

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук**

На правах рукописи

Балеева Надежда Сергеевна

**Синтез и свойства флуоресцентных красителей
на основе аналогов хромофора GFP**

специальность – 02.00.10 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва 2019

Работа выполнена в отделе биомолекулярной химии в группе химии гетероциклических соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Научный руководитель:

Кандидат химических наук Баранов Михаил Сергеевич

Официальные оппоненты:

Тараканов Павел Александрович, кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории фталоцианинов и их аналогов ФГБУН Института физиологически активных веществ Российской академии наук.

Вацадзе Сергей Зурабович, доктор химических наук, профессор кафедры органической химии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН)

Защита состоится 9 октября 2019 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан « » 2019 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук
В.А. Олейников**



ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Флуоресценция – это способность некоторых веществ испускать свет под действием излучения с меньшей длиной волны. Явление флуоресценции находит широкое применение в различных областях жизни человека: от бытового использования до научно-исследовательской практики.

Особенно важную роль флуоресценция сыграла в развитии биологических исследований. Поскольку большая часть соединений в клетке бесцветна, наблюдение за ними невозможно без предварительного введения каких-либо меток. На сегодняшний день разработано немало методов маркирования и типов меток, но флуоресцентные маркеры выделяются на фоне других благодаря широкому распространению флуоресцентной микроскопии в исследовательских лабораториях и ряду прикладных преимуществ: как правило, они имеют низкую токсичность и безопасны, а использование меток разного цвета позволяет специфически «красить» различные биологические объекты одновременно. И хотя научному сообществу удалось достигнуть больших успехов в этой области, поиск идеальной флуоресцентной метки по-прежнему остается актуальным.

Одной из популярных меток являются флуоресцентные белки, например зеленый флуоресцентный белок (GFP). Отличительной особенностью ряда флуоресцентных белков является способность автокаталитически формировать ароматическую структуру – хромофор, который и отвечает за поглощение и испускание белками видимого света.

Сочетание таких свойств хромофора GFP, как малый размер, высокая гидрофильность и высокий коэффициент молярного поглощения, очевидным образом сделало его интересным объектом для исследований. Особенно важным достижением стала разработка метода структурной модификации – введение фиксирующего фрагмента, что привело к многократному увеличению квантового выхода флуоресценции (КВФ). Однако, не смотря на высокую перспективность, вопрос создания разнообразных флуоресцентных маркеров на основе хромофоров не был проработан.

Цели и задачи исследования. Целью этой работы стало создание флуоресцентных производных хромофоров флуоресцентных белков и установление взаимосвязи между их строением и свойствами.

В рамках поставленной цели были сформулированы задачи:

- Синтезировать конформационно зафиксированные аналоги хромофоров белка Sirius и цианового флуоресцентного белка (CFP).
- Синтезировать ряд конформационно зафиксированных аналогов хромофора белка Kaede и изучить влияние подвижных фрагментов молекулы на оптические свойства.
- Расширить ряд аминных аналогов хромофора GFP и изучить влияние заместителей на атоме азота на величину квантового выхода флуоресценции.

- Создать ряд производных синтетического хромофора GFP, отличающихся более длинной цепью сопряжения связей, и изучить влияние этой модификации на оптические свойства.
- Разработать методы введения во флуоресцентные красители функциональных групп пригодных для конъюгации с другими молекулами.
- Предложить методы введения во флуоресцентные красители сенсорных групп. Продемонстрировать эффективность этих подходов на примере синтетических аналогов хромофора GFP.

Научная новизна и практическая ценность работы. Впервые синтезированы высокофлуоресцентные аналоги хромофоров белков Sirius, CFP и Kaede. Изучено влияние строения и природы заместителей во всех положениях конформационно зафиксированных хромофоров на их свойства. Созданы аналоги хромофора GFP, характеризующиеся максимумами эмиссии в оранжевой и красной области спектра. Разработаны удобные методы функционализации флуоресцентных красителей.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Фиксация подвижных фрагментов во втором и четвертом положениях имидазолонна позволяет многократно увеличить квантовый выход флуоресценции хромофоров флуоресцентных белков.
- Увеличение системы сопряженных связей производных хромофора GFP приводит к батохромному смещению максимумов поглощения и испускания.
- Аналоги хромофора GFP могут быть использованы в качестве флуоресцентных сенсоров и красителей.

Апробация полученных данных и публикации. Основные материалы диссертации были доложены на XXI международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2014» (Москва, 2014), конкурсе молодых ученых в рамках XXVIII Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2016), а также на XXIII международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2016» (Москва, 2016). По материалам диссертации опубликовано 8 статей в рецензируемых журналах.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 156 страницах и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, благодарностей, списка сокращений и условных обозначений, а также списка цитируемой литературы, включающего 224 ссылки. Диссертация содержит 24 рисунка, 111 схем и 6 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы представлен в первой главе диссертации и включает в себя два раздела. Первый раздел посвящен описанию современных методов создания 4-метилен-1H-имидазол-5(4H)-онов – общего структурного ядра хромофоров флуоресцентных белков. Второй раздел посвящен описанию строения и свойств арилметеновых флуоресцентных красителей – структурных аналогов хромофоров флуоресцентных белков.

Экспериментальная часть представлена в третьей главе диссертации и включает в себя описание методов синтеза веществ представленных в настоящей работе.

Синтетические аналоги хромофоров флуоресцентных белков

Разнообразные производные хромофоров флуоресцентных белков, имеющие в своей основе структуру имидазолона (4-бензилиден-1H-имидазол-5(4H)-она), являются перспективными претендентами на роль новой группы флуоресцентных красителей. Эти соединения имеют малый размер, низкую степень гидрофобности, а также разнообразную и интенсивную окраску.

Недавно в нашей лаборатории были проведены исследования различных синтетических аналогов хромофора зеленого флуоресцентного белка, которые позволили выявить взаимосвязь между строением молекулы и величиной квантового выхода флуоресценции подобных соединений. Было установлено, что непосредственное влияние на КВФ оказывает подвижность бензилиденового фрагмента хромофора. Так при введении в молекулу фиксирующей дифторборильной группы происходит многократное увеличение интенсивности эмиссии и квантовый выход достигает 73%, что близко к аналогичному показателю для самого GFP (79%):

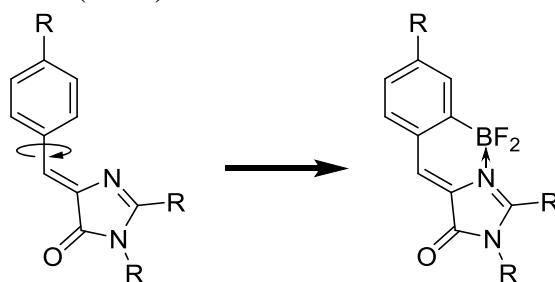


Схема 1. Хромофор флуоресцентного белка с зафиксированной структурой.

