого ярко-красный осадок растворили в 5 мл ацетона, перенесли в колбу, высушили, растворили снова в 0.3 мл ацетона и высадили, добавив 5 мл диэтилового эфира. Полученную суспензию перенесли в баночку и отцентрифугировали, осадок промыли эфиром и высушили.

[Ir(N[^]C1)₂(N[^]N1)][PF₆] (K1). Тёмно-красный порошок, 46 мг, выход 94%. ¹H ЯМР ((CD₃)₂CO, 400 МГц, δ): 9.81 (d, J = 9.7 Гц, 1H), 9.69 (d, J = 9.5 Гц, 1H), 9.14 (d, J = 9.5 Гц, 1H), 8.96 (d, J = 5.3 Гц, 1H), 8.88 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 8.76 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 8.73 (d, J = 8.6 Гц, 1H), 8.64 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 8.32 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 8.29–8.26 (m, 2H), 8.04 (d, J = 7.7 Гц, 1H), 7.95 (d, J = 7.9 Гц, 1H), 7.86–7.80 (m, 2H), 7.72–7.58 (m, 7H), 7.38 (dd, J = 8.0, 7.0 Гц, 1H), 7.35–7.13 (m, 7H), 7.12 (d, J = 9.0 Гц, 1H), 6.96 (dd, J = 7.6, 8.6 Гц, 1H), 6.82 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.78–6.72 (m, 3H), 6.62 (d, J = 8.2 Гц, 1H), 6.57 (dd, J = 8.2, 7.0 Гц, 1H), 6.39 (d, J = 8.2, 7.0 Гц, 1H), 5.49 (d, J = 8.9 Гц, 1H), 3.97 (s, 3H, OMe). HRMS (ESI) m/z: 1214.2541 расчётный для C₆₉H₄₃IrN₅OS₂⁺ [M]⁺, экспериментальный 1214.2645. Элементный анализ для C₆₉H₄₃F₆IrN₅OPS₂ расчётный: C, 60.96; H, 3.19; N, 5.15; экспериментальный: C, 60.67; H, 3.23; N, 4.99.

[Ir(N[^]C1)₂(N[^]N2)][PF₆] (K2). Тёмно-красный порошок, 47 мг, выход 89%. ¹H ЯМР ((CD₃)₂CO, 400 МГц, δ): 9.55 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 9.51 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 9.35 (d, J = 5.2 Гц, 1H), 9.21 (d, J = 5.2 Гц, 1H), 9.17 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 8.81 (dd, J = 9.0, 8.6 Гц, 2H), 8.48 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 8.43 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 8.27 (m, 2H), 8.19 (d, J = 8.4, 7.6 Гц, 1H), 8.18–8.09 (m, 4H), 8.08 (d, J = 8.1 Гц, 1H), 8.05 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 7.81 (dd, J = 7.6, 6.0 Гц, 1H), 7.77 (d, J = 8.1 Гц, 1H), 7.73 (d, J = 8.2 Гц, 1H), 7.65 (d, J = 8.2 Гц, 2H), 7.48 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 7.38 (d, J = 8.7 Гц, 2H), 7.31 (dd, J = 7.8, 7.4 Гц, 1H), 7.27–7.21 (m, 3H), 6.91 (dd, J = 8.7, 8.3 Гц, 2H), 6.86 (dd, J = 8.2, 8.0 Гц, 1H), 6.77 (d, J = 8.8 Гц, 2H), 6.74–6.69 (m, 3H). HRMS (ESI) m/z: 1307.1376 расчётный для C₆₈H₃₉BrIrN₆O₂S₂⁺ [M]⁺, экспериментальный 1307.1417. Элементный анализ для C₆₈H₃₉BrF₆IrN₆O₂PS₂ расчётный: C, 56.20; H, 2.71; N, 5.78; экспериментальный: C, 55.98; H, 2.61; N, 5.47.

[Ir(N[^]C1)₂(N[^]N3)][PF₆] (K3). Тёмно-красный порошок, 37 мг, выход 90%. ¹H ЯМР ((CD₃)₂CO, 400 МГц, δ): 9.51 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 9.24 (m, 1H), 8.89 (dd, J = 7.0, 6.2 Гц, 2H), 8.71 (m, 1H), 8.53 (d, J = 8.2 Гц, 1H), 8.47 (d, J = 8.2 Гц, 1H),

8.39 (d, J = 7.9 Гц, 1H), 8.17 (dd, J = 8.6, 8.0 Гц, 1H), 8.14 (dd, J = 8.6, 8.0 Гц, 1H), 8.07 (d, J = 8.1 Гц, 1H), 8.05–7.95 (m, 4H), 7.92 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 7.72 (dd, J = 7.2, 6.8 Гц, 1H), 7.56 (m, 1H), 7.37 (d, J = 8.7 Гц, 1H), 7.36–7.21 (m, 6H), 7.08 (m, 1H), 6.98 (d, J = 8.2 Гц, 1H), 6.87 (d, J = 8.2 Гц, 1H), 6.83 (d, J = 8.4, 8.0 Гц, 1H), 6.72 (dd, J = 7.8, 7.4 Гц, 2H), 6.41 (dd, J = 8.2, 7.8 Гц, 1H). HRMS (ESI) m/z: 1008.1808 расчётный для $C_{54}H_{33}IrN_5S_2^+$ $[M]^+$, экспериментальный 1008.1806. Элементный анализ для $C_{54}H_{33}F_6IrN_5PS_2$ расчётный: C, 56.24; H, 2.88; N, 6.07; экспериментальный: C, 56.01; H, 2.83; N, 5.84.

$[Ir(N^{\wedge}C1)_2(N^{\wedge}N4)][PF_6]$ (K4). Тёмно-красный порошок, 38 мг, выход 92%. 1H ЯМР ($(CD_3)_2CO$, 400 МГц, δ): 9.53 (d, J = 8.1 Гц, 2H), 9.31 (d, J = 5.3 Гц, 2H), 8.79 (d, J = 8.0 Гц, 2H), 8.64 (d, J = 8.3 Гц, 2H), 8.41 (d, J = 8.2 Гц, 2H), 8.18 (dd, J = 7.4, 7.0 Гц, 2H), 8.12 (dd, J = 8.2, 7.6 Гц, 2H), 8.09 (d, J = 8.3 Гц, 2H), 8.07 (d, J = 8.1 Гц, 2H), 7.98 (s, 2H), 7.52 (d, J = 8.6 Гц, 2H), 7.25 (dd, J = 7.4, 7.0 Гц, 2H), 7.23 (dd, J = 7.8, 7.4 Гц, 2H), 6.96 (d, J = 8.2 Гц, 2H), 6.75 (dd, J = 9.2, 8.9 Гц, 2H), 6.73 (dd, J = 8.4, 8.0 Гц, 2H). HRMS (ESI) m/z: 993.1699 расчётный для $C_{54}H_{32}IrN_4S_2^+$ $[M]^+$, экспериментальный 993.1704. Элементный анализ для $C_{54}H_{32}F_6IrN_4PS_2$ расчётный: C, 56.99; H, 2.83; N, 4.92; экспериментальный: C, 56.22; H, 2.92; N, 4.64.

Синтез лиганда $N^{\wedge}C2$. Метил-6-хлороникотинат (0.75 г, 4.370 ммоль), бензо[b]тиофен-2-илборную кислоту (0.895 г, 5.026 ммоль) и тетраakis(трифенилфосфин)палладий (0.076 г, 0.066 ммоль) поместили в стеклянную пробирку объёмом 50 мл, добавили в качестве растворителя 30 мл диоксана, а также 5 мл 2Н раствора K_2CO_3 . Реакционную смесь поставили на масляную баню при 95°C на сутки.

Органическую фазу отделили на делительной воронке, продукт экстрагировали из водной фазы 40 мл хлористого метилена, после чего промывали 15 мл смеси воды и рассола (1:1). Органические фазы

объединили и сушили над безводным Na_2SO_4 , после чего отфильтровали от осушителя и упарили растворитель. Продукт очистили при помощи колоночной хроматографии (силикагель, элюент: этилацетат:хлористый метилен 1:30). Масса полученного продукта 529 мг, выход 45%. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ (ppm) 3.97 (s, 3H), 7.40 (d, $J=7.50$ Гц, 2H), 7.81-7.90 (m, 3H), 7.91 (s, 1H), 8.34 (d, $J=8.10$ Гц, 1H), 9.21 (s, 1H).

Полученный метил-6-(бензо[b]тиофен-2-ил)никотинат (529 мг, 1.96 ммоль) поместили в круглодонную колбу объёмом 50 мл, оснащённую обратным холодильником. Туда же добавили 22 мл метанола и KOH (220 мг, 3.92 ммоль). Смесь кипятили сутки. Полученный серый осадок подкислили 1M раствором HCl до pH 4-5, отцентрифугировали и три раза промыли 5 мл воды, после чего три раза промыли 5 мл тетрагидрофурана. Растворитель упарили досуха. Масса полученного продукта 302 мг, выход 60%. ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-\text{D}_6$): δ (ppm) 7.41-7.46 (m, 2H), 7.94 (m, 1H), 8.02 (m, 1H), 8.24 (d, $J = 8.3$ Гц, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.36 (d, $J = 6.1$ Гц, 1H), 9.08 (d, $J = 2.1$ Гц, 1H).

Модификация $\text{N}^{\wedge}\text{C}2$ лиганда. В баночку объёмом 5 мл поместили $\text{N}^{\wedge}\text{C}2$ лиганд (80.0 мг, 0.31 ммоль), 2,5,8,12,15,18-гексаоксанодекан-10-амин (114.5 мг, 0.39 ммоль), триэтиламин (34.5 мг, 0.34 ммоль), 1,3-дициклогексилкарбодиимид (70.4 мг, 0.34 ммоль), N-гидроксисукцинимид (39.2 мг, 0.34 ммоль) и 4-диметиламинопиридин (1.1 мг, 0.01 ммоль). Туда же в качестве растворителя добавили 1 мл сухого ДМСО и поставили на двое суток при перемешивании и комнатной температуре. По истечении двух суток в реакционную смесь добавили 55 мг (3.1 ммоль) воды и оставили ещё на двое суток.

Растворитель упарили. Сухой остаток промыли два раза водой, тщательно высушили, после чего суспензировали в 5 мл ацетонитрила и поставили на ночь в морозильную камеру (-18°C). Раствор отделили от осадка при

помощи ультрацентрифугирования и упарили. В полученный маслянистый остаток добавили 2 мл воды, выдержали 10 минут в ультразвуковой бане, после чего водный раствор декантировали и осадок тщательно высушили при вакуумировании. Маслянистый остаток растворили в 5 мл хлористого метилена, оставили в морозильной камере на ночь, после чего вновь отделили раствор от осадка после ультрацентрифугирования и тщательно высушили. Выход полученного продукта составил 95.7 мг (58%). ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц, δ): 9.02 (s, 1H), 8.19 (d, $J = 8.3$ Гц, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.88-7.81 (m, 3H), 7.39- 7.34 (m, 2H), 7.04 (d, $J = 8.1$ Гц, NH), 4.45 (m, 1H, CH), 3.81-3.51 (m, 20H, CH_2), 3.35 (s, 6H, CH_3).

Синтез 2-азидопиридина. 2-бромпиридин (600 мг, 3.80 ммоль), N,N,N'N'-тетраметилэтилендиамин (TMEDA) (133 мг, 3.80 ммоль), азид натрия (272 мг, 4.2 ммоль), аскорбат натрия (376 мг, 1.90 ммоль) и CuI (130 мг, 0.68 ммоль) поместили в стеклянную пробирку объёмом 50 мл, туда же в качестве растворителя добавили смесь 14 мл этанола и 6 мл воды. Реакционную смесь в пробирке дегазировали путём пропускания аргона через раствор в течение 15 минут и оставили на ночь на масляной бане при 80°C при перемешивании.

Реакционную смесь разбавили 40 мл воды, продукт экстрагировали 150 мл хлористого метилена и отделили органический слой на делительной воронке. Затем его тщательно промыли раствором 0.254 г ЭДТА в 50 мл воды, а далее 50 мл рассола. Органический слой сушили над Na_2SO_4 , а затем после фильтрования растворитель упарили. Выход полученного продукта 340 мг (75%). ^1H ЯМР (CD_3Cl , 400 МГц, δ): 7.24 (td, 1H, $J = 6.9$ Гц, 1.0 Гц), 7.68 (ddd, 1H, $J = 9.0$ Гц, 7.0 Гц, 1.1 Гц), 8.05 (dt, 1H, $J = 9.0$ Гц, 1.1 Гц), 8.84 (dt, 1H, $J = 7.0$ Гц, 1.1 Гц).

Синтез 4-оксо-4-((1-(пиридин-2-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)бутановой кислоты. 4-оксо-4-(проп-2-ин-1-илокси)бутановую кислоту (156 мг, 1 ммоль), 2-азидопиридин (120 мг, 1 ммоль), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (250 мг, 1 ммоль) и аскорбат натрия (199 мг, 2 ммоль) поместили в круглодонную колбу объёмом 50 мл, куда добавили в качестве растворителя 10 мл диметилформамида. Колбу закрыли септой, обернули фольгой для защиты от света и поставили на масляную баню при 60°C на 7 дней при перемешивании.

Полученную суспензию поместили в делительную воронку, разбавили 90 мл хлороформа, после чего тщательно промыли трёмя порциями смеси вода/рассол 1:1 по 10 мл. Далее органическую фазу промыли раствором 200 мг ЭДТА в 20 мл смеси вода/рассол 1:1, к которому добавили 5 капель пероксида водорода (30%). После этого промыли органическую фазу раствором 200 мг лимонной кислоты в 10 мл чистого рассола, а затем 10 мл чистого рассола. Раствор в хлороформе сушили над Na_2SO_4 , затем отфильтровали от осушителя и упарили растворитель. В сухой остаток добавили 0.5 мл хлороформа и 7 мл н-гептана, частично упарили (наполовину), растворитель декантировали и после этого осадок тщательно высушили при вакуумировании. Выход продукта 133 мг (48%). ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц, δ): 8.73 (s, 1H), 8.58 (d, J = 4.0 Гц, 1H), 8.19 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 8.73 (s, 1H), 8.58 (d, J = 5.0 Гц, 1H), 8.18 (d, J = 8.1 Гц, 1H), 8.12 (dd, J = 7.3 Гц, 8.1 Гц, 1H), 7.53 (dd, J = 5.0 Гц, 7.3 Гц, 1H), 5.31 (s, 2H, CH_2), 2.65 (m, 4H, CH_2CH_2).

Синтез N^5 лиганда [(1-(пиридин-2-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил бензоат]. Проп-2-ин-1-илбензоат (88.1 мг, 0.55 ммоль), 2-азидопиридин (69.2 мг, 0.58 ммоль), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (137.3 мг, 0.55 ммоль) и аскорбат натрия (218 мг, 1.1 ммоль) поместили в круглодонную колбу объёмом 50 мл, куда добавили в качестве растворителя смесь 10 мл этанола и 2 мл воды. Колбу

закрыли септой, обернули фольгой для защиты от света и оставили на масляной бане на двое суток при 40°C при перемешивании.

Реакционную смесь поместили в делительную воронку, разбавили 50 мл хлороформа и тщательно промыли тремя порциями смеси вода/рассол 1:1 по 10 мл. Далее органическую фазу промыли последовательно раствором 200 мг ЭДТА в 20 мл воды и 10 мл чистого рассола. Раствор в хлороформе сушили над Na₂SO₄ и упарили растворитель после фильтрования. Сухой остаток растворили в 3 мл хлороформа и 10 мл н-гептана, упарили смесь растворителей примерно до 5 мл, после чего декантировали растворитель и тщательно высушили при вакуумировании. Выход продукта 66 мг (42%).
¹H ЯМР ((CD₃)₂CO, 400 МГц, δ): 8.88 (s, 1H), 8.61 (d, J = 4.9 Гц, 1H), 8.21 (d, J = 8.2 Гц, 1H), 8.15 (td, J = 8.3, 1.9 Гц, 1H), 8.08 (d, J = 7.8 Гц, 2H), (t, J = 7.3 Гц, 1H), 7.59 – 7.49 (m, 3H), 5.58 (s, 2H).

Синтез лиганда N^N6 [2, 5-диоксопирролидин-1-ил((1-(пиридин-2-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метилсукцинат)]. В баночку объёмом 5 мл поместили 4-оксо-4-((1-(пиридин-2-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)бутановую кислоту (26.0 мг, 95.1 мкмоль), N-гидроксисукцинимид (10.8 мг, 94.1 мкмоль), 1,3-дициклогексилкарбодиимид (19.4 мг, 94.1 мкмоль) и 4-диметиламинопиридин (0.5 мг, 4.7 мкмоль), куда в качестве растворителя добавили 1 мл сухого ацетонитрила. Смесь оставили при перемешивании и комнатной температуре на 20 часов.

