

Synteza i właściwości fotofizyczne nowych fluoroforów opartych na indolizynie

Jaqueline Stella Araujo Badaró

Promotor: Prof. Daniel T. Gryko

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest pogłębienie wiedzy dotyczącej indolizyn o rozszerzonym układzie sprzężonym π , traktowanych jako potencjalni kandydaci do zastosowań w bioobrazowaniu. Zakres badań obejmował zarówno udoskonalanie istniejących ścieżek syntezy znanych rdzeni indolizynowych, jak i opracowanie nowych strategii syntetycznych prowadzących do wcześniej nieopisanych struktur. Szczególny nacisk położono na racjonalizację wpływu podstawników na właściwości fotofizyczne otrzymywanych związków, co umożliwiło identyfikację struktur o szczególnie obiecujących właściwościach do dalszych zastosowań biologicznych. Przedstawione wyniki stanowią istotny wkład w rozwój chemii indolizyn oraz w projektowanie nowych sond fluorescencyjnych dla celów bioobrazowania.

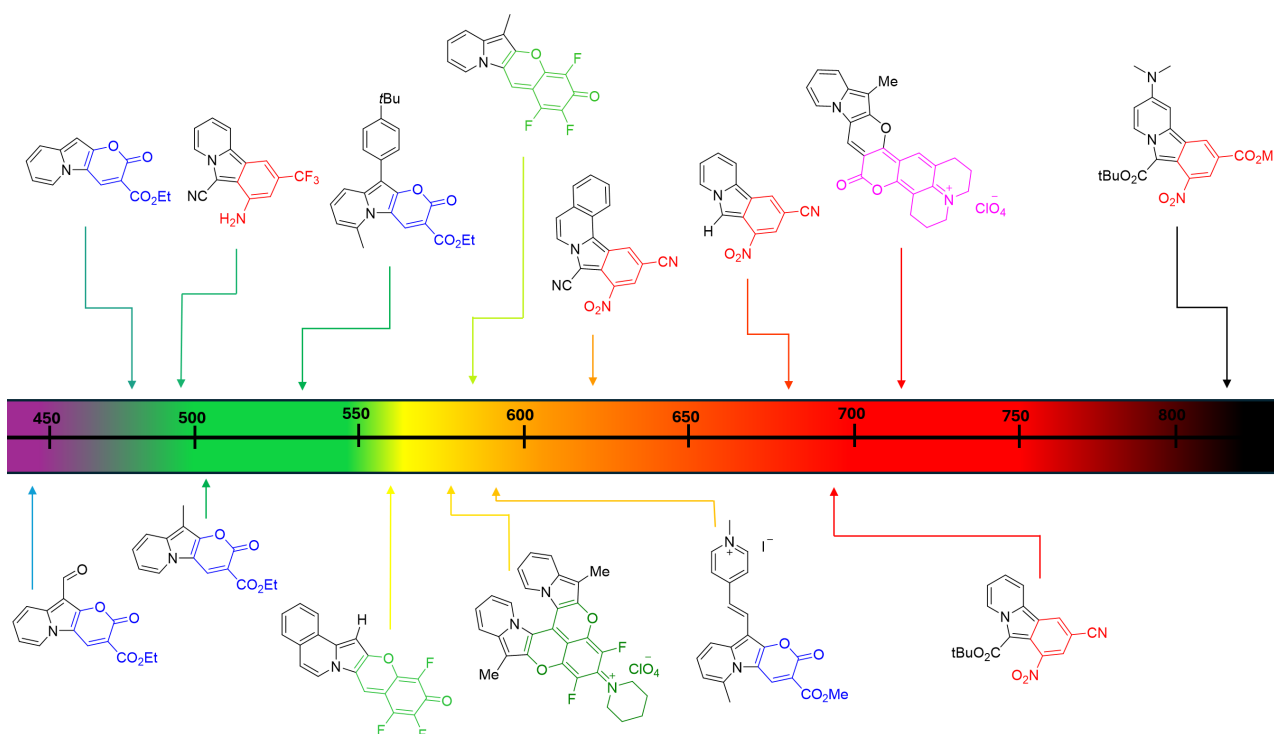
W ramach tego tematu opublikowano trzy artykuły oraz jedną pracę przeglądową, które zostały w całości włączone do niniejszej dysertacji.