Разработка метода введения BF₂-группы в молекулу хромофора позволила не только существенным образом повлиять на оптические свойства, но и создать небольшой ряд высокофлуоресцентных родственных соединений.

Настоящая работа посвящена развитию предложенного направления и созданию новых синтетических аналогов зафиксированных имидазолонов. Она состоит из трех частей: синтез хромофоров различных флуоресцентных белков; создание отдаленных аналогов хромофоров; разработка методов введения функциональных групп в структуры хромофоров.

1. Прямые аналоги хромофоров флуоресцентных белков

В первой части данного исследования модификация, заключающаяся во введении дифторборильной группы, была использована для создания конформационно зафиксированных синтетических аналогов хромофоров флуоресцентных белков - мутантов GFP: цианового флуоресцентного белка (CFP) и белка Sirius, а также белка Kaede. Это позволило показать, что непосредственное увеличение КВФ и изменение других оптических свойств при фиксации подвижного бензилиденового фрагмента характерно не только для хромофора GFP, но и для хромофоров других флуоресцентных белков.

1.1 Высокофлуоресцентные синтетические аналоги хромофоров белка Sirius и CFP

Конформационно зафиксированные аналоги хромофоров белка Sirius и CFP **2.1.3** были получены при воздействии трибромида бора на имидазолонны **2.1.2**. Последние, в свою очередь, были синтезированы с помощью циклоприсоединения иминов **2.1.1** к иминоэфиру:

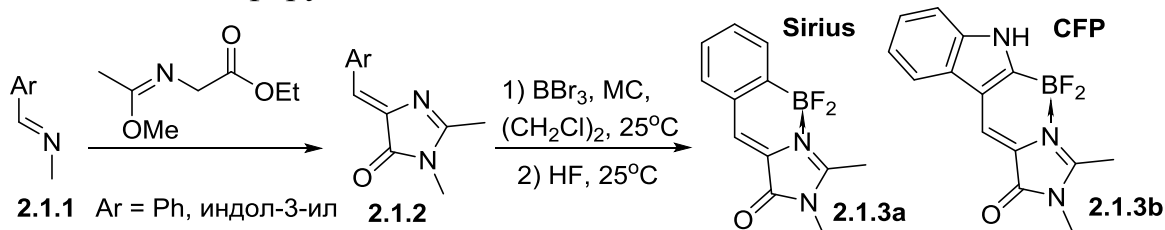


Схема 2. Получение борированных производных **2.1.3**.

Изучение оптических свойств полученных соединений показало, что борированные производные демонстрируют более чем стократное увеличение квантового выхода в сравнении с исходными имидазолоннами **2.1.2**. Также наблюдается батохромное смещение спектральных максимумов в сравнении, как с предшественниками, так и с соответствующими белками:

Таблица 1. Оптические свойства соединений **2.1.2**, **2.1.3** и соответствующих им флуоресцентных белков в воде.

Соединение	Абс.	Эм.	КВФ
2.1.3a	368	430	~0.10*
2.1.2a	350		<0.001
Белок Sirius	355	424	0.24
2.1.3b	476	520	0.59
2.1.2b	408		<0.001
CFP	434	474	0.40

* - величина квантового выхода зависит от концентрации

Исследование кислотно-основных свойств зафиксированных аналогов **2.1.3** показало, что при подкислении водных растворов в спектрах абсорбции не наблюдалось никаких изменений. При pH 6-13 спектры абсорбции имели более сложный характер. Так, для соединения **2.1.3b** наблюдалось два независимых процесса. Первый имел обратимый характер и сопровождался небольшим гипсохромным сдвигом положений максимумов абсорбции и эмиссии на ~15 нм, при $pK_a = 9.8-9.9$ (Рисунок 1). Стоит отметить, что при подобном переходе не

происходило заметного снижения интенсивности флуоресценции. Такой эффект можно объяснить возможным депротонированием аминогруппы, что уже наблюдалось на примере триптофансодержащих белков¹. Дальнейшее увеличение рН выше 12 приводило к сильному смещению положения максимума абсорбции до 430 нм. Для соединения **2.1.3a** при рН > 12 тоже был зафиксирован заметный гипсохромный сдвиг примерно на 70 нм:

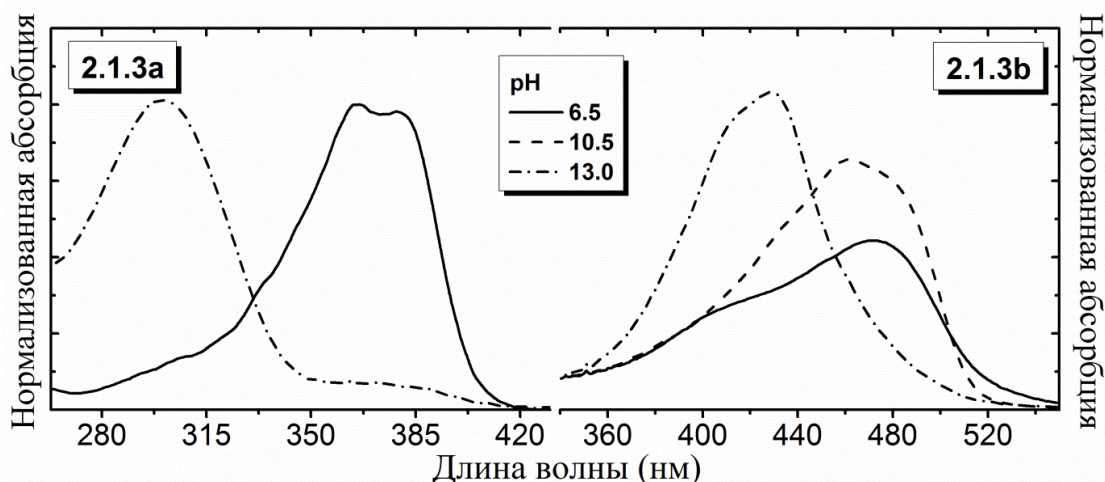


Рисунок 1. Спектры абсорбции соединений **2.1.3** в воде при различном значении рН.

В заключение можно сказать, что полученные соединения являются хорошими претендентами на роль флуоресцентных красителей. Они характеризуются высокими показателями квантового выхода, а все рН-зависимые процессы лежат за пределами физиологической области и не препятствуют их применению в живых системах.