Реакционную смесь отцентрифугировали, отделили раствор и упарили. Сухой остаток растворили в 3 мл сухого ацетонитрила и поставили в морозильную камеру на ночь. Затем раствор отделили от осадка путём ультрацентрифугирования. Растворитель упарили, после чего сухой остаток промыли 3-5 мл сухого н-гептана на ультразвуковой бане. Растворитель декантировали, осадок тщательно высушили при вакуумировании. Выход продукта 21.4 мг (61%).
¹H ЯМР ((CDCl₃, 400 МГц, δ): 8.65 (s, 1H), 8.53 (broad

s, 1H), 8.20 (d, $J = 8.3$ Гц, 1H), 7.94 (t, $J = 7.9$ Гц, 1H), 7.38 (dd, $J = 7.5, 4.8$ Гц, 1H), 5.38 (s, 2H), 2.99 (t, $J = 7.0$ Гц, CH₂, 2H), 2.83 (m, 3CH₂, 6H).

Синтез димерного комплекса [Ir₂(N[^]C3)₄Cl₂]. IrCl₃·6H₂O (30.5 мг, 0.075 ммоль) и N[^]C3 лиганд (80 мг, 0.150 ммоль) поместили в круглодонную колбу объёмом 25 мл, оснащённую обратным холодильником, туда же в качестве растворителя добавили смесь 1.5 мл воды и 4.5 мл метоксиэтанола. Реакционную смесь поставили на масляную баню при перемешивании и 100°C на сутки.

Полученный тёмно-красный раствор тщательно упарили, сухой остаток растворили в 0.4 мл хлороформа и суспензировали 3 мл н-гептана. Суспензию выдержали на ультразвуковой бане в течение 10 минут, растворитель декантировали, остаток высушили при вакуумировании. После этого его дважды промыли водой (2 раза по 1 мл) и высушили при вакуумировании. Вещество растворили в 1 мл хлористого метилена и поставили в морозильную камеру на 3 часа. Смесь отцентрифугировали, отделили раствор и упарили его. Полученное твёрдое вещество растворили в 0.3 мл хлористого метилена и суспензировали 3 мл диэтилового эфира и 1 мл н-гептана, после чего отцентрифугировали, декантировали растворитель и тщательно высушили полученное твёрдое тёмно-красное вещество при очень низком давлении. Выход продукта 155 мг (80%). ¹H ЯМР ((CD₃)₂SO, 400 МГц, δ): 10.39 (s, 1H), 10.11 (s, 1H), 8.74 (d, $J = 8.0$ Гц, 1H, NH), 8.65 (d, $J = 8.0$ Гц, 1H, NH), 8.60 (d, $J = 8.4$ Гц, 1H), 8.51 (d, $J = 8.4$ Гц, 1H), 8.04 (d, $J = 8.4$ Гц, 1H), 7.89 (d, $J = 8.4$ Гц, 1H), 7.86 (d, $J = 8.1$ Гц, 1H), 7.81 (d, $J = 8.2$ Гц, 1H), 7.22 (t, $J = 7.7$ Гц, 1H), 7.15 (t, $J = 7.7$ Гц, 1H), 6.92 (t, $J = 7.7$ Гц, 1H), 6.78 (t, $J = 7.7$ Гц, 1H), 6.25 (d, $J = 8.1$ Гц, 1H), 5.56 (d, $J = 8.3$ Гц, 1H), 4.30 (m, 2H, CH), 3.63-3.42 (m, 40H, CH₂), 3.23 (s, 9H, CH₃), 3.22 (s, 3H, CH₃). HRMS (ESI) m/z : 1313.3537 расчётный для C₅₄H₇₀ClIr₂N₄NaO₁₄S₂⁺ [Ir(N[^]C)2Cl+Na]⁺, экспериментальный 1313.3737.

Общая процедура синтеза комплексов K5 и K6 $[\text{Ir}(\text{N}^{\wedge}\text{C3})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N}\#)]\text{PF}_6$. Димерный комплекс $[\text{Ir}_2(\text{N}^{\wedge}\text{C3})_4\text{Cl}_2]$ (17.3 мг, 6.7 мкмоль), соответствующий $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ лиганд (13.4 мкмоль) и KPF_6 (25 мг, 134 мкмоль) поместили в баночку объёмом 5 мл, куда в качестве растворителя добавили 2 мл сухого ацетона. Смесь поставили на сутки при комнатной температуре и перемешивании.

Комплекс K5. Растворитель упарили, сухой остаток промыли водой два раза на ультразвуковой бане, после чего тщательно высушили. Сухой остаток растворили в 2 мл метанола, центрифугировали. Раствор отделили и упарили. Сухой остаток растворили в 10 мл этилацетата, центрифугировали, после этого ярко-жёлтый раствор отделили и упарили. Остаток растворили в 0.3 мл метанола и суспензировали в смеси 3 мл диэтилового эфира и 1 мл н-гептана, центрифугировали, растворитель декантировали. Процедуру повторили ещё два раза, после чего осадок тщательно высушили при вакуумировании. Ярко-красное твёрдое вещество, выход продукта 16 мг (76%). ^1H ЯМР (400 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ): 9.72 (s, 1H), 8.80 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.59 (dd, $J = 8.8, 1.6$ Hz, 1H), 8.49 (ddd, $J = 13.7, 8.7, 1.6$ Hz, 2H), 8.21 (dd, $J = 6.8, 1.6$ Hz, 2H), 8.15 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 8.02 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.96 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.86 (m, 2H), 7.68 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.55 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.32 – 7.21 (m, 2H), 6.94 (m, 2H), 6.15 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 5.55 (s, 2H), 4.22 (m, 2H), 3.74 – 3.35 (m, 40H), 3.35-3.17 (m, 12H). HRMS (ESI) m/z : 1535.4900 расчётный для $\text{C}_{69}\text{H}_{82}\text{IrN}_8\text{O}_{16}\text{S}_2^+$, экспериментальный 1535.4923.

Комплекс K6. Растворитель упарили, сухой остаток промыли 6 мл смеси сухой диоксан/сухой диэтиловый эфир 2:1, центрифугировали. Раствор отобрали, растворитель упарили, сухой остаток промыли 2 раза сухим диэтиловым эфиром с последующим центрифугированием и декантацией растворителя. Осадок тщательно высушили при вакуумировании. Ярко-красное твёрдое вещество, выход продукта 13.5 мг (62%). ^1H ЯМР (400 МГц,

(CD₃)₂CO, δ): 9.57 (s, 1H), 8.79 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.61 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.54 – 8.46 (m, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.21 – 8.09 (m, 2H), 8.00 (dd, *J* = 10.7, 8.4 Hz, 2H), 7.90 (dd, *J* = 15.5, 8.1 Hz, 2H), 7.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.71 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.27 (dt, *J* = 14.5, 7.7 Hz, 2H), 6.92 (dt, *J* = 15.3, 7.6 Hz, 2H), 6.14 (dd, *J* = 16.2, 8.3 Hz, 2H), 5.37 (d, *J* = 14.2 Hz, 1H), 5.29 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 4.29 (m, 2H), 3.81-3.40 (m, 40H), 3.37-3.17 (m, 12H), 3.31 (m, 4H), 3.23 (m, 4H). HRMS (ESI) *m/z*: 1572.5213 расчётный для C₆₉H₈₇IrN₈O₁₈S₂⁺, экспериментальный 1572.5754.

Получение ковалентного конъюгата и нековалентного аддукта комплексов с бычьим сывороточным альбумином (Bovine Serum Albumin, BSA)

Нековалентный аддукт K5-BSA. Нековалентный аддукт комплекса K5 с альбумином был получен по следующим двум процедурам:

- 63.0 мг (0.95 мкмоль) BSA растворили в смеси 1600 мкл воды и 200 мкл фосфатного солевого буфера (Phosphate-buffered saline, PBS) с pH 7.45 в баночке объёмом 5 мл. При сильном перемешивании к раствору альбумина по каплям добавили раствор 1.5 мг (0.95 мкмоль) комплекса K5 в смеси 100 мкл полиэтиленгликоля-200 (PEG-200) и 100 мкл воды. Реакционную смесь обернули фольгой для защиты от света и оставили на сутки при сильном перемешивании. После этого смесь ультрацентрифугировали и провели диализ раствора в бидистиллированной воде. Затем полученный раствор подвергли лиофильной сушке в течение трёх суток.
- 49.16 мг (0.74 мкмоль) BSA растворили в смеси 1600 мкл воды и 200 мкл фосфатного солевого буфера (PBS) с pH 7.45 в баночке объёмом 5 мл. При сильном перемешивании к раствору альбумина по каплям добавили раствор 1.16 мг (0.74 мкмоль) комплекса K5 в 200 мкл сухого ДМСО. Реакционную смесь обернули фольгой для защиты от света и

оставили на сутки при сильном перемешивании. После этого смесь ультрацентрифугировали и провели диализ раствора в бидистиллированной воде. Затем полученный раствор подвергли лиофильной сушке в течение трёх суток.

Ковалентный конъюгат K6-BSA. Ковалентный конъюгат комплекса K6 с альбумином был получен по следующей процедуре: 48.49 мг (0.73 мкмоль) BSA растворили в смеси 1600 мкл воды и 200 мкл фосфатного солевого буфера (PBS) с pH 8.10 в баночке объёмом 5 мл. При сильном перемешивании к раствору альбумина по каплям добавили раствор 1.19 мг (0.74 мкмоль) комплекса K6 в 200 мкл сухого ДМСО. Реакционную смесь обернули фольгой для защиты от света и оставили на сутки при сильном перемешивании. После этого смесь ультрацентрифугировали и провели диализ раствора в бидистиллированной воде. Затем полученный раствор подвергли лиофильной сушке в течение трёх суток.

Во всех трёх случаях выходы продукта составили 90-95%.

Фотофизические эксперименты

Фотофизические измерения в растворе были проведены в водных средах, а также в метаноле, который был предварительно перегнан и высушен. Спектры поглощения были измерены с использованием спектрофотометра Shimadzu UV-1800. Спектры возбуждения в растворе были зарегистрированы с использованием спектрофлуориметра Fluorog-3 (HORIBA Jobin Yvon). Спектры испускания были зарегистрированы с использованием спектрометра Avanted AvaSpec-2048x64. Абсолютные квантовые выходы люминесценции в растворе были определены по формуле (2) методом сравнения. Для возбуждения был использован диод (длина волны 365 нм), в качестве образца сравнения был использован водный раствор $[\text{Ru}(\text{bpy})_3][\text{PF}_6]_2$ ($\Phi = 0.040$ в аэрированном растворе, 0.063

в дегазированном растворе). Для измерений вре́мен жизни возбуждённого состояния были использованы импульсный лазер DTL-355 Basic (длина волны 355 нм, длительность импульса 5 нс, частота 1000 Гц), счётчик фотонов Hamamatsu (H10682-01), цифровой преобразователь времени нескольких событий FASTComTec (MCS6A1T4) и монохроматор Ocean Optics (Monoscan-2000, интервал длин волн 1 нм). Кислородный датчик (PyroScience FireStingO2, оборудованный зондом OXROB10 и температурным сенсором TDIP15) был использован для определения парциального давления и концентрации молекулярного кислорода в водных растворах. Температурный контроль осуществлялся при помощи кюветного отделения Quantum Northwest qpod-2e.

Приготовление водных растворов комплекса K1. К раствору комплекса K1 в PEG(200) (22.5 мкл, концентрация 333 мкмоль/л) добавили соответствующее количество (1) фосфатного солевого буфера (Phosphate-buffered saline, PBS), или (2) 50 мкмоль/л раствора BSA в PBS, или (3) питательной среды Дальбекко (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM), содержащей 10% сыворотки крупного рогатого скота (Fetal Bovine Serum, FBS) (1477.5 мкл), после чего тщательно перемешали в течение 1 минуты и затем инкубировали при 37°C на 24 часа. Таким образом, были приготовлены растворы PBS/PEG(200), PBS/BSA/PEG(200) и DMEM/FBS/PEG(200) с концентрацией комплекса 5 мкмоль/л и объёмной долей PEG(200) 1.5%. Концентрация буферного раствора PBS для фотофизических измерений – 0.01 моль/л, $C_{\text{NaCl}} = 0.14$ моль/л, pH = 7.4. Концентрация PBS для гель-проникающей хроматографии – 0.01 моль/л, $C_{\text{NaCl}} = 0.14$ моль/л, pH = 6.8.

Клеточные эксперименты. В клеточных экспериментах, *проведённых коллегами*, были использованы использованы клетки яичника китайского хомяка CHO-K1 в среде DMEM/F12 (Biolog, Санкт-Петербург) с добавлением

10% сыворотки FBS (Gibco, Карлсбад, Калифорния, США), 2 ммоль/л раствора глутамин (Gibco, Карлсбад, Калифорния, США) и пенициллина/стрептомицина в концентрации 100 Ед/мл (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). С клетками работали в инкубаторе с увлажнением при 37°C, 5% CO₂ и пассировали с использованием смеси трипсина и ЭДТА (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Для проведения конфокальной микроскопии живых клеток их высаживали в концентрации 0.5·10⁵ клеток на 1 мл ростовой среды в стеклянные чашки Петри диаметром 35 мм (Ibidi GmbH, Грефелинг, Германия) и инкубировали в течение 48 часов до достижения концентрации клеток в 60-70%. Комплекс K1 был растворён в PEG(200) в концентрации 1 ммоль/л и смешан с необходимым объёмом PEG(200) и разбавлен ростовой средой таким образом, чтобы достичь концентрации 10 мкмоль/л. После инкубирования с комплексом в течение 24 часов клетки промыли свежей ростовой средой со всеми добавленными компонентами, описанными выше.

Анализ колокализации. Для селективного подкрашивания митохондрий в клетках CHO их инкубировали с красителем BioTracker 405 Blue Mitochondria Dye (Sigma-Aldrich, Merck, Мюнхен, Германия) в концентрации 50 нмоль/л в течение 15 минут. Для подкрашивания лизосом был использован краситель LysoTracker Green DND-26 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) в концентрации 50 нмоль/л, время инкубирования 30 минут. Для подкрашивания клеточных ядер был использован краситель Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) в концентрации 2 нмоль/л.

Определение токсичности. Цитотоксичность комплекса K1 была определена *коллегами* путём проведения МТТ-теста. Клетки CHO-K1 высадили в микропланшет на 96 лунок (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) в концентрации 1·10⁴ клеток на 100 мкл

ростовой среды в одну лунку и инкубировали на ночь. Комплекс K1 был растворён в ДМСО или PEG(200) в концентрации 1 ммоль/л, раствор был смешан с ростовой средой и добавлен к клеткам в итоговой концентрации от 0 до 150 мкмоль/л. После инкубирования в течение 24 часов клетки обрабатывали реагентом МТТ (3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид) (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) в концентрации 0.5 мг/мл в соответствии с протоколом, указанным производителем. После дальнейшего инкубирования при 37°C под 5% CO₂ в течение 3 часов ростовую среду удалили, и кристаллы формазана растворили в 100 мкл ДМСО (Merck, Мюнхен, Германия). Оптическая плотность в каждой лунке была измерена при 570 нм с использованием считывателя микропланшетов SPECTROstar Nano (BMG LAB-TECH, Ортенберг, Германия). Выживаемость клеток была определена как отношение средней оптической плотности раствора в лунках, содержащих конъюгат, к оптической плотности контрольных растворов. Результаты представлены как среднее ± стандартное отклонение при 5-12 измерениях.

Конфокальная микроскопия. Визуализация (имиджинг) живых клеток СНО-K1 была проведена *коллегами* с использованием инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti2 (Nikon Corporation, Токио, Япония) с объективом для масляной иммерсии (увеличение x60). Необходимая температура и ток 5% CO₂ в процессе эксперимента были обеспечены при помощи инкубатора Stage Top Incubator Tokai HIT (Япония), оборудованного цифровым газосмесителем GM-8000. Эмиссия образцов возбуждалась на 405 нм и регистрировалась в красном (570-620 нм) канале. Флуоресценция красителей Hoechst 33342 и BioTracker 405 Blue возбуждалась на 405 нм и регистрировалась на 425-475 нм. Излучение LysoTracker Green возбуждали на 488 нм и регистрировали на 500-550 нм. Изображения дифференциальной контрастной интерференции (DIC) были получены в дополнение к микрофотографиям флуоресценции. Изображения были

обработаны при помощи программного обеспечения ImageJ (National Institutes of Health, Бетесда, Мэриленд, США). Для количественного анализа колокализации и определения коэффициентов колокализации Пирсона (P) и Мандерса (M1 и M2) использовали плагин ImageJ JACoP Plugin. Предельные значения при расчётах M1 и M2 были заданы визуально определяемым значением для каждого канала. Результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение для примерно 50 клеток.

