



ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи,
д-р фіз.-мат. наук, проф.

В.О. Катрич

АНОТОВАНИЙ ЗВІТ

про виконану роботу у 2020 році в рамках реалізації проєкту
із виконання наукових досліджень і розробок

ІНДИКАТОРИ НА ОСНОВІ ПОХІДНИХ ХРОМОНУ ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО
ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ β -ГЛЮКОЗИДАЗ (назва Проєкту)

Назва конкурсу: «Підтримка досліджень провідних та молодих учених»
Реєстраційний номер Проєкту: 02.2020/0016

Підстава для реалізації Проєкту з виконання наукових досліджень і розробок (реєстраційний номер та назва Проєкту) 02.2020/0016 «Індикатори на основі похідних хромону для флуоресцентного визначення активності β -глюкозидаз»

Рішення наукової ради Національного фонду досліджень України щодо визначення переможця конкурсу «Підтримка досліджень провідних та молодих учених»
протокол від «16-17» вересня 2020 року № 21

1. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОЄКТ

Тривалість виконання Проєкту 3 роки ;
Початок – дата укладання Договору про виконання наукових досліджень і розробок: 27 жовтня 2020 р.
Закінчення – 2022 рік.

Загальна вартість Проєкту, грн. 8 000 000

Вартість Проєкту по роках, грн.:

1-й рік	<u>1 500 000</u>
2-й рік	<u>4 000 000</u>
3-й рік	<u>2 500 000</u>

2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ

до виконання Проєкту буде залучено 7 виконавців, з них:
доктори наук 2 ;
кандидати наук 1 ;
інші працівники 4 .

3. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ГРАНТООТРИМУВАЧА ТА ОРГАНІЗАЦІЮ СУБВИКОНАВЦЯ(ІВ) ПРОЄКТУ

Грантоотримувач: Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,
61022, м. Харків, майдан Свободи, 4

Субвиконавець: немає

4. ОПИС ПРОЄКТУ

4.1. Мета Проєкту (до 200 знаків)

Створення флуоресцентних індикаторів активності β -глюкозидази – глюкозидів похідних хромонів, які флуоресціюють у довгохвильовому діапазоні спектру для запобігання розпорощення їхнього випромінювання в біологічних середовищах.

4.2. Основні завдання Проєкту (до 400 знаків)

- Синтез нових похідних хромону з ефективним переносом протону у збудженому стані та інтенсивною флуоресценцією в довгохвильовому діапазоні спектру.
- Отримання 3-глюкозидів похідних хромону. Дослідження реакції глюкозилювання. Вивчення спектральних властивостей глюкозидів досліджуваних сполук.
- Дослідження кінетики гідролізу глюкозидів похідних хромону під впливом β -глюкозидази. Апробація отриманих індикаторів на зразках природного походження.

4.3. Детальний зміст Проєкту:

- Сучасний стан проблеми (до 400 знаків)

β -Глюкозидази – великий клас ферментів, приймаючих участь в метаболізмі вуглеводів в живих організмах. Існуючі методи оцінки активності глюкозидаз базуються на аналізі продуктів їх дії – вуглеводів. Такі методи мають низьку чутливість.

Нові перспективні методи базуються на розщепленні глюкозидованих флуорофорів, що випромінюють при 400-480 нм. Така флуоресценція розпорощується в біологічних середовищах, що також знижує чутливість визначення індикатора.

- Новизна Проєкту (до 400 знаків)

Новизна проєкту – у створенні флуоресцентних індикаторів активності β -глюкозидаз нового типу – похідних 3-гетарил- або 3-арилхромонів. Оцінка активності базується на появленні флуоресценції фототаутомера, що утворюється при гідролізі індикатора.

Новий клас індикаторів працюватиме при рН оптимальних для дослідження активності глюкозидаз. В залежності від замісників фототаутомер флуоресціює в області 500-650 нм, що знижує вплив розпорощування світла.

- Методологія дослідження (до 400 знаків)

Проєкт включає три методологічно різних етапи:

- Теоретичний дизайн молекул, синтез та оптимізація методів отримання нових похідних гетарил- (арил-) хромонів.
- Здійснення реакцій глюкозидування отриманих сполук для створення індикаторів активності β -глюкозидази
- Дослідження реакції гідролізу отриманих глікозидів гетарил- (арил-) хромонів за участю β -глюкозидаз. Експерименти з нативними зразками що містять β -глюкозидази

5. ОТРИМАНІ НАУКОВІ АБО НАУКОВО-ТЕХНІЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ (до 2 сторінок) в поточному році/ в рамках реалізації Проєкту, зокрема:

5.1. Опис наукових або науково-технічних результатів, отриманих в рамках виконання Проєкту (із зазначенням їх якісних та кількісних (технічних) характеристик)

У рамках виконання першого завдання проєкту проведено аналіз оптимальної геометрії та спектральних властивостей модельної сполуки-аглікону, дані для якої є у літературних джерелах. Порівняння результатів розрахунків з вже існуючими експериментальними даними дозволило відібрати найбільш адекватний метод розрахунку, а саме – функціонал та набір базисних функцій, найбільш прийнятні для обчислення структур на основі похідних хронону. Отримані дані дозволили перейти до конформаційного аналізу хімічної будови і спектральних властивостей глюкозидів.