1.2 Высокофлуоресцентные синтетические аналоги хромофора белка Kaede

Другим направлением этого исследования стало создание зафиксированных аналогов хромофора белка Kaede. Эти соединения содержат дополнительные сопряженные заместители во втором положении имидазольного цикла, которые существенно влияют на оптические свойства. Наиболее удобным подходом для их создания является использование уже борированного аналога хромофора GFP:

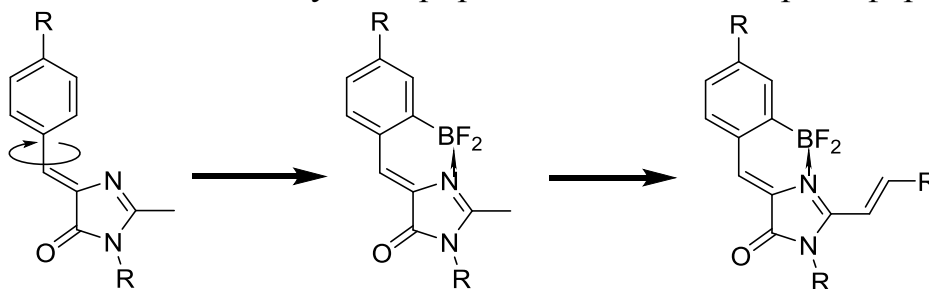


Схема 3. Возможный подход к созданию синтетических аналогов хромофора Kaede.

Возможность проведения этого превращения обуславливается высокой реакционной способностью метильной группы. Например, известно, что хромофор GFP легко вступает в реакцию конденсации с различным ароматическими

¹ Brakemann T., Stiel A.C., Weber G., Andresen M., Testa I., Grotjohann T., Leutenegger M., Plessmann U., Urlaub H., Eggeling C., Wahl M.C., Hell S.W., Jakobs S. A reversibly photoswitchable GFP-like protein with fluorescence excitation decoupled from switching // *Nat. Biotechnol.* 2011. Т. 29. № 10. С. 942–947

альдегидами в присутствии кислот Льюиса². Было установлено, что при конденсации соединения **2.1.4** с ароматическими хлорангидридами образуются кетоны **2.1.5**:

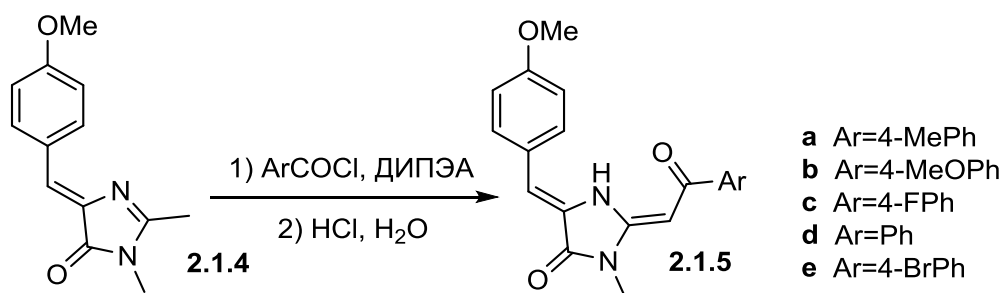


Схема 4. Конденсация имидазолонa **2.1.4** с ароматическими хлорангидридами.

Для создания конформационно зафиксированных аналогов хромофора Kaede была использована похожая конденсация. Борированный аналог хромофора GFP конденсировали с различными ароматическими альдегидами в смеси пиридин-пиперидин при нагревании:

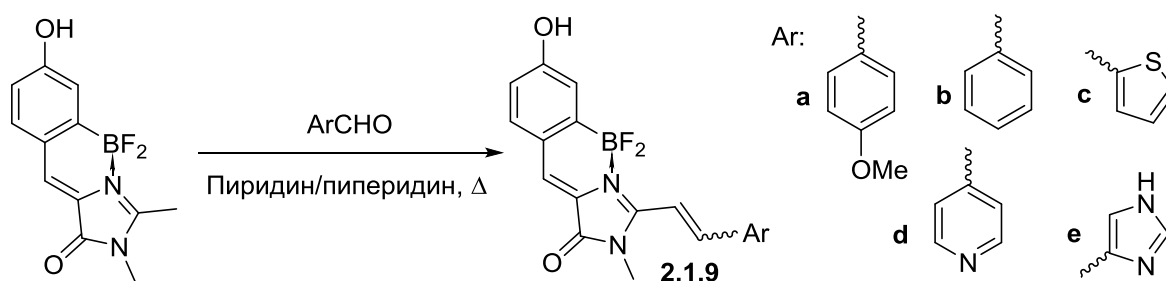


Схема 5. Конденсация с ароматическими альдегидами.

В ходе синтеза также было замечено, что некоторые соединения **2.1.9** достаточно легко претерпевают изомеризацию по двойной связи во втором положении имидазолонного цикла. В растворах в полярных растворителях уже в течение нескольких часов образовывалась смесь цис- и транс-изомеров. Аналогичное превращение наблюдалось и в процессе очистки этих соединений на силикагеле. Такая склонность к быстрой изомеризации не позволила выделить в чистом виде наиболее близкий к природному хромофору белка Kaede борированный аналог **2.1.9e**.

Исследование оптических свойств показало, что конформационно зафиксированные производные **2.1.9** имеют КВФ 3-15% в зависимости от арильного заместителя и используемого растворителя. При изучении спектров абсорбции водных растворов при различных значениях pH было установлено, что для всего ряда соединений **2.1.9** характерно депротонирование фенольной группы, которое сопровождается батохромным смещением максимумов абсорбции на ~100 нм и характеризуется рКа порядка 7.1-7.5.

Положения максимумов абсорбции и эмиссии сильнее смещаются в длинноволновую область с усилением акцепторных свойств введенного арильного заместителя (Таблица 2):

² Chuang W.-T., Chen B.-S., Chen K.-Y., Hsieh C.-C., Chou P.-T. Fluorescent protein red Kaede chromophore; one-step, high-yield synthesis and potential application for solar cells // *Chem. Commun.* 2009. № 45. С. 6982–6984.

Таблица 2. Оптические свойства соединений 2.1.9 в различных растворителях.