PLIM эксперименты. Микроскопия PLIM (фосфоресцентный имиджинг с временным разрешением) клеток CHO-K1 была проведена *коллегами* с использованием конфокального микроскопа Nikon Eclipse Ti2, оборудованного скоррелированным во времени счётчиком одиночных фотонов (TCSPC) DCS-120 (Becker&Hickl GmbH, Берлин, Германия). Эмиссия образцов возбуждалась пикосекундным лазером (405 нм), фосфоресценция регистрировалась в диапазоне 690-750 нм с использованием фильтра на 720/60 нм. Объектив для масляной иммерсии (x60) с увеличением 5.33 обеспечивал область сканирования в 0.5 мм×0.5 мм. Для получения PLIM-изображений с K1 были использованы следующие настройки: время кадра 14.53 с, время удержания пикселя 54.90 мкс, число точек 1024, время на одну точку 50.00 нс, временной диапазон регистрации PLIM 51.20 мкс, общее время накопления 120-150 с. Размер изображения - 512×512 пикселей. Распределение времён жизни фосфоресценции было рассчитано с использованием программного обеспечения SPCLImage 8.1 (Becker&Hickl GmbH, Берлин, Германия). Кривые спада интенсивности фосфоресценции аппроксимировали моноэкспоненциальной функцией спада со средней точностью $0.8 \leq \chi^2 \leq 1.2$. Начальный фрагмент кривой спада отбрасывали (1 мкс). Среднее число фотонов на кривую было не менее 2500 при объединении 8-9.

Результаты и обсуждение

Серия комплексов K1-K4

Синтез и характеристика

Была синтезирована серия из четырёх катионных комплексов иридия(III) с общей формулой $[\text{Ir}(\text{N}^{\wedge}\text{C})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N}\#)]^+[\text{PF}_6]^-$ (см. схему на рис.10). В данной серии комплексов ортометаллирующий $\text{N}^{\wedge}\text{C}$ лиганд не менялся, однако изменялась природа дииминного $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ лиганда, чтобы исследовать, как влияет ароматическая система в составе $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ лиганда на характеристики эмиссии итогового продукта.

Сначала была проведена реакция циклометаллирования (рис. 10). В качестве растворителя были взяты 2-этоксиэтанол и вода, так как исходные вещества хорошо растворимы в них, а целевой димер, наоборот, выпадает в осадок. Энергетический барьер этой реакции довольно высок, поэтому потребовалось нагревание.

При выделении продукта смесь сперва промывали водой, чтобы удалить неорганические примеси, например, часть непрореагировавшего хлорида иридия. Промывание метанолом позволило избавиться от полярных органических примесей, таких как непрореагировавший $\text{N}^{\wedge}\text{C}$ лиганд либо трис-циклометаллированный моноядерный комплекс, ведь они хорошо в нём растворимы. Далее смесь промывали диэтиловым эфиром, чтобы окончательно избавиться от органических неполярных примесей, а также для того, чтобы легче высушить целевой димерный комплекс.

Далее были последовательно проведены реакции димерного комплекса с соответствующими $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ лигандами (рис. 10). Здесь нагревание уже не потребовалось. Кроме дииминных лигандов, в данной реакции был использован в качестве реагента KPF_6 , для того чтобы сместить равновесие

в реакции в сторону продуктов, поскольку в этом случае хлорид-ионы выводятся в виде нерастворимого в хлороформе и ацетоне осадка KCl, не позволяя димеру образовываться снова.

В качестве растворителей были выбраны хлороформ и ацетон, поскольку в хлороформе димер хорошо растворим, а в ацетоне хорошо растворимы целевой комплекс и KPF_6 . Промывали целевой комплекс сначала водой, удаляя остатки KPF_6 и KCl, потом растворяли в ацетоне, чтобы перенести в колбу и после этого выпарить растворители. Далее с помощью диэтилового эфира целевой комплекс высадили и удалили растворимые в нём малополярные органические примеси, а после этого целевой комплекс тщательно высушили.

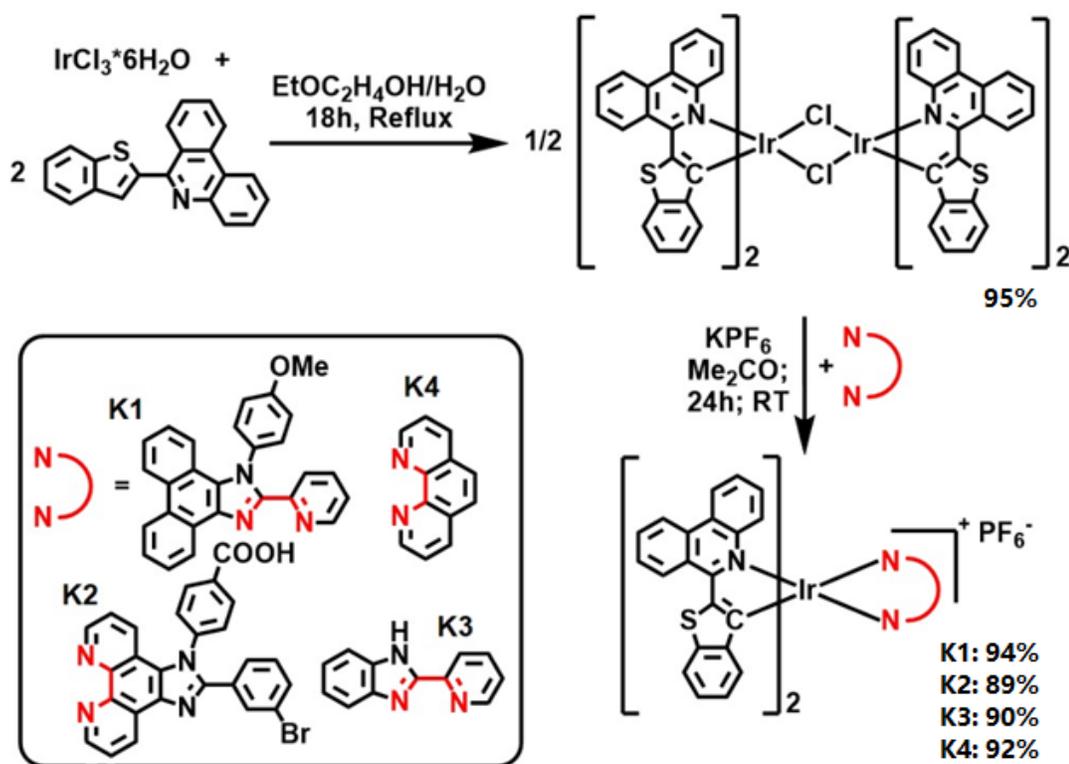


Рис. 10. Схема синтеза димерного комплекса и серии K1-K4

Все комплексы были охарактеризованы методами ^1H , а также 2D COSY и NOESY ЯМР спектроскопии, масс-спектрометрии и элементного анализа. Полученные ЯМР спектры подтверждают предполагаемую структуру

соединений. В данных координационных соединениях N- и C-функции циклометаллирующих лигандов находятся в *транс*- и *цис*-положениях, соответственно, а остальные два положения в октаэде занимает дииминный лиганд, находящийся в *транс*-положении к C-функциям N^C лигандов, что достаточно типично для координационной сферы подобных комплексов.^[25,28–31] Пики в масс-спектрах с высокой точностью соответствуют расчётным для данной серии комплексов. ЯМР спектры и масс-спектры см. в Приложении (Рис. П1-П8). Однако, монокристаллы для этих комплексов вырастить не удалось.

Фотофизические измерения

Все комплексы проявляют люминесценцию в метаноле, их фотофизические характеристики приведены в Таблице 1.

Спектры возбуждения, эмиссии и поглощения представлены на рис.11, рис. 12, соответственно. Максимумы полос поглощения низкоэнергетических переходов лежат в области 520-540 нм.

Таблица 1. Фотофизические свойства соединений K1-K4 в растворе метанола, 298K, возбуждение эмиссии на длине волны 355 нм, накопление данных при 720 нм

	$\tau_{aer} (\mu s)$	$\tau_{deg} (\mu s)$	τ_{deg}/τ_{aer}	QY _{aer} (%)	QY _{deg} (%)
K1	0.41	3.32	8.2	1.7	13.6
K2	0.28	2.34	8.4	1.6	12.9
K3	0.25	1.76	7.0	1.5	10.3
K4	0.27	2.22	8.2	1.6	12.7

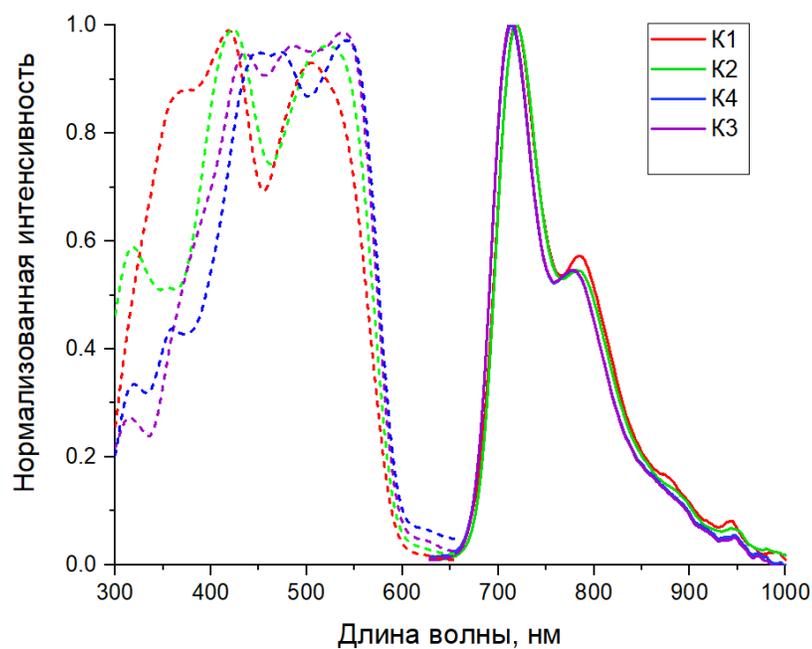


Рис.11. Нормированные спектры возбуждения (штриховая линия) и эмиссии для K1-K4 в растворе метанола при 298К. Эмиссия возбуждалась на 365 нм, спектры возбуждения зарегистрированы на 720 нм.

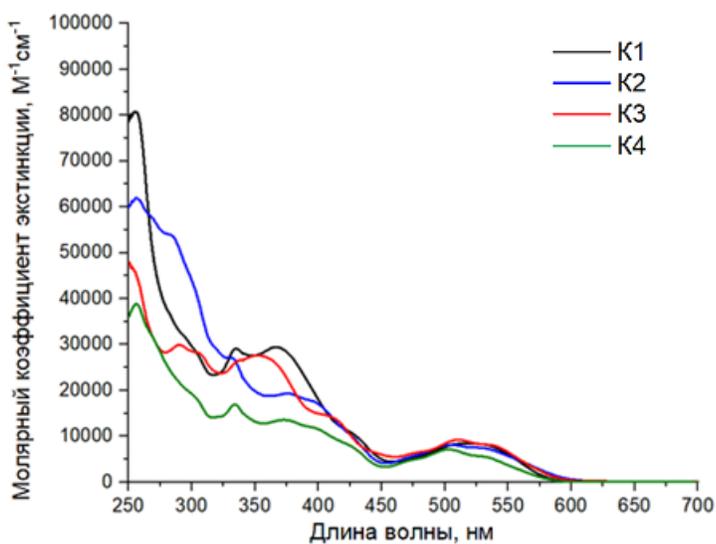


Рис.12. Спектры поглощения данной серии соединений в метаноле при 298К

В ближней ИК области все комплексы имеют похожие характеристики эмиссии с максимумом на длине волны примерно 720 нм. Полосы имеют

колебательную структуру с интервалом около 1250 см^{-1} , что соответствует типичным значениям частот колебаний ароматических систем в лигандном окружении металла. Это также указывает на преимущественно лиганд-центрированный характер природы возбуждённого состояния.

Времена жизни возбуждённого состояния принимают значения порядка нескольких микросекунд (см. Таблицу 1) и снижаются приблизительно на порядок в аэрированных растворах по сравнению с дегазированными. Это демонстрирует высокую чувствительность эмиссии данных соединений к присутствию молекулярного кислорода в растворе. Также такие значения времён жизни позволяют сделать вывод о том, что возбуждённое состояние имеет триплетный характер. Квантовые выходы фосфоресценции в растворе довольно высоки и принимают значения, близкие к полученным ранее экспериментальным результатам для схожих соединений. [25,28–31]

В целом, фотофизические характеристики не слишком сильно изменялись при замене N^N лиганда, поэтому можно предположить, что бóльший вклад в образование возбуждённого состояния вносит всё же N^C лиганд. Все эти результаты позволяют сказать, что данные соединения являются перспективными для применения в биологических экспериментах. Среди них для проведения клеточных экспериментов был выбран комплекс K1 как один из самых чувствительных сенсоров, а также он имеет наиболее высокую интенсивность эмиссии.

Чтобы повысить растворимость выбранного нами соединения K1 в физиологических средах, были приготовлены водные растворы K1, содержащие полиэтиленгликоль (200) (PEG(200)) (процедура описана в экспериментальной части), а также модельные растворы, содержащие сыворотку крупного рогатого скота (FBS) и питательную среду Дальбекко (DMEM). В таких модельных растворах была проведена калибровка Штерна-Фольмера, чтобы определить характеристики тушения фосфоресценции

кислородом (См. Рис. 13 и Таблицы 2, 3). Как видно, времена жизни в данных модельных средах отличаются от времён жизни, измеренных в растворах метанола (Таблица 1). Причина таких значительных различий заключается в наличии взаимодействия между гидрофобным сенсором и компонентами физиологических сред, преимущественно с альбумином (BSA), так как в его структуре есть гидрофобные карманы, в которые предположительно входит сенсор, из-за чего меняются характеристики его эмиссии. Чтобы это подтвердить, аналогичная калибровка была проведена в растворе, содержащем только BSA в качестве биологического компонента. В пределах погрешности, времена жизни в таком растворе совпадают с временами жизни в растворе с FBS и DMEM, что подтверждает данную гипотезу.

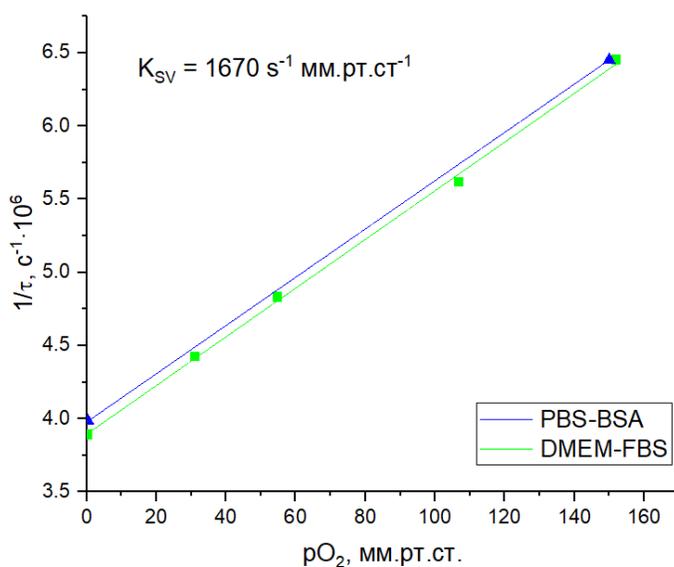


Рис. 13. Зависимость обратного времени жизни от парциального давления кислорода для водных растворов K1, содержащих (1) DMEM, FBS и PEG(200) (зелёная линия); (2) буфер PBS и бычий сывороточный альбумин BSA (синяя линия). Температура 310К, возбуждение эмиссии на длине волны 355 нм, накопление данных при 720 нм. Составы сред: FBS – 10% об.; DMEM 88.5% об.; PBS (0.01 M, pH 7.4) – 98.5% об.; PEG(200) – 1.5% об.; концентрация BSA – 50 μM ; концентрация K1 – 5 μM

Таблицы 2 и 3. Времена жизни K1 в водных растворах в зависимости от парциального давления кислорода. Температура 310K, возбуждение эмиссии на длине волны 355 нм, накопление данных при 720 нм.

DMEM 88.5% об.; FBS 10% об.; PEG-200 1.5% об.; C(K1) = 5 μM		PBS (0.01 M, pH 7.4) 98.5% об.; BSA - 50 μM; PEG-200 1.5% об.; C(K1) = 5 μM	
p(O ₂), мм.рт.ст.	τ _{аер} (мкс)	p(O ₂), мм.рт.ст.	τ _{аер} (мкс)
152	1.55	150	1.55
107	1.78	0.40	2.51
54.8	2.07		
0.39	2.57		

Исследование цитотоксичности

Для применения K1 в клеточных экспериментах *коллегами* была определена его цитотоксичность по отношению к клеткам CHO-K1 с использованием МТТ-теста. Для проведения этого теста, K1 аналогичным образом растворяли в PEG(200). Следовательно, на общую токсичность влияет не только концентрация самого сенсора, но и присутствие PEG(200). Для того чтобы определить оптимальную концентрацию K1 и PEG(200), параллельно провели два эксперимента: в одном определили цитотоксичность комплекса в разных концентрациях при фиксированной концентрации PEG(200) (Рис.14, слева), а в другом определили токсичность PEG(200) в присутствии фиксированной концентрации сенсора либо в его отсутствие (Рис.14, справа).