Було показано, що:

- Будова та електронний спектр поглинання хрононів та їхніх похідних добре описуються методом TD-CAM-B3LYP/cc-pVDZ//PCM (для розчинника – води).
- Глюкозиди флавоноїдів (як і відповідних гетарилхрононів) можуть існувати в п'яти стабільних конформаціях; найбільш вірогідним є утворення конформеру з водневим зв'язком між глюкозидним залишком і карбонільною групою флавонолу.
- Глюкозидування 4'-фтор-3-гідроксифлавонолу з утворенням 4'-фтор-3-гідроксифлавоно- β -D-глюкопіранозиду, а відповідно, глюкозидування усіх сполук подібної структури, призводить до гіпсохроного зсуву довгохвильової смуги поглинання. Таким чином, дія β -глюкозидази має приводити до протилежного – довгохвильового зсуву смуги в спектрах поглинання флавонол-глюкозидів. Виявлено, що зсув довгохвильової смуги поглинання при введенні β -D-глюкопіранозиду обумовлений порушенням планарності молекули хронону за рахунок стеричного ефекту об'ємного глюкопіранозидного циклу
- Довгохвильові переходи флавонол-аглікону і глюкозиду мають $\pi\pi^*$ природу і тому здатні мати власну флуоресценцію. Як наслідок, дія β -глюкозидази повинна викликати зміни флуоресценції індикаторів на основі 3- β -D-глюкопіранозилокси-2-гетарилхрононів або 3- β -D-глюкопіранозилокси-2-арилхрононів (глюкозидів флавонолів).

Друге завданням проєкту було присвячено аналізу існуючих стратегій та методів глюкозидування сполук, що мають флавоноїдну будову, або подібну до неї.

Глюкозидування флавоноїдів є мало дослідженою частиною хімії глікозидів. Наявні дані є суперечливими та мають низьку відтворюваність. Крім того, синтез глюкозидів гетарил- або флавонолів є 5-6-стадійним, і необхідно було вибрати місце реакції глюкозидування у послідовності стадій (стратегію синтезу) та умови проведення глюкозидування в узгодженні з вимогами щодо інших стадій (тип реакції і умови її протікання). Також треба, щоб глюкозильна група приєднувалася до визначеного місця в хрононовому фрагменті, тобто реакція глюкозидування була регіоселективною. Отже, пошук проводили в трьох напрямках – вибір стратегії синтезу, аналіз існуючих реакцій та умов їх протікання, аналіз регіоселективності зазначених процесів. Глибина пошуку – починаючи з 1901 року (з моменту відкриття реакції Кьоніга-Кнорра) до наших часів.

Аналіз літературних джерел, співставлення стратегій синтезу, конкретних реакцій глюкозидування, а також даних щодо регіоселективності зазначених процесів, дозволив зробити наступні висновки:

- Найбільш придатною для отримання глюкозидів гетарилхрононів та флавонолів і, далі, індикаторів активності β -глюкозидази є стратегія глюкозидування на останній або передостанній стадіях синтезу.
- Найбільш адекватною реакцією приєднання глюкозильного фрагменту є двофазний синтез в системі хлороформ : вода з додаванням луку та міжфазного каталізатору – броміду тетрабутиламонію.

- Регіоселективність глюкозидування має забезпечуватися вибіркоким захистом гідроксигруп бензилхлоридом на першій стадії синтезу. Зняття захисту проводитиметься газоподібним воднем у присутності паладованого вугілля після глюкозидування.
- Гідроліз ацетильних груп глюкозиду має проводитися на останній стадії синтезу метанолятом чи гідроксидом натрію.

За результатами аналізу стратегій синтезу глюкозидів флавоноїдів, та реакцій глюкозидування написана стаття-огляд. Рукопис статті надіслано до журналу "Frontiers in Chemistry. Organic Chemistry" (Швейцарія, індексується в Scopus та Web of Science).

Третє завдання присвячене технічній частині проекту – синтезу та накопиченню базових сполук – ароматичних та гетероароматичних альдегідів, ацетофенонів, а також продуктів їх конденсації – 2'-гідроксикалконів, які є відправними сполуками для подальшого (на наступних етапах проекту) синтезу флавонолів або 3-гідрокси-2-гетероарилхромонів.

В процесі виконання проекту були отримані тіазольні альдегіди з різними замісниками, проведено синтез відповідних проміжних продуктів – тіазольних аналогів халконів. Також проводилися синтез та напрацювання 4'-нітрофлавонолу – перспективного аглікону для синтезу на його основі індикатора активності β-глюкозидази. Також синтезовані новий проміжний продукт – 3,4-добензілоксикалкон, та, на його основі, аглікон – 3',4'-добензілоксифлавонол.

Усього синтезовано 16 вихідних та 5 проміжних сполук, а також два аглікони флавонолів. Модифіковано способи отримання проміжних сполук.

На даному етапі синтез і накопичення зазначених речовин продовжується, проводиться комплексне дослідження їх фізико-хімічних характеристик.

За результатами синтетичних робіт написано і подано рукописи двох публікацій в журнал "Functional Materials" (Україна, індексується в Scopus).

5.2. За наявності науково-технічної продукції обґрунтування її переваг у порівнянні з існуючими аналогами

Створення науково-технічної продукції на цьому етапі проекту не планувалося.

5.3. Практична цінність отриманих результатів реалізації Проекту для економіки та суспільства (стосується проектів, що передбачають проведення прикладних наукових досліджень і науково-технічних розробок)

Прикладні дослідження на цьому етапі проекту не планувалося.

5.4. Опис шляхів та способів подальшого використання результатів виконання Проекту в суспільній практиці.

Результати, отримані на даному етапі проекту, можуть бути використані в теоретичній біоорганічній хімії та біохімії для моделювання структур і спектральних властивостей глюкозидів.

Звіт не містить відомостей, заборонених до відкритого опублікування

Науковий керівник Проекту

Завідувач відділу фізико-органічної хімії

О.Д. Рошаль