Соединение	EtOH		CH ₃ CN		
	Нейтр.	Анион.	Нейтр.	Анион.	
2.1.9a	Абс.	457	550	440	546
	Эм.	569	652	560	663
2.1.9b	Абс.	467	571	436	565
	Эм.	556	639	561	675
2.1.9c	Абс.	468	579	448	581
	Эм.	577	666	567	709
2.1.9d	Абс.	484	590	441	605
	Эм.	586	681	576	716
2.1.9f	Абс.	597		581	
	Эм.	705		719	
2.1.9g	Абс.	629		608	
	Эм.	-		-	

Для того чтобы еще больше сместить максимумы абсорбции и эмиссии в длинноволновую область спектра, были синтезированы соединения **2.1.9f** и **2.1.9g**, содержащие более сильный донор в бензилиденовой части молекулы:

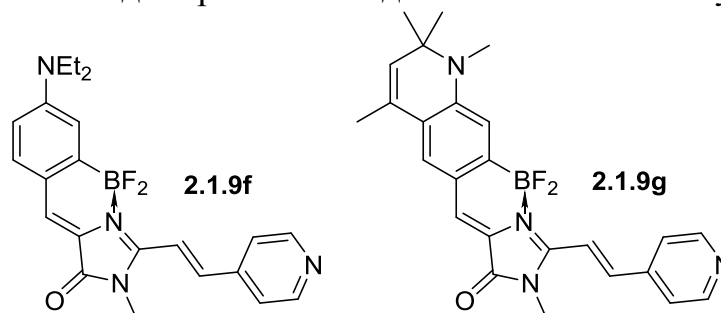


Схема 6. Аминопроизводные борированного хромофора белка Kaede.

Такие производные имели максимумы абсорбции и эмиссии в области 600-700 нм (Таблица 2), однако характеризовались более низким квантовым выходом (~0.1% для **2.1.9g** в диоксане).

Вероятно, что столь низкие показатели квантового выхода флуоресценции всего ряда соединений вызваны наличием в молекулах соединений **2.1.9** дополнительной кратной связи, подвижность которой может приводить к безызлучательным процессам. Очевидно, что эту проблему можно решить с помощью жесткой фиксации. В ходе создания таких производных на первом этапе были получены исходные хромофоры **2.1.10**, при последующем взаимодействии которых с трибромидом бора в присутствии молекулярных сит образовывалась сложно разделяемая смесь продуктов. Однако целевые производные **2.1.11** удалось получить при замене молекулярных сит на диизопропилэтиламин:

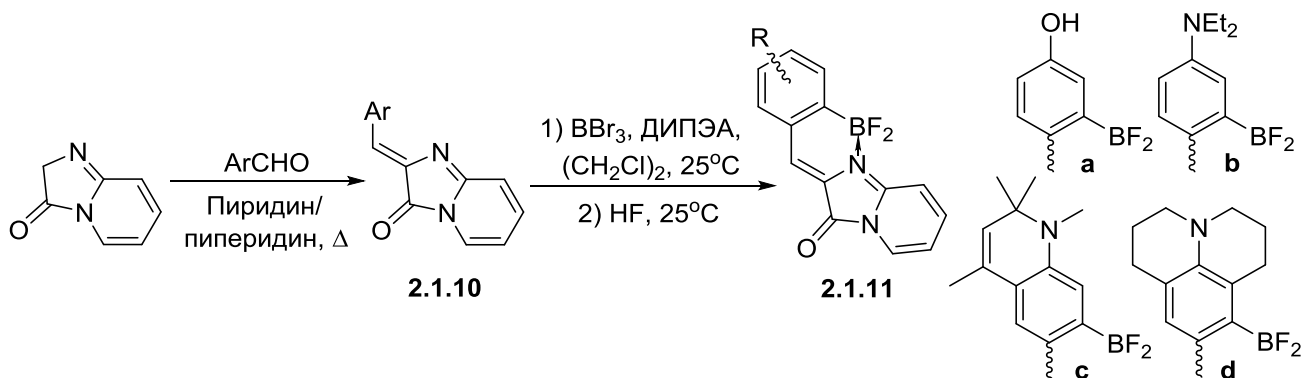


Схема 7. Аминопроизводные борированного хромофора белка Каеде.

Изучив оптические свойства соединений **2.1.11**, мы установили, что наибольшим батохромным смещением спектральных максимумов характеризуются соединения, содержащие более сильный донорный заместитель в бензилиденовой части молекулы:

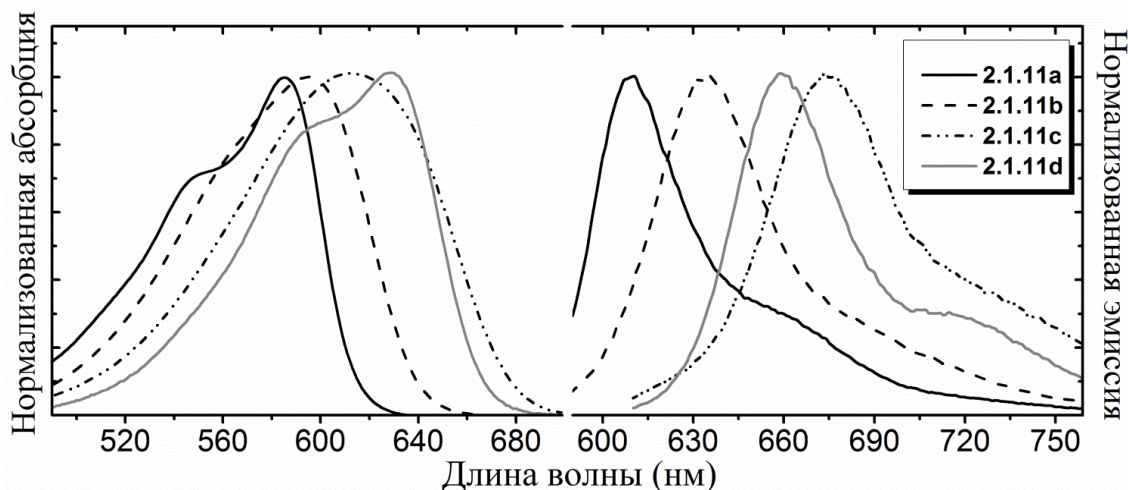


Рисунок 2. Спектры абсорбции и эмиссии соединений 2.1.11 в этаноле (для соединения 2.1.11a депротонированная форма).

Было установлено, что фиксация двойной связи действительно позволила увеличить величину квантового выхода флуоресценции до 50-60%:

Таблица 3. Квантовые выходы флуоресценции соединений 2.1.11a-d в различных растворителях.

Соединение	H ₂ O	EtOH	CH ₃ CN	EtOAc	Диоксан
2.1.11a	-	-	0.53	0.47	-
2.1.11b	0.19	0.37	0.40	0.53	0.66
2.1.11c	0.07	0.15	0.15	0.23	0.33
2.1.11d	0.05	0.08	0.08	0.16	0.26

Интересно отметить, что для аминопроизводных **2.1.11b-d** величина квантового выхода варьируется в зависимости от используемого растворителя, что вероятно свидетельствует о возникновении нефлуоресцентного ICT-состояния (подробнее далее).