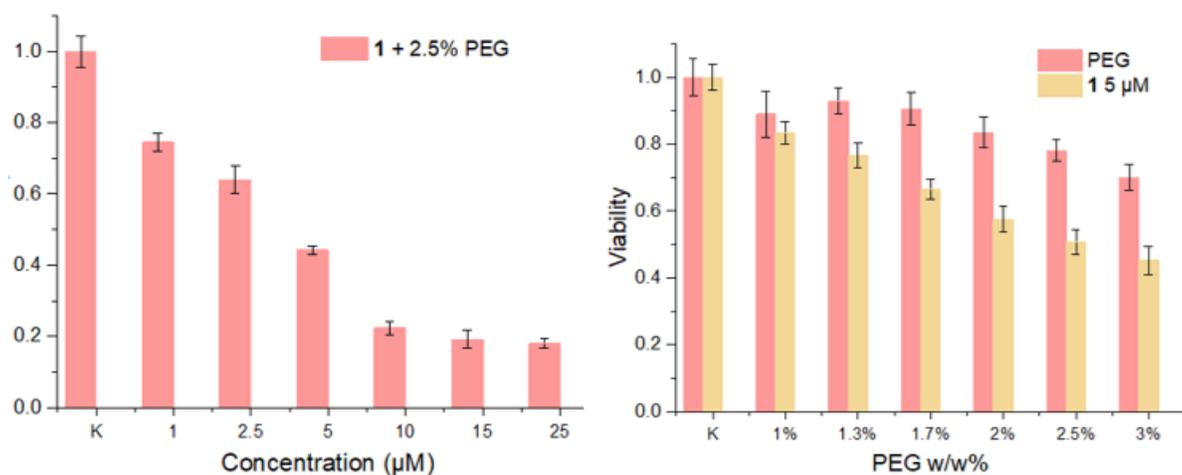


Рис.14. МТТ-тест на клетках CHO-K1 после инкубирования с К1 в среде DMEM/FBS/PEG(200): при разных концентрациях К1 и фиксированной концентрации ПЭГ 2.5% (слева); при различных концентрациях PEG(200) и фиксированной концентрации К1 в 5 µM (справа). 37°C, 24 часа. Выживаемость клеток в контрольном растворе, не содержащем ни PEG(200), ни К1, взята за 1. На графике указано стандартное отклонение для 12 измерений.

После инкубирования в течение 24 часов PEG(200) демонстрирует умеренную токсичность (выживаемость клеток около 80%) в концентрациях до 2.5%. Комплекс 1, однако, проявляет выраженную цитотоксичность, начиная с 5 мкмоль/л (выживаемость менее 50%) и даже увеличивает токсичность PEG(200). Для дальнейшей микроскопии была использована следующая концентрация К1 с PEG(200) в питательной среде: 5 мкмоль/л комплекса и 1,5% PEG(200).

Исследование колокализации

Были получены изображения, демонстрирующие распределение сенсора в живых клетках CHO-K1. Исследования совместной локализации (рис.15) с использованием соответствующих флуоресцентных красителей, специфичных для органелл: Hoechst 33324 (ядра), BioTracker 405 Blue Mitochondria Dye (митохондрии) и LysoTracker Green DND-26 (лизосомы),

показали, что K1 преимущественно локализуется в митохондриях. Это можно объяснить структурными особенностями лигандного окружения в этом комплексе: гидрофобные лиганды и положительный заряд K1 повышают его сродство к митохондриям. Предпочтительное распределение комплекса K1 в митохондриях также может объяснить его высокую цитотоксичность, см. выше. Комплекс K1 незначительно колокализуется с Hoechst 33324, что говорит о том, что в клеточное ядро сенсор не проникает.

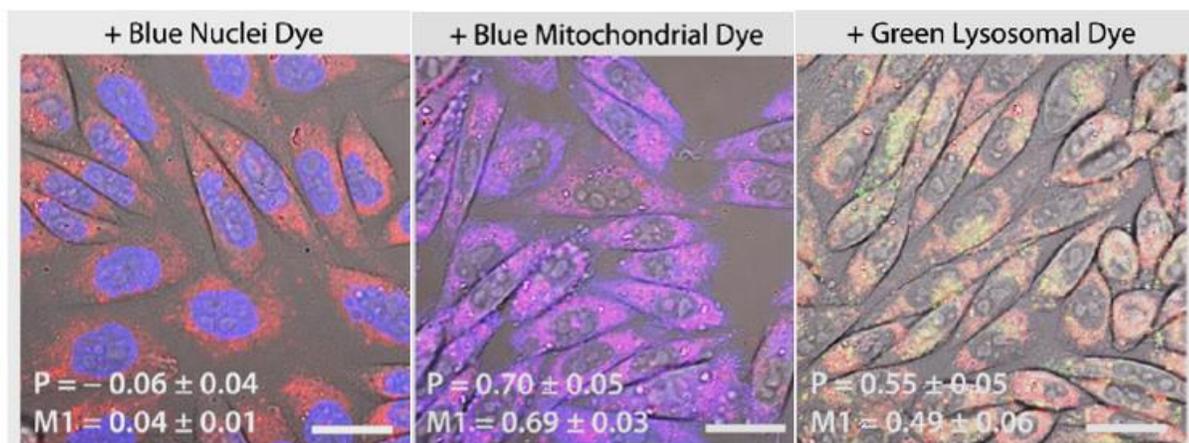


Рис.15. Внутриклеточное распределение K1 (5 мкмоль/л, 1.5% PEG(200)) в клетках CHO-K1 (красный цвет). В клетки вводился одновременно комплекс K1 и специфичный к органеллам краситель: к ядрам – Hoechst 33324 (слева), к митохондриям – BioTracker 405 Blue Mitochondria Dye (в центре), к лизосомам – LysoTracker Green DND-26 (справа). Коэффициенты перекрытия Пирсона (P) и Мандерса (M1) представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение, рассчитанное для 50 клеток.

PLIM эксперименты

Изображения PLIM, полученные после инкубирования клеток CHO-K1 с K1 в условиях нормоксии и гипоксии, показаны на рис.16. Комплекс K1 демонстрирует значительно различающиеся распределения времён жизни в аэрированных и деаэрированных клетках, при этом средние значения

времен жизни оказались очень близки к значениям, полученным в кювете с использованием модельных физиологических сред (DMEM/FBS/PEG-200) (Таблицы 2, 3). Таким образом, этот комплекс может быть использован для качественной оценки насыщения биологических объектов кислородом.

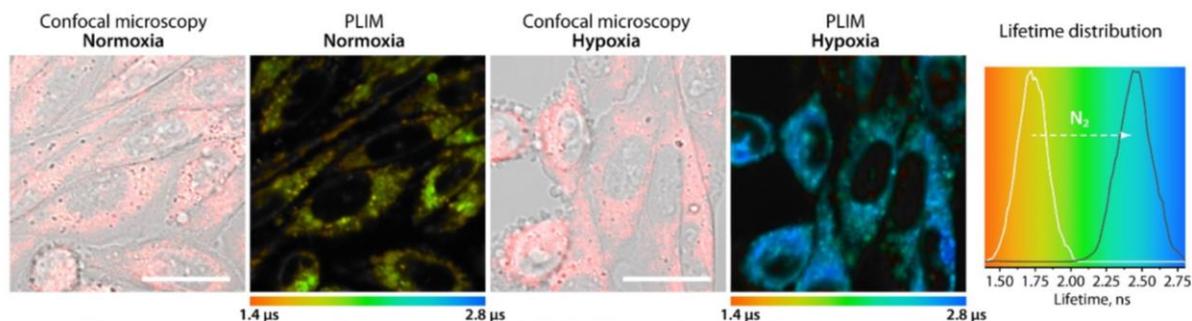


Рис.16. Конфокальные микрофотографии и PLIM-изображения клеток CHO-K1, инкубированных с комплексом K1 (5 мкмоль/л, 1.5% PEG(200), 24 ч) в условиях нормоксии и гипоксии (индуцированной продуванием N₂). Конфокальные изображения представлены в виде объединенной люминесцентной микрофотографии и DIC (дифференциальный интерференционный контраст). В PLIM цвета соответствуют времени жизни в диапазоне 1,4–2,8 мкс. Распределения времени жизни рассчитаны для изображений PLIM целиком. Возбуждение на длине волны 405 нм, температура 37°C, 5% CO₂

Далее необходимо было разработать методику повышения биосовместимости комплексов, а также подробнее изучить поведение аддуктов с альбумином с точки зрения фотофизики. Для этого нужно было модифицировать N^ΛC лиганд олиго(этиленгликолевыми) заместителями и получить вторую серию комплексов с ним, а далее получить нековалентный аддукт и ковалентный конъюгат с альбумином, чтобы тщательнее изучить поведение сенсоров в биологических средах. Этим экспериментам посвящён следующий раздел.

Серия комплексов K5-K6

Синтез и характеристика

По реакции кросс-сочетания Судзуки-Мияуры был получен лиганд N[^]C2 (см. схему на рис.17). Такая структура циклометаллирующего лиганда была выбрана в данном этапе работы по той причине, что эмиссия в ближнем ИК диапазоне, присущая серии комплексов K1-K4, несколько хуже детектируется приборами, что затрудняет процесс визуализации в клеточных культурах. В связи с этим был выбран лиганд с менее объёмной конденсированной системой, чтобы сместить максимум люминесценции ближе к видимому диапазону.

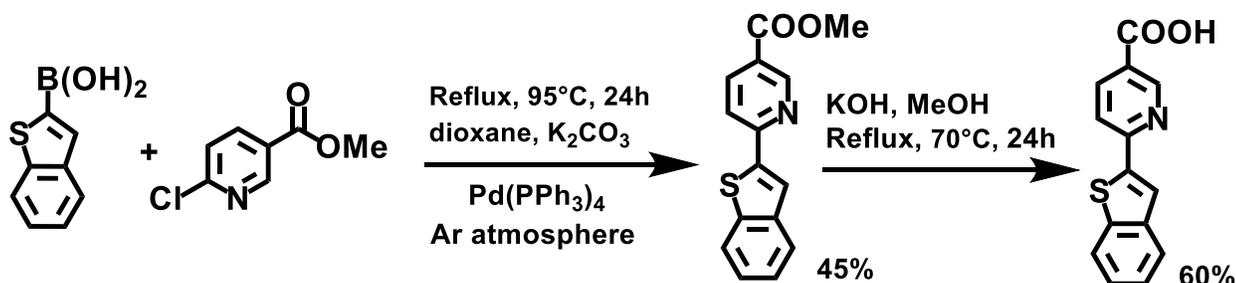


Рис. 17. Синтез N[^]C2 лиганда

Далее N[^]C2 лиганд был модифицирован: в его структуру был введён заместитель с «двойным (олиго)этиленгликолевым хвостом» (см. схему на рис.18). Это было сделано для того, чтобы повысить растворимость итоговых комплексов в водных средах, а также снизить их токсичность и избавиться от неспецифичных взаимодействий соединений с компонентами физиологических сред.

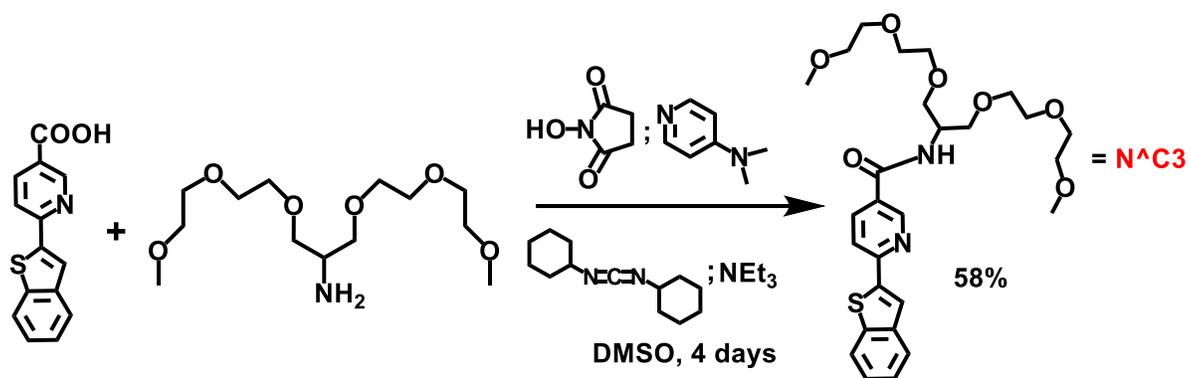


Рис. 18. Синтез модифицированного N^C лиганда

Далее были синтезированы два дииминных N^N лиганда, содержащих пиридил-триазольный структурный фрагмент. Эти лиганды были получены при помощи «клик-реакций» 2-азидопиридина с соответствующими алкинами (см. рис.19, рис.20).

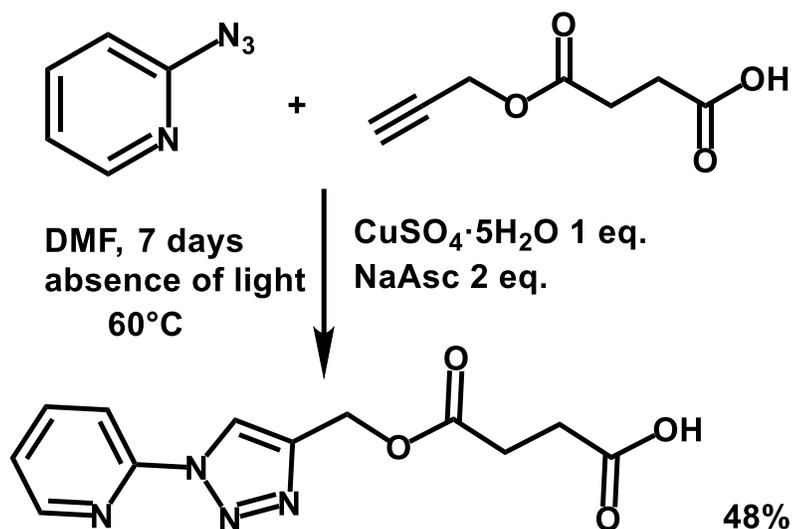


Рис. 19. Синтез 4-оксо-4-((1-(пиридин-2-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)бутановой кислоты

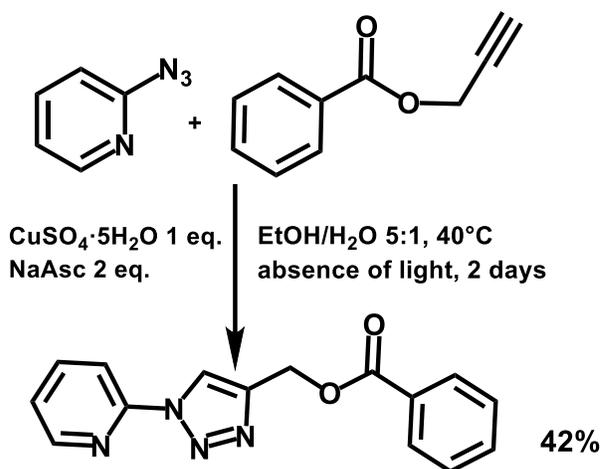


Рис. 20. Синтез N^N5 лиганда

Из 4-оксо-4-((1-(пиридин-2-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)бутановой кислоты был получен гидрофобный N^N6 лиганд — 2,5-диоксопирролидин-1-ил((1-(пиридин-2-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метилсукцинат (см. рис.21). Благодаря сукцинимидному фрагменту, он ковалентно связывается с сывороточным альбумином, реагируя с аминогруппами в его составе, и образует с ним ковалентные конъюгаты. При выделении данного лиганда очень важно было использовать сухие растворители, так как он достаточно быстро гидролизуется даже при малом содержании воды.

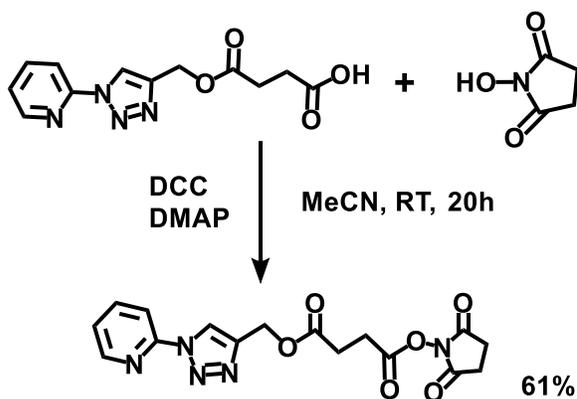


Рис. 21. Синтез N^N6 лиганда

Также были получены и выделены два аддукта данных комплексов с альбумином: K5-BSA — нековалентный, K6-BSA — ковалентный. В случае с нековалентным аддуктом, после синтеза в PEG(200) выпало достаточно большое количество осадка, поэтому данный синтез повторили в ДМСО, однако результат остался тем же. В случае с ковалентным аддуктом осадка после синтеза практически не было. О характеристике данных аддуктов см. раздел «Фотофизические измерения».

Фотофизические измерения

Оба комплекса проявляют люминесценцию в метаноле, их фотофизические характеристики приведены в Таблице 4.