Pierwszy projekt, którym się zajmowałam, zaowocował publikacją: „The Kröhnke synthesis of benzo[a]indolizines revisited: towards small, red light emitters”, w której opisałam zoptymalizowaną metodologię syntezy oraz rozszerzyłam bibliotekę **benzo[a]indolizyn**. Przedstawiłam również racjonalizację ich właściwości fotofizycznych w zależności od wprowadzonych podstawników. Synteza benzo[a]indolizyn – klasy indolizyn o rozszerzonym układzie sprzężonym π – została po raz pierwszy opisana przez Kröhnkego w latach 70. Opierała się ona na dwuetapowej reakcji soli pirydyniowych z 1-chloro-2,4,6-trinitrobenzenem, w której pierwszy etap prowadzono w CHCl_3 z użyciem nieorganicznej zasady K_2CO_3 , a drugi w DMSO z piperydyną pełniącą rolę zasady. Metodologia ta ograniczała się do otrzymania kilku produktów ze stosunkowo niskimi wydajnościami. Pierwszą modyfikacją, którą wprowadziłam w syntezie, było zastąpienie silnie wybuchowego 1-chloro-2,4,6-trinitrobenzenu mniej niebezpiecznymi pochodnymi 4-chloro-3,5-dinitrobenzenu, co pozwoliło mi uzyskać trzy produkty z wydajnościami na poziomie 20–30%. Drugą istotną zmianą było opracowanie bardziej odpowiedniego układu zasada–rozpuszczalnik, eliminującego konieczność izolowania związku pośredniego. Po przeprowadzeniu szeregu prób z różnymi zasadami i rozpuszczalnikami, dzięki zastosowaniu Cs_2CO_3 w sulfolanie, udało mi się zmniejszyć liczbę etapów syntetycznych, zwiększyć wydajności oraz skrócić czas reakcji soli pirydyniowej z pochodnymi 4-chloro-3,5-dinitrobenzenu. Pozwoliło mi to wyizolować jedenaście różnych produktów w wydajnościach od 5% do 80%, a dalsza funkcjonalizacja umożliwiła otrzymanie dwóch dodatkowych pochodnych. Po opracowaniu bardziej efektywnej ścieżki syntetycznej skupiłam się na badaniach właściwości fotofizycznych otrzymanych związków. Analiza wpływu różnych podstawników oraz ich położenia na właściwości fotofizyczne pozwoliła mi zracjonalizować zależności pomiędzy strukturą a fotofizyką tej klasy fluoroforów (rys. 1).

W drugim projekcie skupiłam się na optymalizacji metodologii syntezy estrów **2-okso-2H-pirano[2,3-b]indolizyno-3-karboksylowych**, zaproponowanej po raz pierwszy przez Kakehiego w latach 90., oraz na zbadaniu właściwości fotofizycznych otrzymanych pochodnych. Prace te doprowadziły do publikacji pt. „Strongly fluorescent indolizine-based coumarin analogs”. Kakehi przeprowadził reakcję wybranych soli pirydyniowych z dietylo-2-(etoksymetyleno)malonianem w EtOH, stosując K_2CO_3 jako zasadę. Zastępując węglan potasu

Cs_2CO_3 , udało mi się skrócić czas reakcji, a stosując zróżnicowany zestaw soli pirydyniowych, uzyskałam osiem produktów o wydajnościach 5–50%. Następnie przeprowadziłam dalszą funkcjonalizację, otrzymując pięć dodatkowych struktur. Dysponując szeroką gamą estrów 2-okso-2H-pirano[2,3-*b*]indolizyno-3-karboksylowych, przeprowadziłam badania fotofizyczne oraz racjonalizację ich właściwości fluorescencyjnych (przykłady pokazano na rys. 1). Wśród nich barwnik styrylowy został wybrany do barwienia linii komórkowej H9c2 i wykazał, po permeabilizacji digitoniną, selektywną lokalizację w jądrach komórkowych.

Ostatni projekt wykraczał poza udoskonalanie i rozwijanie wcześniejszych prac, prowadząc do odkrycia zupełnie nowej klasy fluoroforów. Wyniki tej pracy zostały opisane w publikacji pt. „The Hybrid of Indolizine and Merocyanine – A New Class of Organelle-specific Dyes”. W ramach tego projektu przeprowadziłam reakcję „one pot” indolizynoli, otrzymanych z soli pirydyniowych, z 2,3,5,6-tetrafluoro-4-hydroksybenzaldehydem w ksylenie, uzyskując sześć hybrydowych barwników polimetynowych (z wydajnościami 26–90%), które **nazwałam indolizyno-merocyjaninami (IndMers)**. Opracowaną metodologię rozszerzyłam również na reakcję z innymi aldehydami o podobnych właściwościach, uzyskując dwie nowe, dotychczas nieopisane struktury: barwnik ksantenowy w kształcie litery V oraz barwnik typu cyjanina. Dla otrzymanych struktur przeprowadziłam kompleksowe badania fotofizyczne (przykłady przedstawiono na rys. 1), które pozwoliły ustalić zależności między strukturą a właściwościami fotofizycznymi tych związków. Ponadto, dla wybranych struktur zbadalam fotostabilność i rozpuszczalność w środowisku wodnym. Co ważne jeden z otrzymanych związków charakteryzował się szczególnie korzystnymi właściwościami, w tym emisją w zakresie NIR, rozpuszczalnością w wodzie, wysoką przenikalnością do komórek HT1080 (fibrosarcoma) oraz MRC5 (normalne ludzkie fibroblasty płucne), a także zależną od kontekstu akumulacją w mitochondriach i jąderkach bogatych w RNA (w porównaniu odpowiednio z MitoTracker™ Green FM i SYTO RNaselect™). Świadczy to o tym, że udało mi się opracować nowy barwnik do bioobrazowania.



Rysunek 1. Struktura i wizualne porównanie emisji fluorescencyjnej wybranych przedstawicieli benzo[*a*]indolizyn, pirano[*b*]indolizyn oraz IndMerów w DCM.