Изучение спектров абсорбции водных растворов всего ряда соединений **2.1.11** при различных значениях pH показало, что добавление кислот и щелочей приводило к заметному смещению спектральных максимумов: переход к

анионной форме производного **2.1.11a** характеризовался батохромным сдвигом около 60 нм ($pK_a = 7.2$), а протонирование аминных производных **2.1.11b-d** привело к гипсохромному смещению на 140-170 нм (для **2.1.11b** $pK_a = 3.6$, для **2.1.11c,d** $pK_a = \sim 1.2$).

Таким образом было установлено, что фиксация бензилиденового фрагмента в четвертом положении хромофора Kaede существенно увеличивает величину квантового выхода подобных соединений. При дополнительной фиксации двойной связи наблюдается еще большее увеличение КВФ приблизительно до 60%. Использование другой модификации – введение аминозаместителя в бензилиденовый фрагмент хромофора – позволило значительно сместить спектральные максимумы в длинноволновую область спектра. Однако присутствие аминозаместителя в хромофоре приводит к заметному варьированию квантового выхода, что является интересным предметом для исследования и будет рассмотрено в следующем разделе.

2. Отдаленные аналоги хромофора GFP

На следующем этапе этой работы мы решили расширить существующий круг производных борированного хромофора GFP, используя различные модификации, влияющие на оптические свойства красителей. А именно создать ряд аминопроизводных с заместителями разной геометрии и синтезировать соединения, содержащие более длинную цепь сопряжения: полиароматические аналоги и производные с ацетиленовыми заместителями.

2.1 Аминные аналоги

Замена гидроксильной группы в структуре зафиксированного хромофора GFP на различные аминозаместители (Схема 8, соединения **2.2.2**), проведенная ранее в нашей лаборатории, позволила сместить спектральные максимумы в более длинноволновую область спектра.

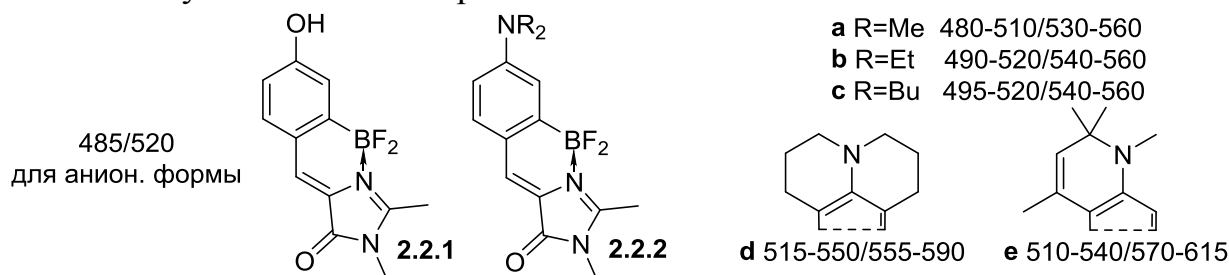


Схема 8. Аминные аналоги конформационно зафиксированного хромофора GFP.

Однако для этих соединений была выявлена определенная зависимость величины квантового выхода флуоресценции от среды: при переходе к протонным растворителям (вода, этиловый спирт или ацетонитрил) этот показатель существенно снижался.

Подобное поведение уже наблюдалось ранее для других красителей с аналогичными аминозаместителями и объясняется возможностью образования отдельного возбужденного состояния с высокой степенью перераспределения заряда (ICT – Intramolecular Charge Transfer). Как правило, при этом наблюдается уменьшение квантового выхода флуоресценции основного возбужденного состояния. Стабилизация же ICT-состояния предположительно происходит за счет изменения геометрии молекулы и формированием либо свернутой структуры

молекулы (TICT – Twisted Intramolecular Charge Transfer), либо планарной хиноидной структуры (PICT – Planar Intramolecular Charge Transfer):

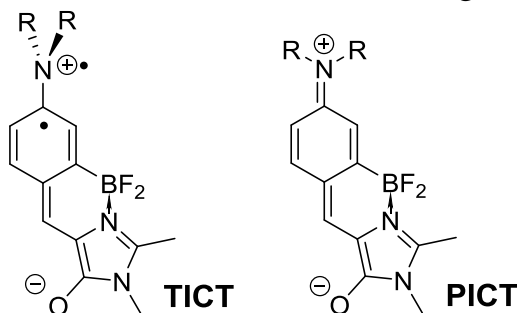


Схема 9. Стабилизация ICT-состояния.

Один из способов уменьшить вероятность образования TICT-состояния заключается в фиксации алкильных заместителей на атоме азота, которая препятствует формированию свернутой структуры. В нашей лаборатории было создано несколько таких аминопроизводных борированного хромофора GFP (соединения **2.2.2d,e**, Схема 8). Однако все они также характеризовались заметным варьированием величины квантового выхода флуоресценции: в диоксане 70-90%, в воде 15-50%.

В литературе также был предложен подход, предотвращающий формирование PICT-состояния: введение различных циклических заместителей по атому азота^{3,4}. Согласно модели, предложенной авторами, присутствие таких заместителей существенно препятствует формированию хиноидной структуры, так как оно сопровождается изменением угла C-N-C, которое в малых циклах затруднено.

В настоящей работе мы решили продолжить изучение эффективности подходов, препятствующих образованию возбужденного состояния с высокой степенью перераспределения заряда производных борированного хромофора GFP. Для чего был существенно расширен ряд соответствующих веществ.

Необходимые производные были получены по следующей схеме:

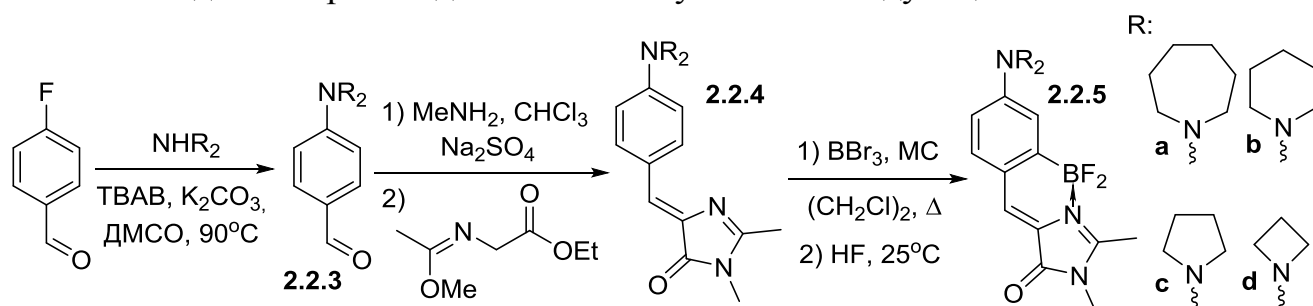


Схема 10. Синтез борированных аминопроизводных хромофора GFP.