Спектры эмиссии и поглощения представлены на рис.23 слева и справа, соответственно. Максимумы полос поглощения низкоэнергетических переходов лежат в области 450-460 нм.

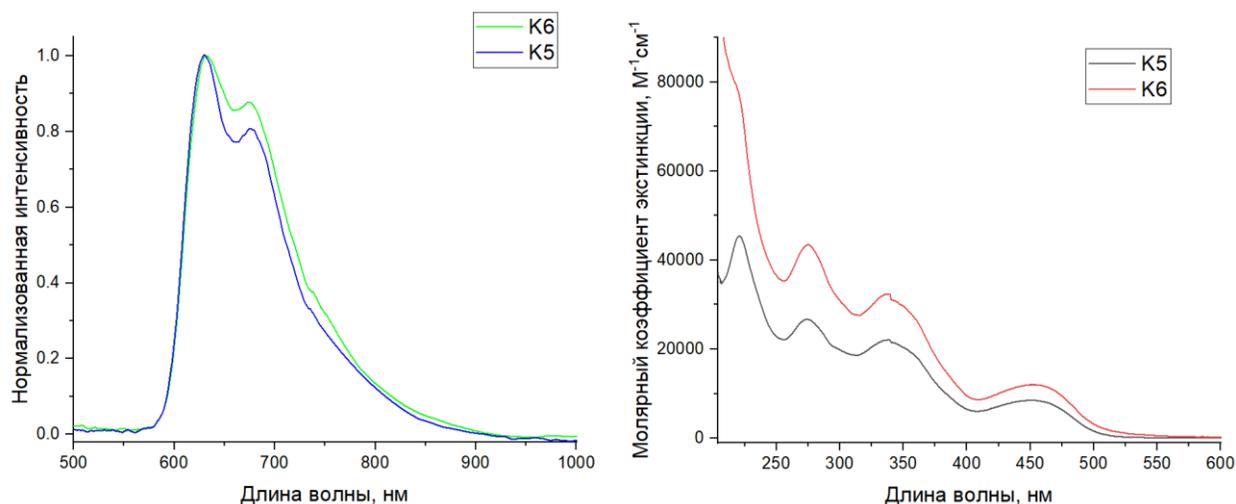


Рис.23. Спектры люминесценции комплексов из второй серии — слева; спектры поглощения комплексов из второй серии — справа

Таблица 4. Фотофизические свойства соединений K5-K6 в растворе метанола, 298К, возбуждение эмиссии на длине волны 355 нм, накопление данных при 720 нм

	τ_{aer} (ns)	τ_{deg} (ns)	τ_{deg}/τ_{aer}	QY _{aer} (%)	QY _{deg} (%)
K5	275±10	8165±25	29.7	0.47	13.9
K6	280±13	8066±20	28.8	0.53	15.3

Как видно из спектров эмиссии, у второй серии комплексов по сравнению с первой серией максимумы эмиссии сдвинуты в область меньших длин волн, что объясняется структурой N[^]C лиганда (см. выше). В целом, фотофизические характеристики двух комплексов из этой серии очень близки. Также стоит заметить, что у второй серии комплексов увеличилась чувствительность к присутствию кислорода в растворе, по сравнению с первой серией, что делает их достаточно перспективными для визуализации гипоксии.

Были измерены фотофизические свойства данных аддуктов и конъюгата: спектры поглощения и люминесценции (см. рис.24), а также времена жизни в дегазированном и аэрированном растворах. Так как раствор, содержащий альбумин, сильно пенится при продувании через него аргона, данные растворы были дегазированы путём добавления в кювету 5 мг (20 мкмоль) безводного сульфита натрия при сильном перемешивании с дальнейшей герметизацией кюветы. Полученные результаты представлены в Таблице 5.

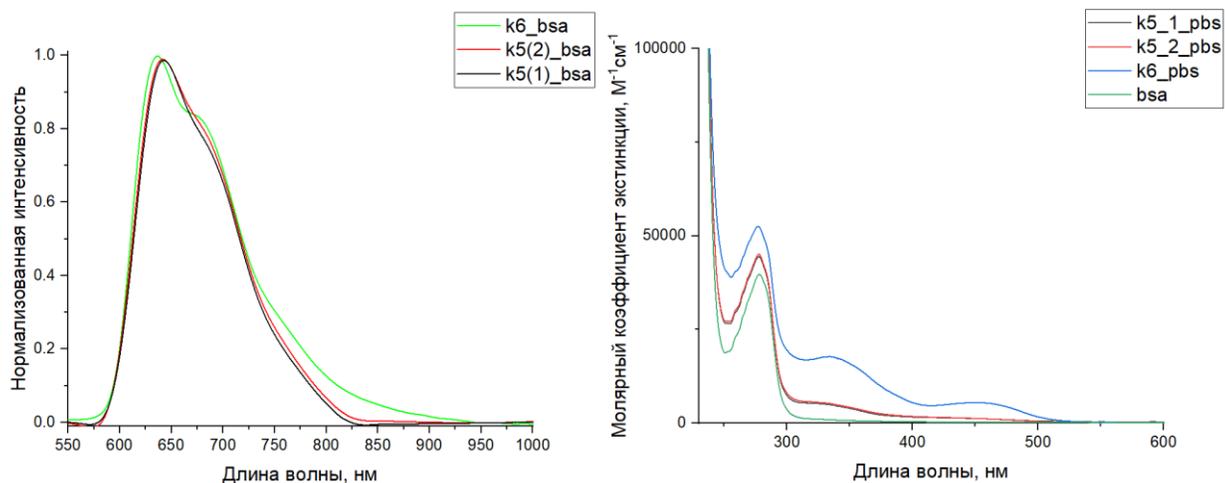


Рис.24. Спектры поглощения аддуктов и конъюгата с альбумином, а также чистого альбумина (слева); нормализованные спектры люминесценции аддуктов и конъюгата с альбумином (справа)

Молярное соотношение комплекс:BSA в аддуктах рассчитывали по спектрам поглощения, записанным в водном растворе, содержащем буфер PBS (pH = 7.45 для K5 и pH = 8.1 для K6). Поскольку как BSA, так и комплексы растворимы в этой смеси, можно ожидать, что гидрофобные взаимодействия, ответственные за образование аддукта, по существу устраняются. Следовательно, результирующие спектры поглощения растворенных аддуктов можно рассматривать как линейную комбинацию поглощения BSA и комплекса. Молярную концентрацию комплексов рассчитывали по их поглощению при 450 нм с использованием закона Бугера-Ламберта-Бера и молярных коэффициентов экстинкции (ϵ) исходных комплексов, определённых независимо в одном и том же смешанном растворителе. Для аддукта с K5 соотношение BSA:комплекс равно 7:1, для K6 — 3:2. Как видно, для конъюгата K6 соотношение близко к стехиометрическому.

Таблица 5. Фотофизические характеристики аддуктов с BSA в буфере PBS, 298K, возбуждение эмиссии на длине волны 355 нм, накопление данных при 720 нм

	τ_{aer} (ns)	τ_{deg} (ns)	τ_{deg}/τ_{aer}	QY _{aer} (%)	QY _{deg} (%)
1	4377±45	12219±100	2.79	2.1	5.9
2	4344±40	9800±30	2.26	4.4	9.9

Длины волн излучения для аддуктов и форма их полос излучения оказались почти такими же, как и для соответствующих свободных комплексов, что указывает на неизменную природу и энергию эмиссионных переходов для хромофоров в растворе и в аддуктах. Однако значения времён жизни возбуждённого состояния существенно отличаются по сравнению с характеристиками, полученными для свободных комплексов в растворе, что свидетельствует о том, что большую роль в чувствительности сенсоров к O₂ играет встраивание комплекса в белковую матрицу. В аэрированном растворе наблюдаемое излучение аддуктов имеет биэкспоненциальный спад; время жизни в 15 раз выше по сравнению с соответствующими значениями, полученными для чистых комплексов в тех же условиях.

В дегазированном растворе также наблюдался биэкспоненциальный спад, а время жизни увеличилось в 2-3 раза. Эти наблюдения могут быть объяснены следующим образом. Исследованный комплекс K5 не имеет активных групп для ковалентного сопряжения с белком, следовательно, образование аддуктов, скорее всего, определяется встраиванием молекул хромофора в гидрофобные полости BSA, а также образованием агрегатов. Очевидным следствием этого процесса является надёжная защита сенсора от взаимодействия с окружающей средой и почти полное предотвращение гашения фосфоресценции молекулярным кислородом, что отчётливо наблюдается в аэрированных растворах. В дегазированном растворе можно наблюдать незначительное увеличение времени жизни, что означает, что

тушение флуоресценции в данных условиях затруднено. Стоит отметить, что “матричный эффект” может также способствовать увеличению времени жизни, наблюдаемому для аддуктов, в результате подавления безызлучательной колебательной релаксации в белковом кармане.

Ковалентный же конъюгат, скорее всего, образуется на поверхности белка, так как там находится больше аминокислотных групп для связывания с КБ, однако он связывается с альбумином достаточно сильно, поэтому его тушение также оказывается затруднённым.

Заключение

В данной работе были получены следующие результаты:

- Были синтезированы: модифицированный олиго(этиленгликольными) заместителями N^ΛC лиганд, два дииминных пиридил-тразольных лиганда, а также две серии циклометаллированных комплексов иридия III: 4 комплекса с одним N^ΛC лигандом, 2 комплекса — с N^ΛC лигандом, модифицированным олиго(этиленгликольными) заместителями
- Полученные комплексы были охарактеризованы методами ЯМР спектроскопии, масс-спектрометрии и элементного анализа, предполагаемые структуры соединений были подтверждены при помощи данных методов анализа
- Проведены исследования фотофизических свойств в метаноле, подтверждено наличие зависимости фосфоресценции всех комплексов от содержания кислорода; на основании этих данных был выбран наиболее перспективный комплекс из серии
- Были подобраны оптимальные составы систем для исследования фотофизических свойств данного комплекса в модельных физиологических средах и проведены соответствующие измерения; была проведена калибровка Штерна-Фольмера
- Коллегами была определена цитотоксичность данного комплекса, был проведён анализ его распределения в различных органеллах клетки, а также были получены изображения PLIM
- Были получены и выделены два аддукта комплексов с альбумином, а также измерены их фотофизические характеристики.

На основании проведённой работы можно сделать следующие выводы:

- В полученных сериях соединений на фотофизические характеристики прежде всего влияет природа циклометаллирующего N[^]C лиганда, а влияние N[^]N лигандов больше сказывается на биосовместимости и сенсорной способности
- Из серии гидрофобных комплексов, комплекс **K1** был выбран как самый перспективный с точки зрения сенсорных свойств и возможности стабилизации в водной среде
- Проведённые коллегами эксперименты показали, что комплекс K1 является достаточно токсичным (в концентрации более 5 мкмоль/л), а также преимущественно локализуется в митохондриях. Эксперименты по биоимиджингу PLIM подтвердили применимость комплекса в качестве сенсора O₂ на живых клетках *in vitro*
- В физиологических средах значительную роль в изменении фотофизических свойств играет встраивание комплексов в гидрофобные карманы альбумина.

Благодарности

За помощь в выполнении данной работы и чуткое руководство хочу выразить искреннюю благодарность своему научному руководителю Критченкову Илье Сергеевичу. Также благодарю за поддержку и атмосферу весь коллектив научной группы люминесцентных комплексов переходных металлов и, в частности, руководителя – Туника Сергея Павловича.

За проведение и интерпретацию клеточных экспериментов по определению токсичности и экспериментов PLIM благодарю Соломатину Анастасию Игоревну.

За помощь в проведении экспериментов благодарю ресурсные центры: «Магнитно-резонансные методы исследования», «Оптические и лазерные методы исследования вещества», «Методы анализа состава вещества», «Вычислительный центр» и «Центр диагностики функциональных материалов» Научного Парка СПбГУ.

Данная дипломная работа была выполнена при поддержке грантов: РФФ (18-73-10021, 18-73-10021-П).

Список использованной литературы

1. Semenza G.L. Oxygen Sensing, Hypoxia-Inducible Factors, and Disease Pathophysiology // Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 2014. Vol. 9, № 1. P. 47–71.
2. Muz B. et al. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy // Hypoxia. 2015. P. 83.
3. Hsieh. Cycling hypoxia increases U87 glioma cell radioresistance via ROS induced higher and long-term HIF-1 signal transduction activity // Oncol Rep. 2010. Vol. 24, № 6.
4. Yoshihara T. et al. Oxygen imaging of living cells and tissues using luminescent molecular probes // Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews. 2017. Vol. 30. P. 71–95.
5. Vikram D.S., Zweier J.L., Kuppusamy P. Methods for Noninvasive Imaging of Tissue Hypoxia // Antioxid Redox Signal. 2007. Vol. 9, № 10. P. 1745–1756.
6. Tirotta I. et al. ¹⁹F Magnetic Resonance Imaging (MRI): From Design of Materials to Clinical Applications // Chem Rev. 2015. Vol. 115, № 2. P. 1106–1129.
7. Swartz H.M. Using EPR to Measure a Critical but Often Unmeasured Component of Oxidative Damage: Oxygen // Antioxid Redox Signal. 2004. Vol. 6, № 3. P. 677–686.
8. Wolfbeis O.S. Luminescent sensing and imaging of oxygen: Fierce competition to the Clark electrode // BioEssays. 2015. Vol. 37, № 8. P. 921–928.
9. Kral A., Aplin F., Maier H. Advanced concepts physical chemistry: Electrodes and electrolytes // Prostheses for the Brain. Academic Press, 2021. P. 167–208.
10. Roussakis E. et al. Oxygen-Sensing Methods in Biomedicine from the Macroscale to the Microscale // Angewandte Chemie International Edition. 2015. Vol. 54, № 29. P. 8340–8362.
11. J. R. Lakowicz. Introduction to Fluorescence, Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd ed. Springer US, 2006. 3–6 p.
12. Hasebe N. et al. Phosphorescence quenching of neutral and cationic iridium(III) complexes by molecular oxygen and aromatic electron acceptors // J Photochem Photobiol A Chem. 2016. Vol. 324. P. 134–144.

13. Ashen-Garry D., Selke M. Singlet Oxygen Generation by Cyclometalated Complexes and Applications // *Photochem Photobiol.* 2014. Vol. 90, № 2. P. 257–274.
14. Abdel-Shafi A.A., Hassanin H.A., Al-Shihry S.S. Partial charge transfer contribution to the solvent isotope effect and photosensitized generation of singlet oxygen, O₂(¹Δ_g), by substituted ruthenium(II) bipyridyl complexes in aqueous media // *Photochemical & Photobiological Sciences.* 2014. Vol. 13, № 9. P. 1330–1337.
15. Ruggi A., van Leeuwen F.W.B., Velders A.H. Interaction of dioxygen with the electronic excited state of Ir(III) and Ru(II) complexes: Principles and biomedical applications // *Coord Chem Rev.* 2011. Vol. 255, № 21–22. P. 2542–2554.
16. Borisov S.M. et al. New NIR-emitting complexes of platinum(II) and palladium(II) with fluorinated benzoporphyrins // *J Photochem Photobiol A Chem.* 2009. Vol. 201, № 2–3. P. 128–135.
17. Takizawa S., Aboshi R., Murata S. Photooxidation of 1,5-dihydroxynaphthalene with iridium complexes as singlet oxygen sensitizers // *Photochemical & Photobiological Sciences.* 2011. Vol. 10, № 6. P. 895–903.
18. Bigdeli A. et al. Ratiometric fluorescent nanoprobe for visual detection: Design principles and recent advances - A review // *Anal Chim Acta.* 2019. Vol. 1079. P. 30–58.
19. Chelushkin P.S., Tunik S.P. Phosphorescence Lifetime Imaging (PLIM): State of the Art and Perspectives. 2019. P. 109–128.
20. You Y. Phosphorescence bioimaging using cyclometalated Ir(III) complexes // *Curr Opin Chem Biol.* 2013. Vol. 17, № 4. P. 699–707.
21. Ma D.-L. et al. Recent advances in iridium(III) complex-assisted nanomaterials for biological applications // *J Mater Chem B.* 2018. Vol. 6, № 4. P. 537–544.
22. Li T.-Y. et al. Rational design of phosphorescent iridium(III) complexes for emission color tunability and their applications in OLEDs // *Coord Chem Rev.* 2018. Vol. 374. P. 55–92.
23. You Y., Cho S., Nam W. Cyclometalated Iridium(III) Complexes for Phosphorescence Sensing of Biological Metal Ions // *Inorg Chem.* 2014. Vol. 53, № 4. P. 1804–1815.
24. Kritchenkov I.S. et al. Novel NIR-Phosphorescent Ir(III) Complexes: Synthesis, Characterization and Their Exploration as Lifetime-Based O₂ Sensors in Living Cells // *Molecules.* 2022. Vol. 27, № 10. P. 3156.