Все борированные производные **2.2.5** были получены с хорошими выходами за исключением производного **2.2.5d**. Это производное было получено с выходом 10%, так как реакция сопровождалась побочным процессом – раскрытием азетидинового цикла.

³ Grimm J.B., English B.P., Choi H., Muthusamy A.K., Mehl B.P., Dong P., Brown T.A., Lippincott-Schwartz J., Liu Z., Lionnet T., Lavis L.D. Bright photoactivatable fluorophores for single-molecule imaging // *Nat. Methods*. 2016. Т. 13. № 12. С. 985–988.

⁴ Shen S., Yu J., Lu Y., Zhang S., Yi X., Gao B. Near-infrared probes based on fluorinated Si-rhodamine for live cell imaging // *RSC Adv*. 2017. Т. 7. № 18. С. 10922–10927.

Изучение оптических свойств показало, что соединения **2.2.5a-d** существенно не отличаются от полученных ранее алкилсодержащих аналогов **2.2.2a-c**:

Таблица 4. Оптические свойства соединений 2.2.5a-d и 2.2.2a-c в различных растворителях.

Соед.		H ₂ O	EtOH	CH ₃ CN	EtOAc	Диоксан
2.2.5a	Абс.	519	509	496	492	497
	Эм.	567(0.04)†	558(0.26)	553(0.34)	541(0.82)	538(0.76)
2.2.5b	Абс.	~505*	500	484	481	487
	Эм.	~560*(0.05)	564(0.17)	558(0.30)	546(0.78)	540(0.78)
2.2.5c	Абс.	516	508	493	491	496
	Эм.	562(0.33)	560(0.63)	552(0.65)	541(0.77)	537(0.76)
2.2.5d	Абс.	508	493	482	480	484
	Эм.	562(0.53)	556(0.76)	551(0.70)	542(0.80)	535(0.84)
2.2.2a-c	Абс.	510-520	495-510	485-500	485-495	490-500
	Эм.	560-565 (0.05)	555-560 (0.22-0.35)	550-555 (0.31-0.48)	535-545 (0.63-0.67)	530-540 (0.72-0.78)

* - низкая растворимость

† - здесь и далее в скобках приводится величина квантового выхода флуоресценции

Было установлено, что производные, содержащие большие циклические заместители (соединения **2.2.5a-b**), характеризуются заметным варьированием величины квантового выхода. В то время как присутствие четырех и пятичленного цикла (соединения **2.2.5c-d**) приводит к увеличению КВФ в полярных растворителях, однако некоторое варьирование сохранилось.

Интересные результаты были получены при изучении оптических свойств производного **2.2.5e** (Схема 11). Оказалось, что это соединение характеризуется более стабильным квантовым выходом как в сравнении с веществами **2.2.5c-d**, содержащими небольшие циклические заместители, так и с ранее полученными **2.2.2d-e** с фиксированными заместителями (Рисунок 3).

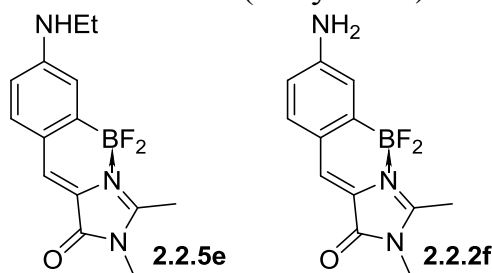


Схема 11. Аминопроизводные борированного хромофора GFP.

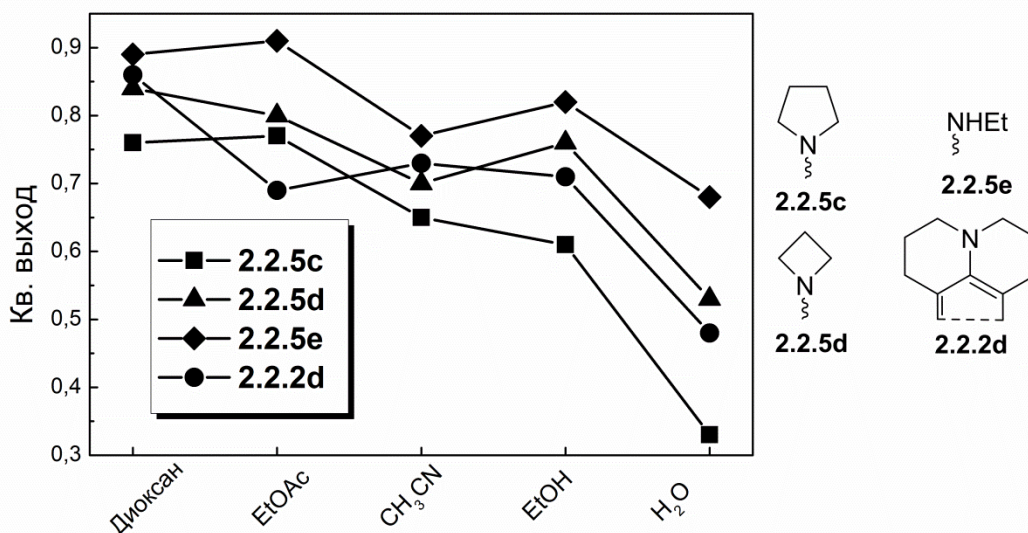


Рисунок 3. Варьирование величины квантового выхода соединений 2.2.5c-e и 2.2.2d.

Подобными свойствами также характеризуется борированный аналог хромофора GFP, содержащий незамещенную аминогруппу (соединение **2.2.2f**, Схема 11): квантовый выход в различных растворителях составляет 60-80 %. Очевидно, что в случае аминопроизводных конформационно зафиксированного хромофора GFP важную роль в процессе формирования ICT-состояния играет электронный эффект заместителей на атоме азота. Так, присутствие атома водорода, обладающего более слабым электронно-донорным эффектом в сравнении с алкильными заместителями, приводит к дестабилизации положительного заряда и увеличению квантового выхода флуоресценции основного возбужденного состояния.

Электронный эффект заместителей на атоме азота также сказывается на положении спектральных максимумов. Введение заместителей, обладающих электронно-донорным эффектом, приводит к смещению максимумов абсорбции и эмиссии в длинноволновую область спектра. Так, производное **2.2.5e** (R = NHEt) характеризуется батохромным сдвигом спектральных максимумов на ~25 нм в спектрах абсорбции и на ~15 нм в спектрах эмиссии в сравнении с соединением, содержащим незамещенную аминогруппу (R = NH₂).

Исследование кислотно-основных свойств всего ряда соединений **2.2.5** показало, что протонированная форма всех этих аминных производных характеризуется максимумом абсорбции около 360 нм. Такое поведение, вероятно, вызвано тем, что при образовании катионной формы заместители на атоме азота выходят из единой сопряженной системы и не могут влиять на оптические свойства соединений. Этот результат был получен ранее и для веществ **2.2.2**, однако стоит отметить, что все новые соединения характеризовались более низким значением pK_a в диапазоне 1.5-2.5.

Таким образом, на основе полученных данных можно сделать вывод, что на формирование нефлуоресцентной формы возбужденного состояния, и как следствие на стабильность квантового выхода аминопроизводных зафиксированного хромофора GFP наибольшее влияние оказывает электронный эффект заместителей на атоме азота.

2.2 Нафталиновые аналоги

Достаточно популярной модификацией флуоресцентных красителей является создание веществ, содержащих полиароматические группы. Такая модификация приводит к заметному батохромному смещению спектральных максимумов и увеличению стоксового сдвига (разница между максимумом абсорбции и максимумом эмиссии). Причем этот эффект значительно усиливается при увеличении расстояния между заместителями в полиароматическом фрагменте.

Наиболее оптимальным местом для подобной модификации хромофора GFP является его бензилиденный фрагмент. Нами был предложен следующий путь синтеза:

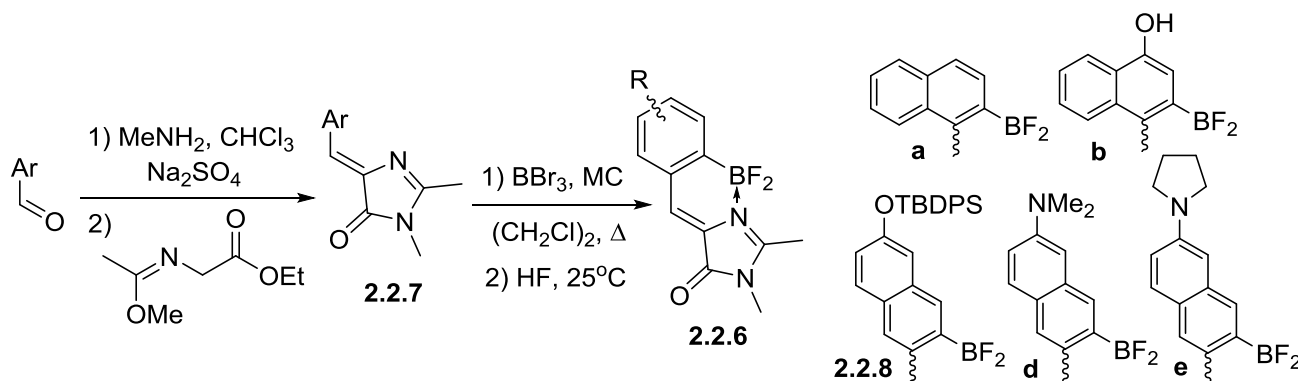


Схема 12. Получение нафталинсодержащих производных.

При получении одного из гидроксипроизводных потребовалось ввести защитную *трет*-бутилдифенилсилильную группу (соединение 2.2.8), так как иначе на стадии введения дифторборильной группы происходило бромирование нафтольной группы и образование побочных продуктов. Снятие защитной группы и получение финального гидроксинафталинового аналога 2.2.6с осуществлялось *тетра*-бутиламмоний фторидом при комнатной температуре:

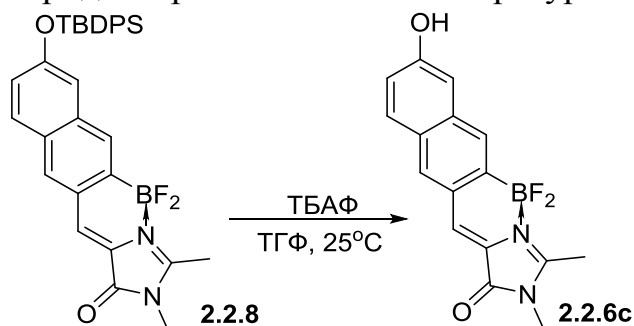


Схема 13. Схема получения производного 2.2.6с.

Изучение спектральных характеристик нафталиновых производных показало, что даже самый простой представитель полученного ряда, не содержащий заместителей в нафталиновой группе (соединение 2.2.6а), имеет небольшой батохромный сдвиг спектральных максимумов в сравнении с нейтральной формой оригинального борированного хромофора GFP 2.2.1. Производные же, содержащие гидроксильные группы (2.2.6б,с), как и ожидалось, характеризуются более выраженным смещением в длинноволновую область спектра. А введение более сильных донорных заместителей (соединения 2.2.6д,е) смещает максимумы абсорбции в область 470-510 нм и максимумы эмиссии – 600-670 нм:

Таблица 5. Оптические свойства соединений 2.2.6a-e в различных растворителях.

Соед.		H ₂ O	EtOH	CH ₃ CN	EtOAc	Диоксан
2.2.6a	Абс.	427	436	425	428	435
	Эм.	532	510	497	484	483
	Стоксов сдвиг	105	74	72	56	48
2.2.6b	Абс.	465	479	458	467	474
	Эм.	554	543	532	525	523
	Стоксов сдвиг	89	64	74	58	49
2.2.6c	Абс.	424	430	422	429	433
	Эм.	564	550	524	511	504
	Стоксов сдвиг	140	120	102	82	71
2.2.6d	Абс.	476	498	487	486	492
	Эм.	670	650	641	607	595
	Стоксов сдвиг	194	152	154	121	103
2.2.6e	Абс.	511	510	498	498	508
	Эм.	674	653	646	617	602
	Стоксов сдвиг	163	143	148	119	94
2.2.1	Абс.	404	416	402	410	414
	Эм.	485	483	469	465	464

Как и предполагалось, заметное влияние на оптические свойства оказывает взаимное расположение заместителей в нафталиновой группе. Так, удаление имидазолоновой группы и донорного заместителя друг от друга приводит не только к батохромному сдвигу спектральных максимумов, но и к росту стоксового сдвига. Особенно заметно это для производных, содержащих аминогруппы. Так, соединения **2.2.6d,e** имеют стоксов сдвиг 100-200 нм (Таблица 5).