25. Kritchenkov I.S. et al. A biocompatible phosphorescent Ir($\text{Ir}(\text{III})$) oxygen sensor functionalized with oligo(ethylene glycol) groups: synthesis, photophysics and application in PLIM experiments // *New Journal of Chemistry*. 2020. Vol. 44, № 25. P. 10459–10471.
26. Fercher A. et al. Intracellular O_2 Sensing Probe Based on Cell-Penetrating Phosphorescent Nanoparticles // *ACS Nano*. 2011. Vol. 5, № 7. P. 5499–5508.
27. Esipova T. V. et al. Oxyphor 2P: A High-Performance Probe for Deep-Tissue Longitudinal Oxygen Imaging // *Cell Metab*. 2019. Vol. 29, № 3. P. 736-744.e7.
28. Zhang Q. et al. Mitochondria-targeting phosphorescent iridium($\text{Ir}(\text{III})$) complexes for living cell imaging // *Dalton Trans*. 2014. Vol. 43, № 44. P. 16872–16879.
29. Zhang H. et al. 3D CoPt nanostructures hybridized with iridium complexes for multimodal imaging and combined photothermal-chemotherapy // *J Inorg Biochem*. 2021. Vol. 219. P. 111429.
30. Kritchenkov I.S. et al. Biocompatible Ir(III) Complexes as Oxygen Sensors for Phosphorescence Lifetime Imaging // *Molecules*. 2021. Vol. 26, № 10. P. 2898.
31. Kritchenkov I.S. et al. Near-Infrared $[\text{Ir}(\text{N}^{\wedge}\text{C})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]^+$ Emitters and Their Noncovalent Adducts with Human Serum Albumin: Synthesis and Photophysical and Computational Study // *Organometallics*. 2019. Vol. 38, № 19. P. 3740–3751.

Приложение

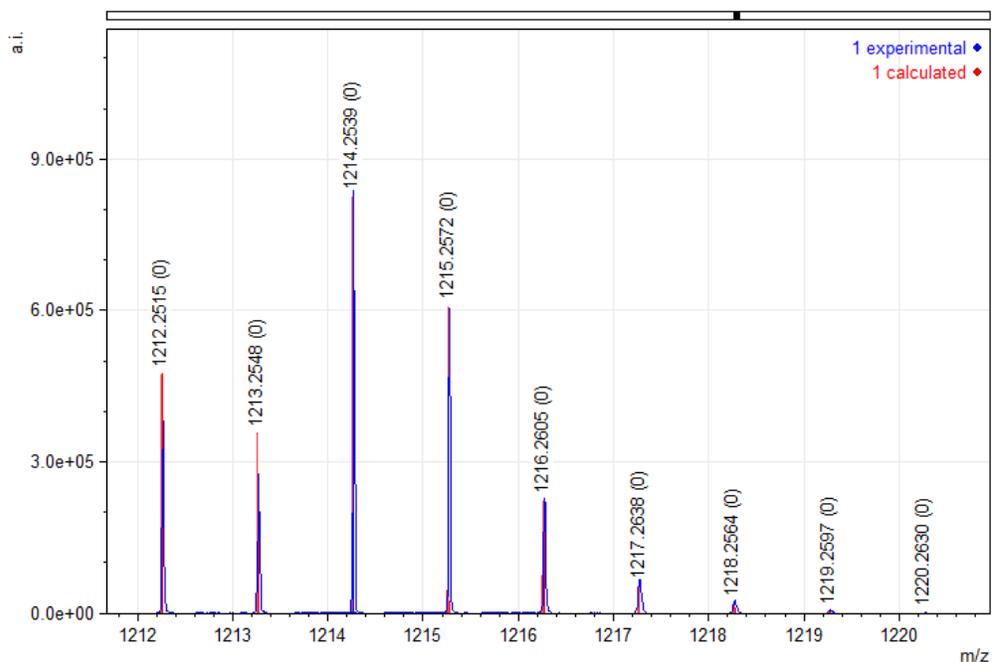


Рис. П1. Фрагмент расчётного и экспериментального масс-спектров для комплекса K1

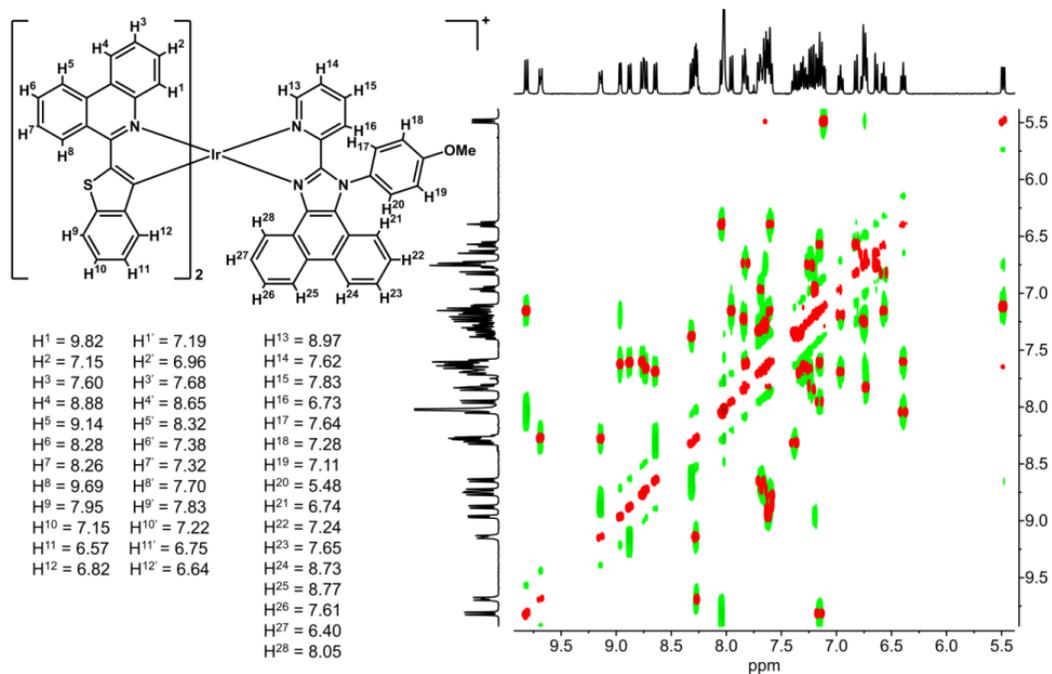


Рис. П2. Наложение COSY/NOESY NMR для комплекса K1 (COSY – красный, NOESY – зелёный) и соотнесение сигналов, ацетон-d₆, 298K

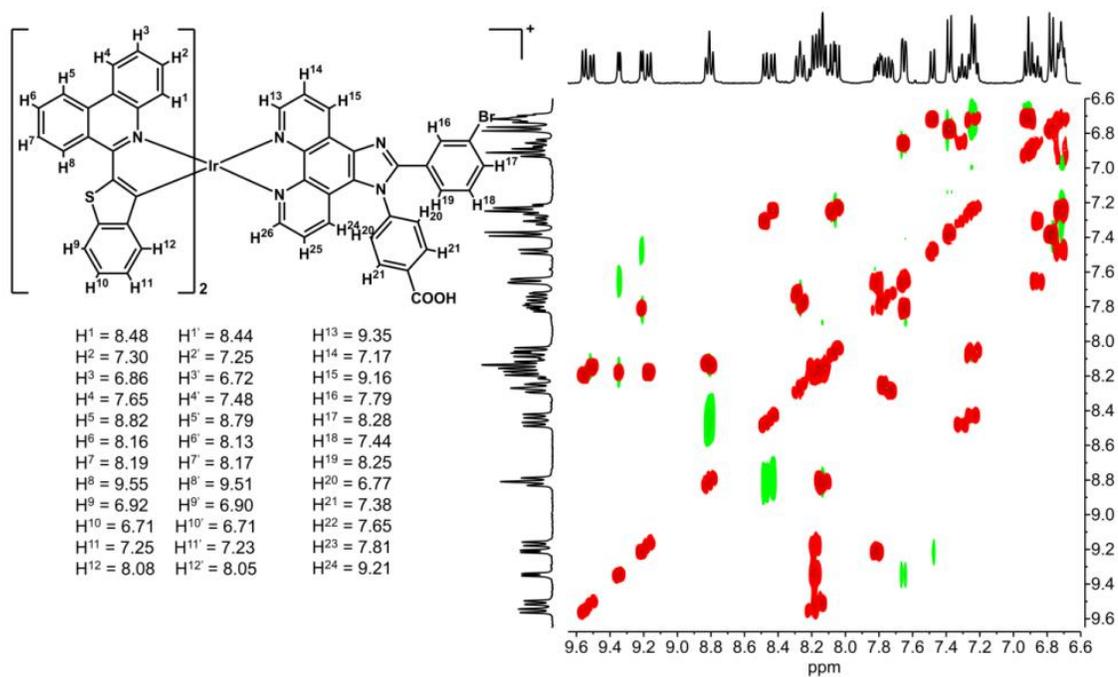


Рис. П3. Наложение COSY/NOESY NMR для комплекса K2 (COSY – красный, NOESY – зелёный) и соотнесение сигналов, ацетон-d₆, 298K

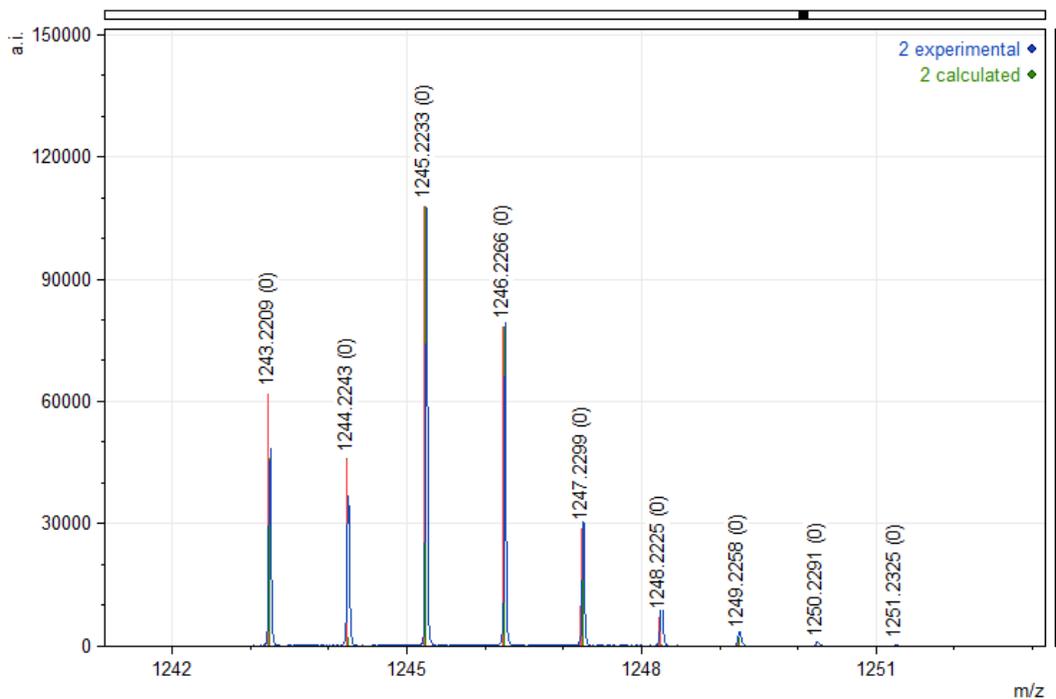


Рис. П4. Фрагмент расчётного и экспериментального масс-спектров для комплекса K2

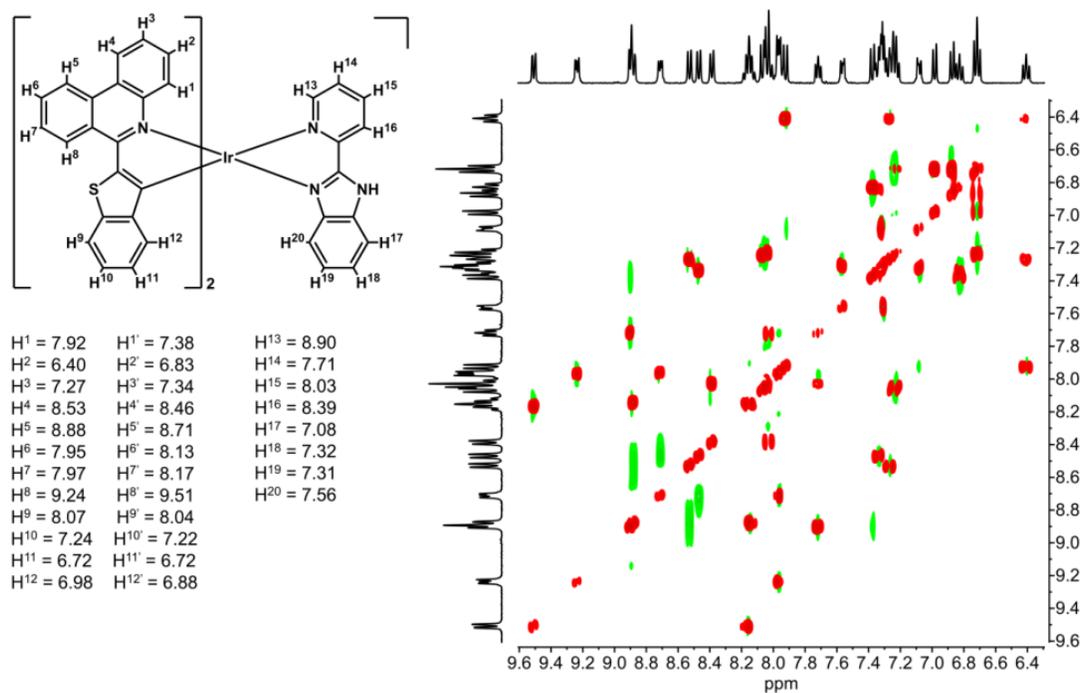


Рис. П5. Наложение COSY/NOESY NMR для комплекса К3 (COSY – красный, NOESY – зелёный) и соотнесение сигналов, ацетон-d₆, 298K

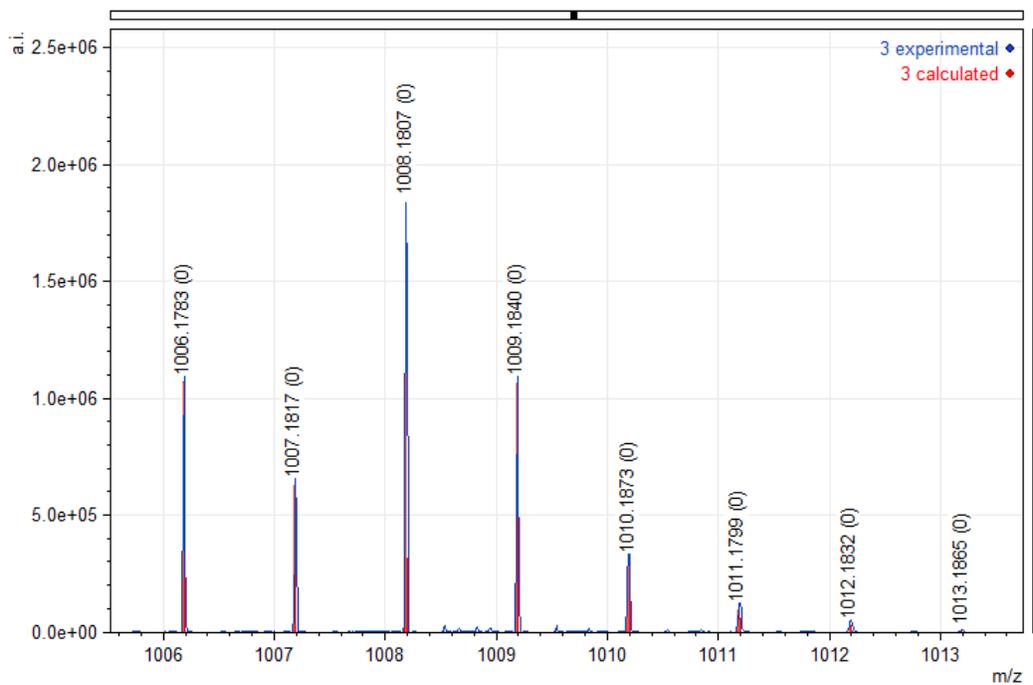


Рис. П6. Фрагмент расчётного и экспериментального масс-спектров для комплекса К3

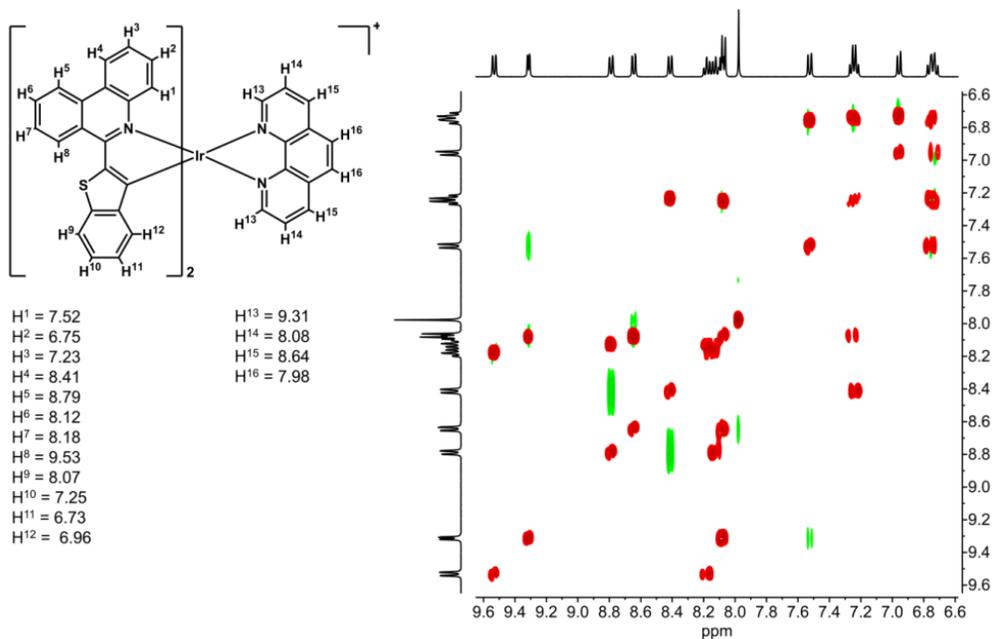


Рис. П7. Наложение COSY/NOESY NMR для комплекса K4 (COSY – красный, NOESY – зелёный) и соотнесение сигналов, ацетон-d₆, 298K

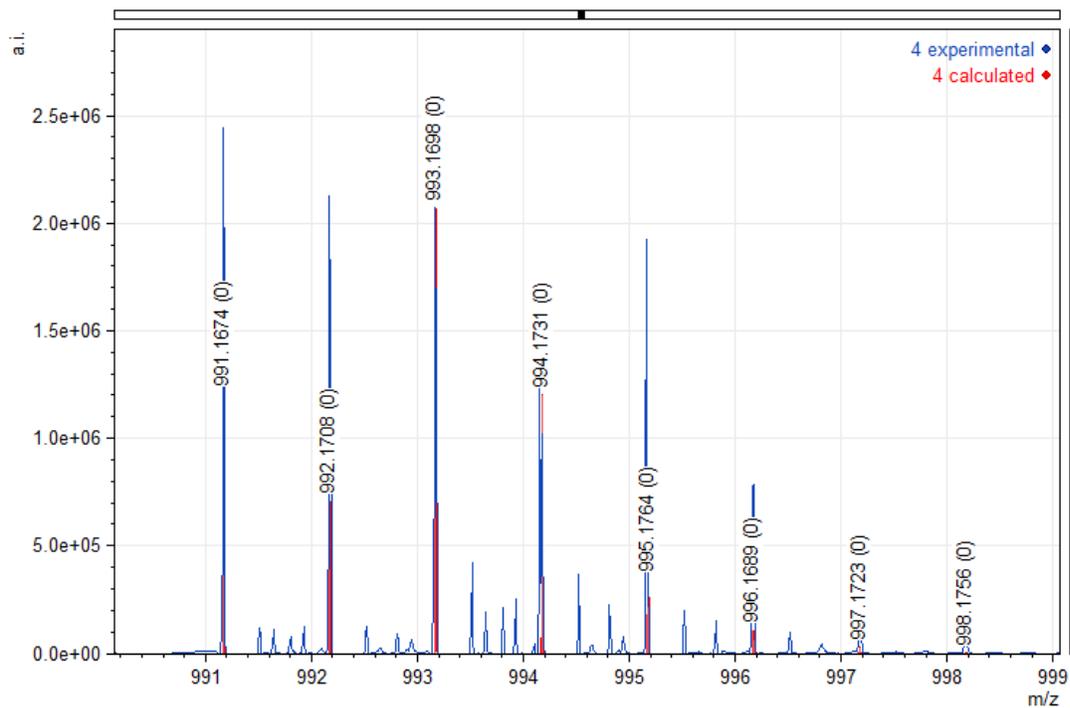


Рис. П8. Фрагмент расчётного и экспериментального масс-спектров для комплекса 4

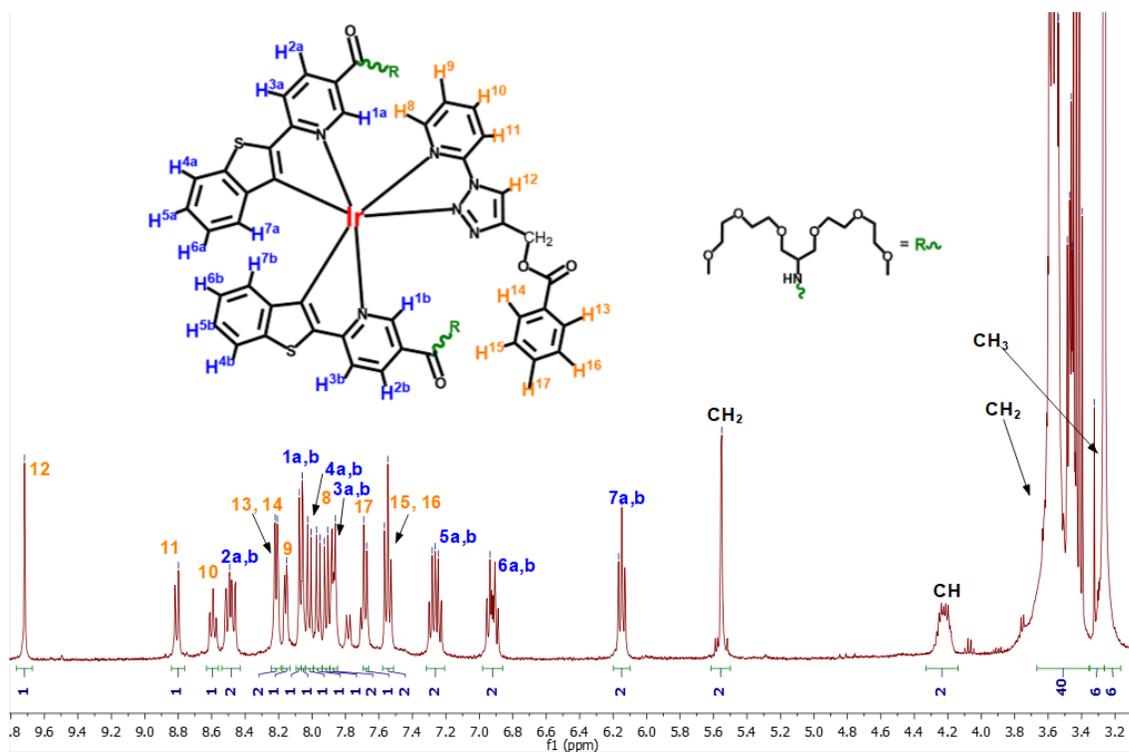


Рис. П9. Соотнесение сигналов 1H ЯМР для K5 (растворитель – Ацетон-d₆, RT, 400 МГц)

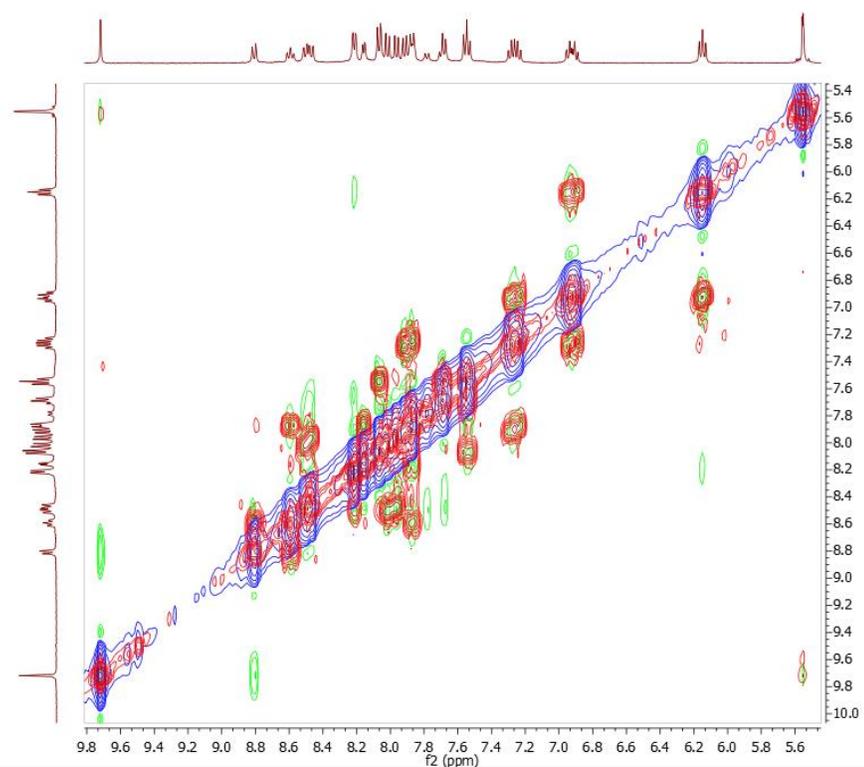


Рис. П10. Наложение COSY/NOESY NMR для комплекса K5 (COSY – красный, NOESY – зелёный), ацетон-d₆, 298K

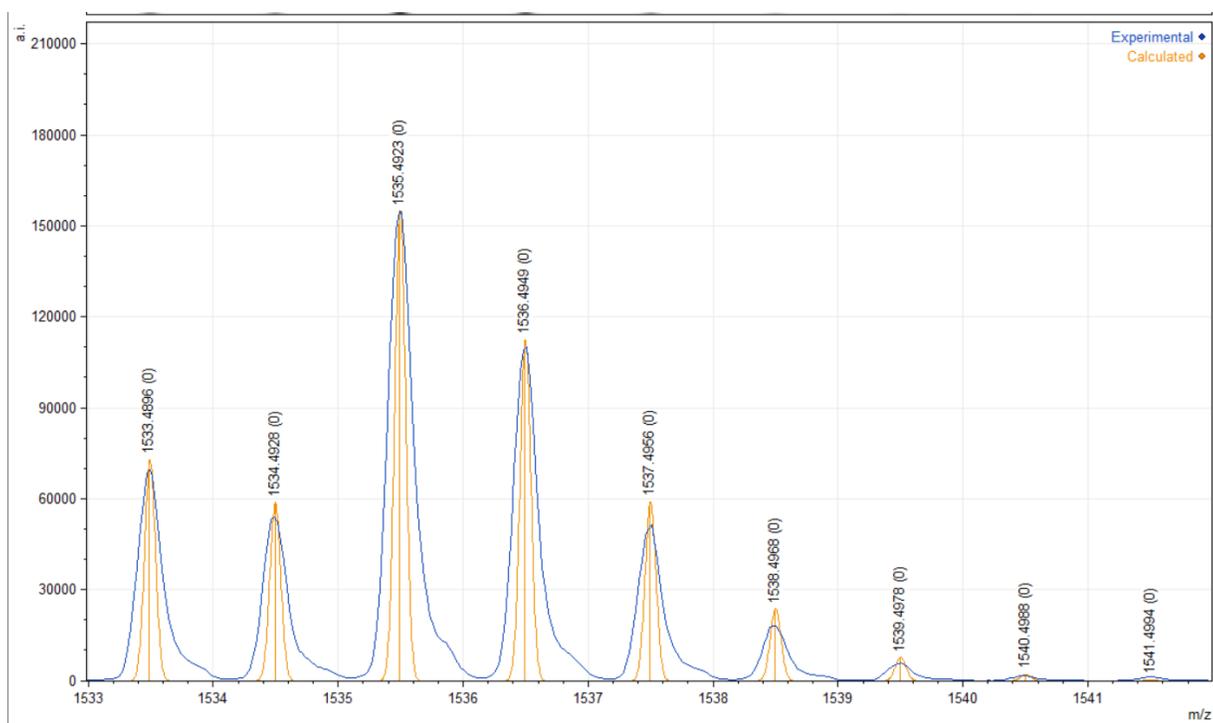


Рис. П11. Фрагмент расчётного и экспериментального масс-спектров для комплекса K5

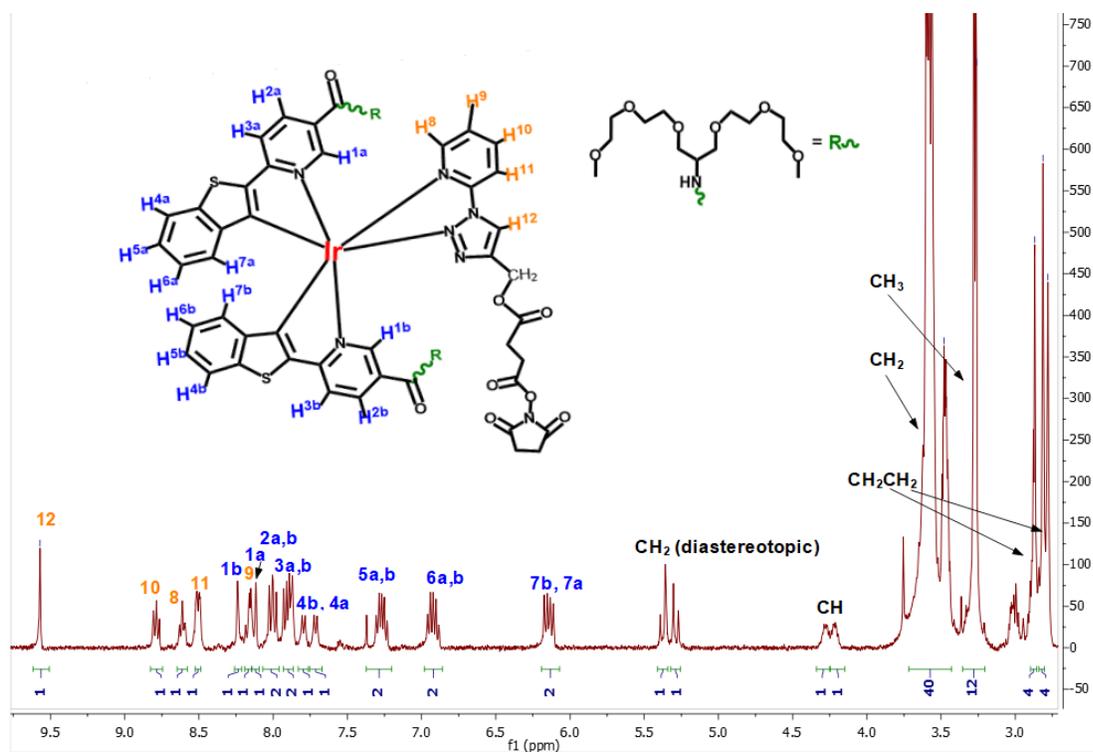


Рис. П12. Соотнесение сигналов ^1H ЯМР для K6 (растворитель – Ацетон- d_6 , RT, 400 МГц), 298К

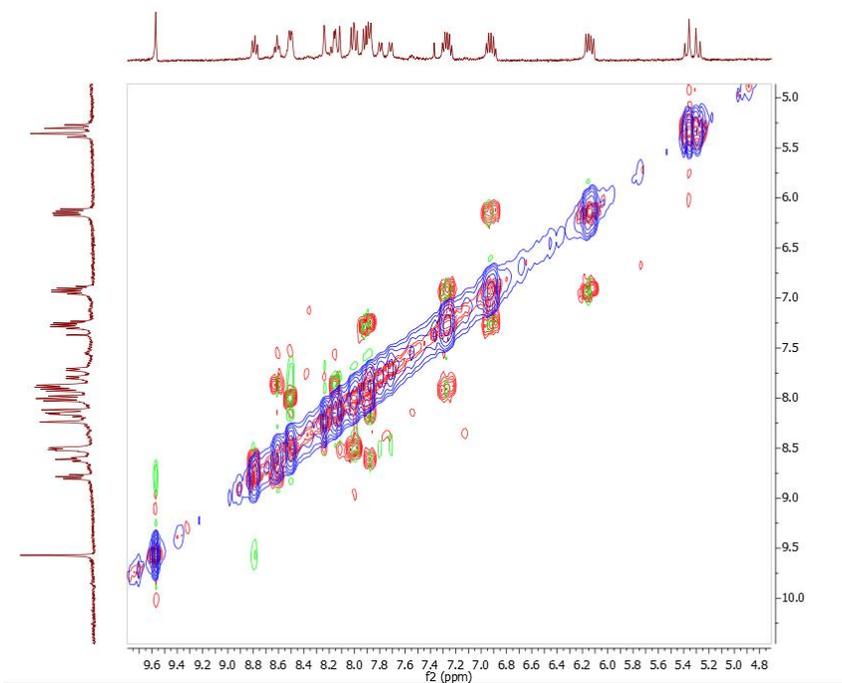


Рис. П13. Наложение COSY/NOESY NMR для комплекса K6 (COSY – красный, NOESY – зелёный), ацетон-d₆, 298K

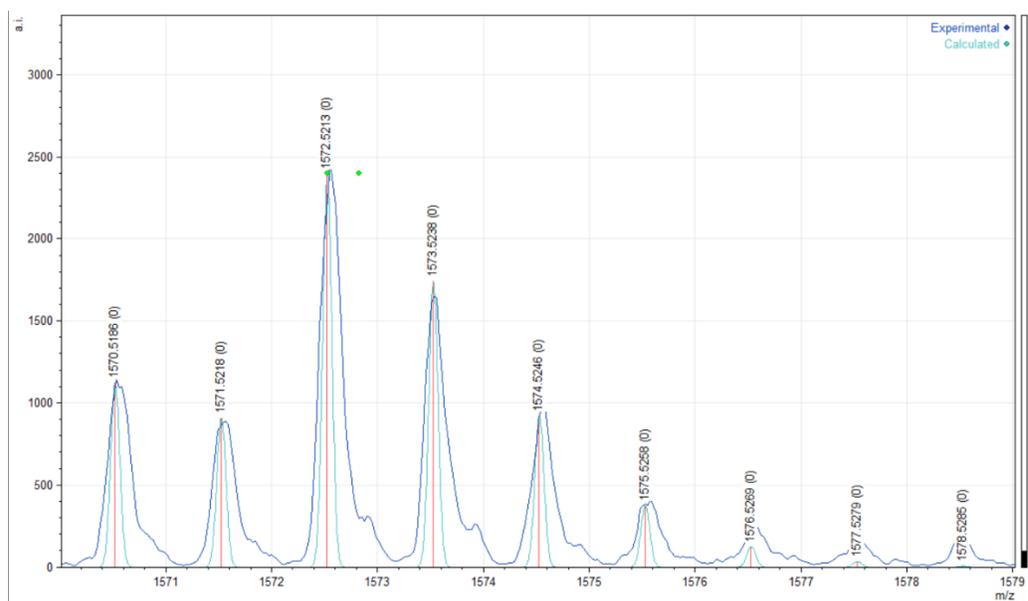


Рис. П14. Фрагмент расчётного и экспериментального масс-спектров для комплекса K6

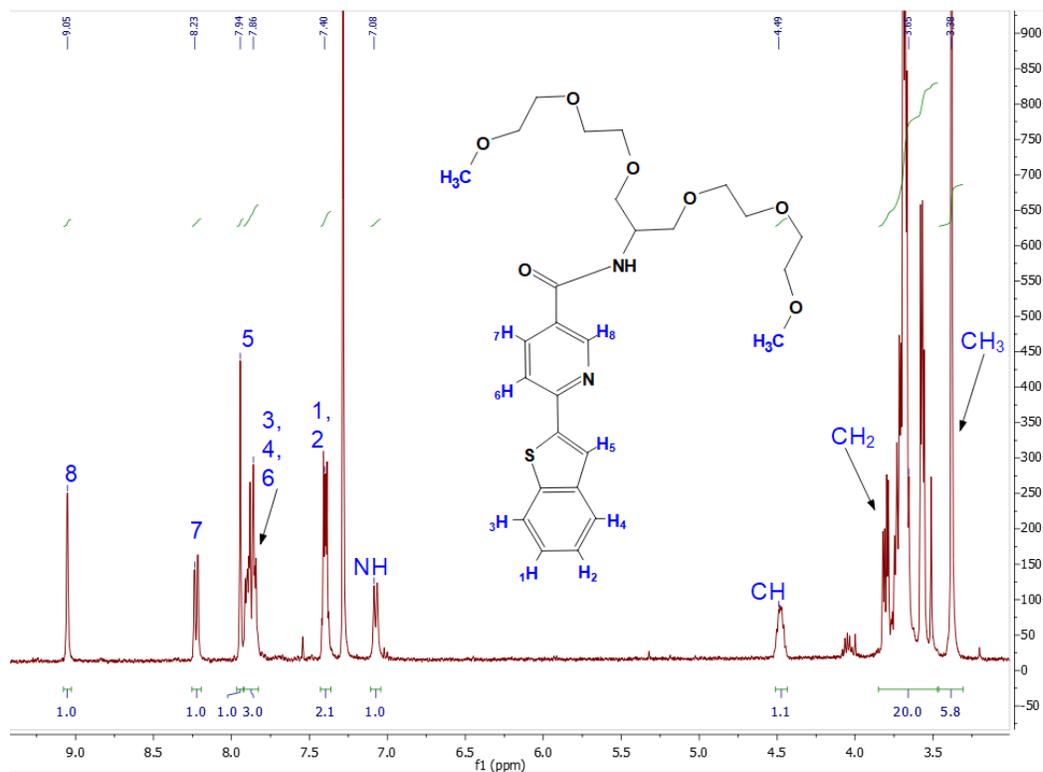


Рис. П15. Соотнесение сигналов ^1H ЯМР для NCS3 (растворитель – CDCl_3 , RT, 400 МГц), 298К

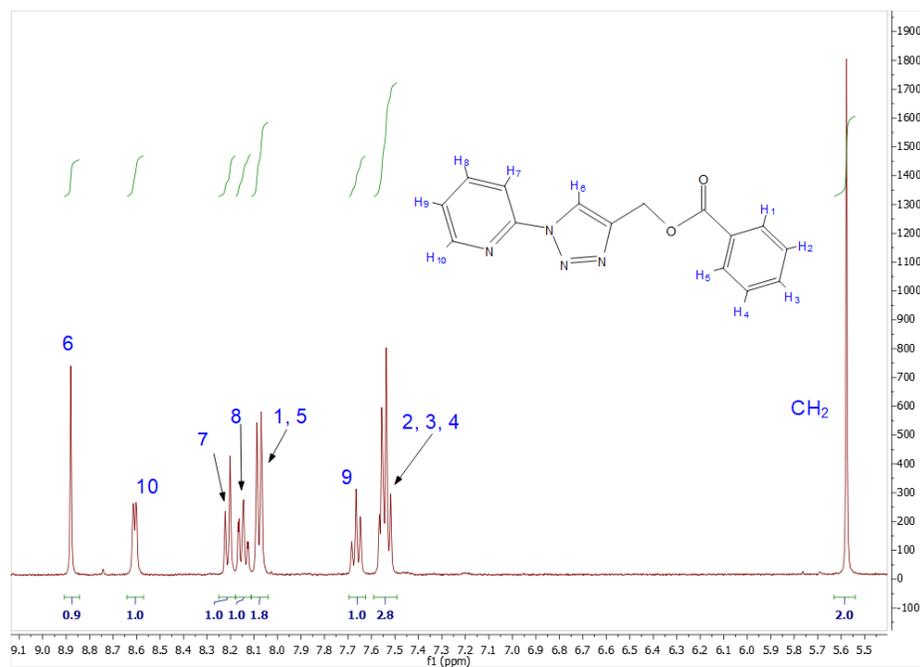


Рис.П16. Соотнесение сигналов ^1H ЯМР для N5N5 (растворитель – Ацетон- d_6 , RT, 400 МГц)

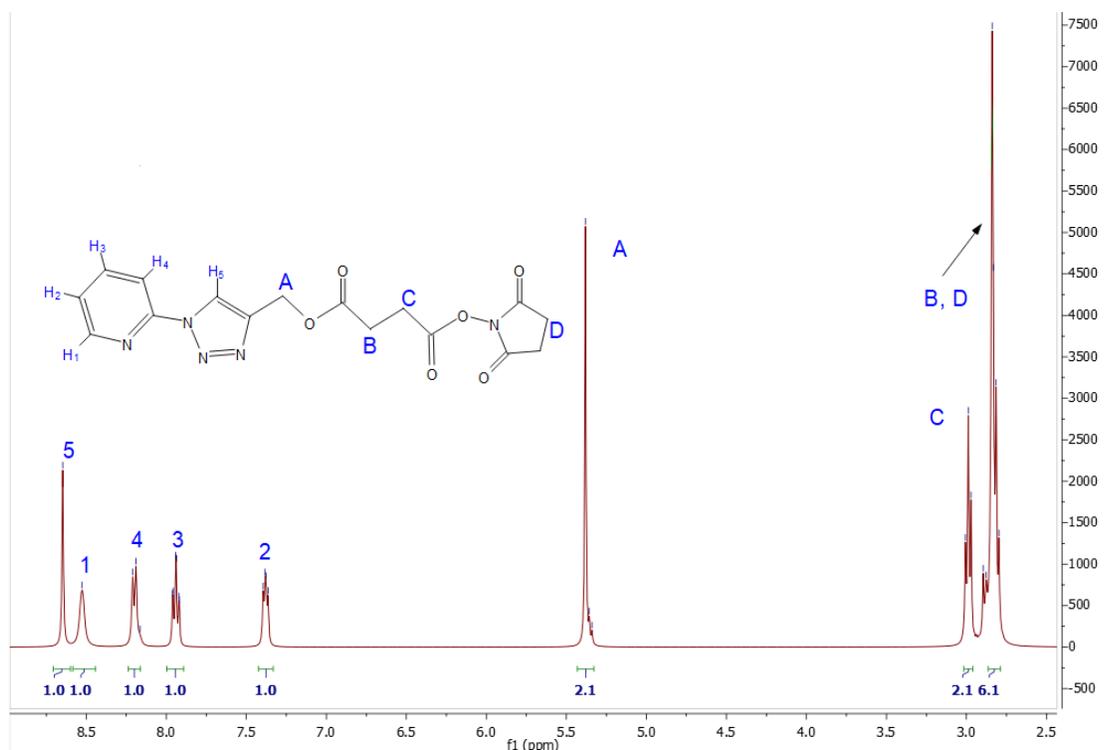


Рис. П17. Соотнесение сигналов ¹H ЯМР для N^N6 (растворитель – CDCl₃, RT, 400 МГц)

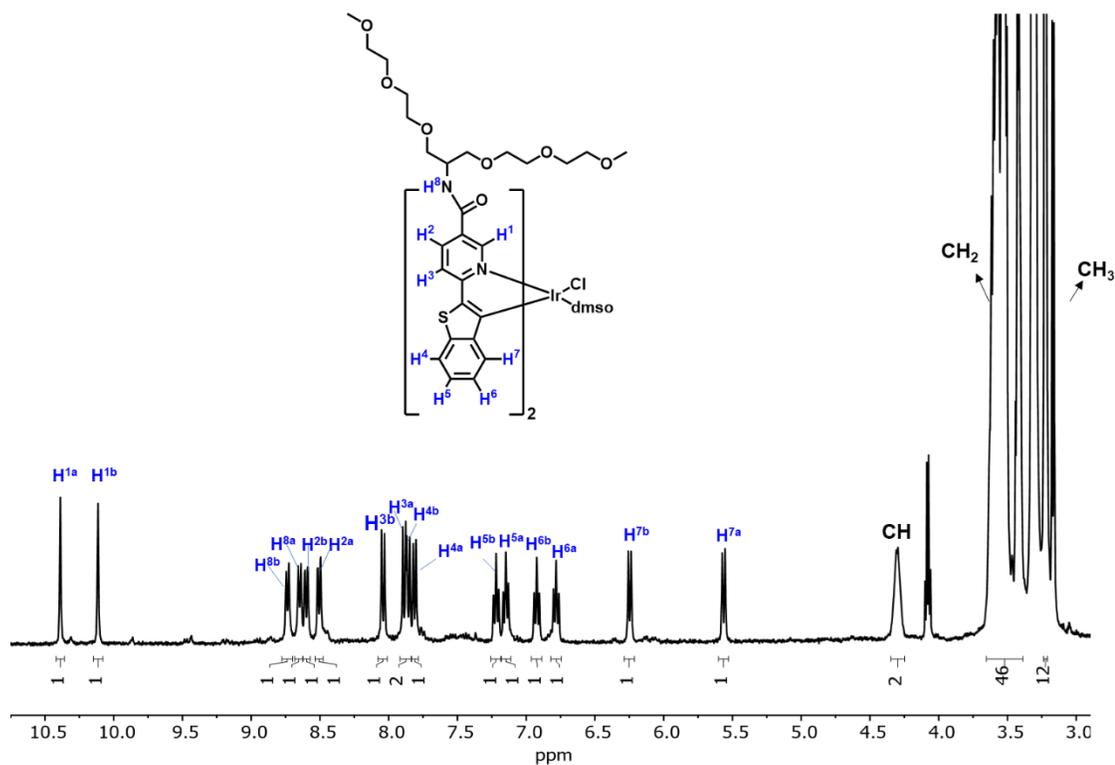


Рис. П18. Соотнесение сигналов ¹H ЯМР для димера [Ir₂(N^C3)₄Cl₂], (CD₃)₂SO (растворитель – (CD₃)₂SO, RT, 400 МГц)

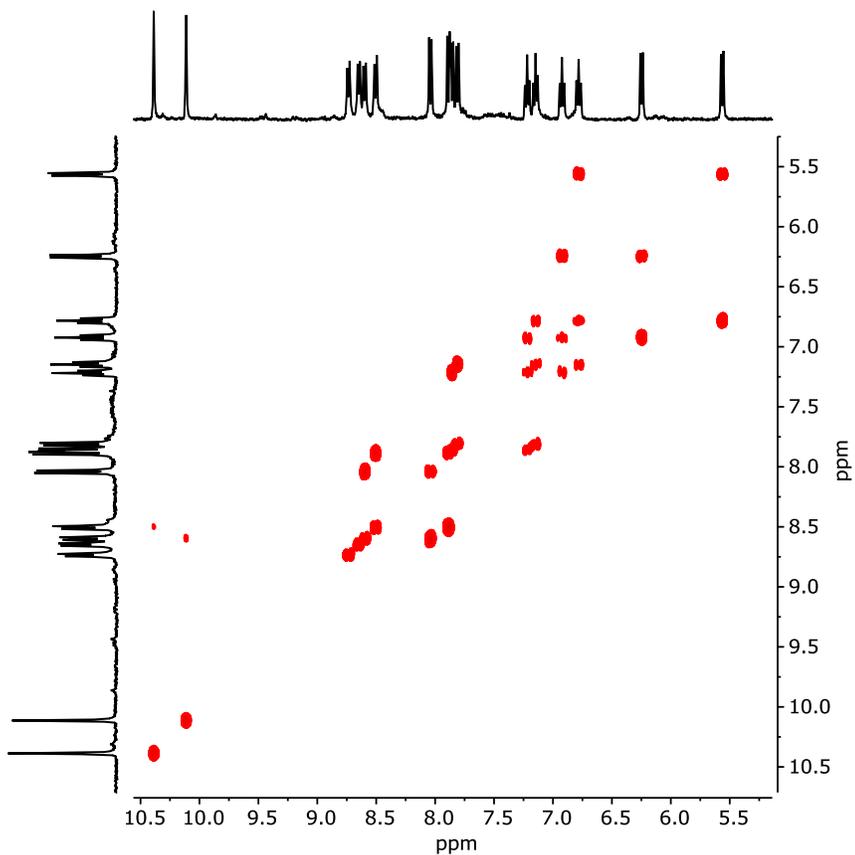


Рис.П19. COSY ЯМР для диссоциированного димера $[\text{Ir}_2(\text{N}^{\wedge}\text{C}_3)_4\text{Cl}_2]$, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, RT

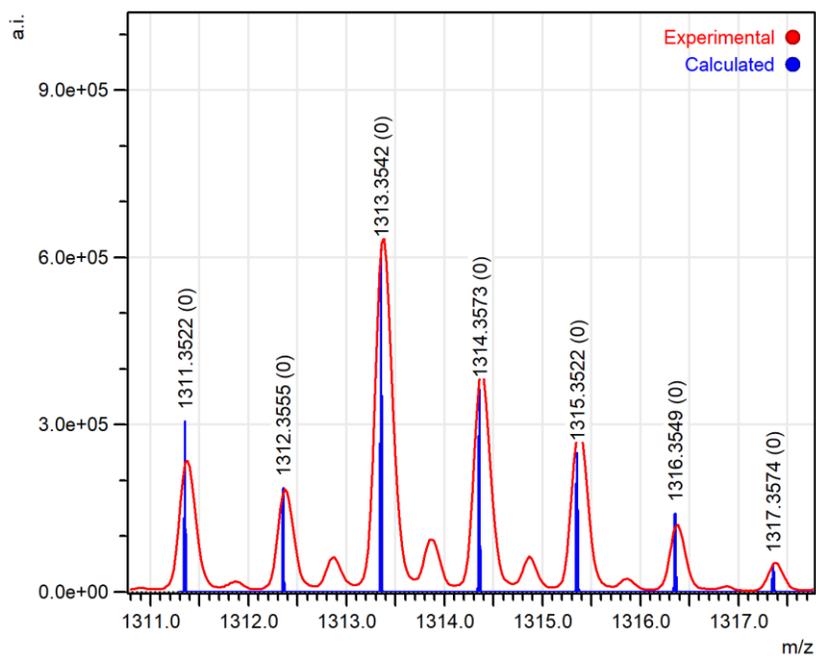


Рис.П20. Фрагмент расчётного и экспериментального масс-спектров для димера $[\text{Ir}_2(\text{N}^{\wedge}\text{C}_3)_4\text{Cl}_2]$.