Также было установлено, что почти все полученные соединения характеризуются высокими показателями квантового выхода флуоресценции практически во всех растворителях. Так, для незамещенного нафталинового производного **2.2.6a** и для гидроксипроизводных **2.2.6b,c** КВФ составляет 60-95% и лишь в некоторых случаях снижается до 30%. Тем не менее, аминафталиновые производные **2.2.6d,e** характеризуются заметным варьированием этой величины в зависимости от используемого растворителя. Например, в диоксане или этилацетате КВФ составляет 30-40%, а воде – около 5%. Вероятно, что для этих соединений, как и для аминопроизводных зафиксированного хромофора GFP возможно образование дополнительной формы возбужденного состояния с высокой степенью перераспределения заряда в молекуле.

Исследование кислотно-основных свойств гидроксипроизводных **2.2.6b,c** показало, что при подщелачивании их водных растворов происходит заметное смещение максимумов абсорбции в длинноволновую область спектра на 60 – 90 нм, что хорошо коррелирует с данными, полученными для зафиксированных аналогов хромофоров GFP и Kaede, и объясняется депротонированием фенольной группы (Рисунок 4). Для аминафталиновых производных **2.2.6d,e** при переходе к протонированной форме наблюдалось заметное гипсохромное смещение

максимумов абсорбции и нивелирование влияния аминозаместителя (Рисунок 4). Аналогичное поведение характерно для всех аминопроизводных борированного хромофора GFP.

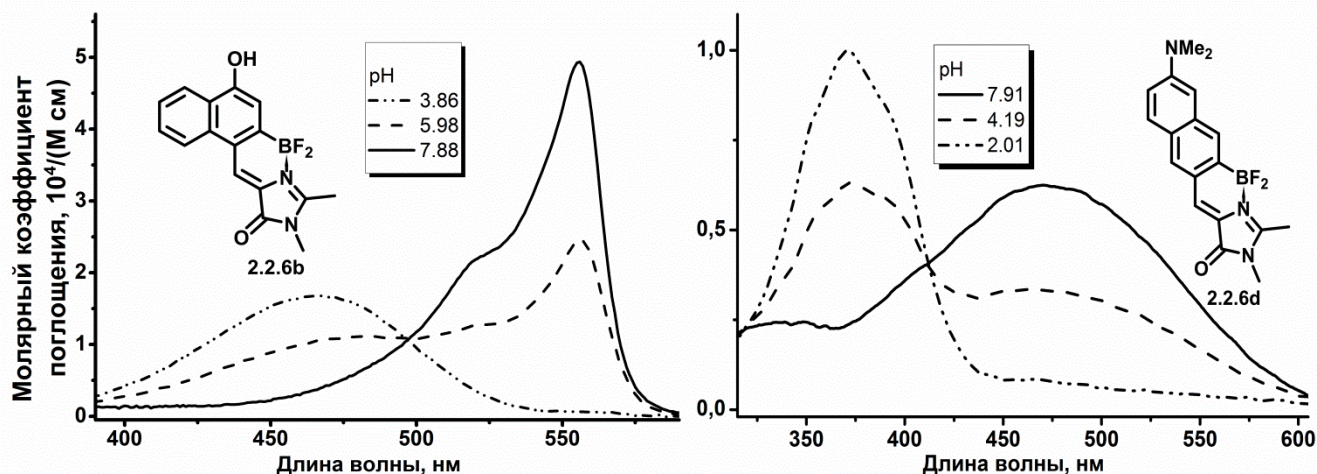


Рисунок 4. Спектры абсорбции соединений 2.2.6b,d в воде при различном значении pH.

2.3 Арилацетиленовые аналоги

Другим примером модификации, существенно изменяющей оптические свойства красителей, является введение в молекулу различных арилацетиленовых заместителей. Для исследования влияния подобного превращения на борированный хромофор GFP мы синтезировали два аналога, содержащих арилацетиленовый заместитель в пара-положении бензилиденового фрагмента:

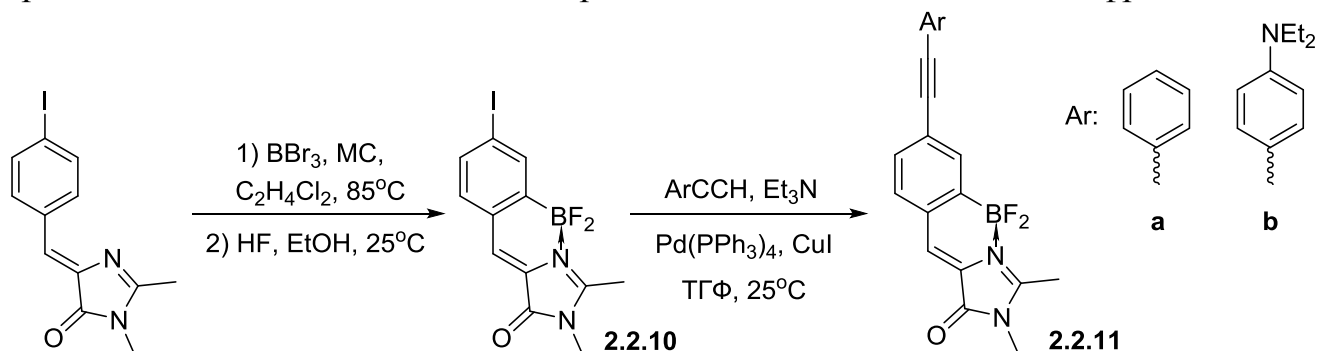


Схема 14. Получение арилацетиленовых аналогов борированного хромофора GFP.

Производные 2.2.11 были получены с помощью реакции Соногаширы в присутствии тетраakis(трифенилфосфин)палладия и иодида меди. Стоит отметить, что, несмотря на наличие дифторборильной группы, реакция проходила без каких-либо побочных процессов.

Как и ожидалось, введение арилацетилена в бензилиденовый фрагмент действительно приводит к заметным изменениям оптических свойств:

Таблица 6. Оптические свойства соединений 2.2.11 в различных растворителях.

Соединение		CH ₃ OH	CH ₃ CN	Диоксан
2.2.11a	Абс.	409	405	406
	Эм.	496 (0.25)	483 (0.72)	464 (0.79)
2.2.11b	Абс.	463	459	476
	Эм.	600 (0.001)	550 (0.01)	632 (0.24)

Так, в сравнении с соединением **2.2.10** фенилацетиленовый аналог **2.2.11a** характеризуется батохромным смещением максимумов абсорбции (10-20 нм) и эмиссии (30-40 нм). Аминопроизводное **2.2.11b** отличается еще более выраженным батохромным сдвигом:

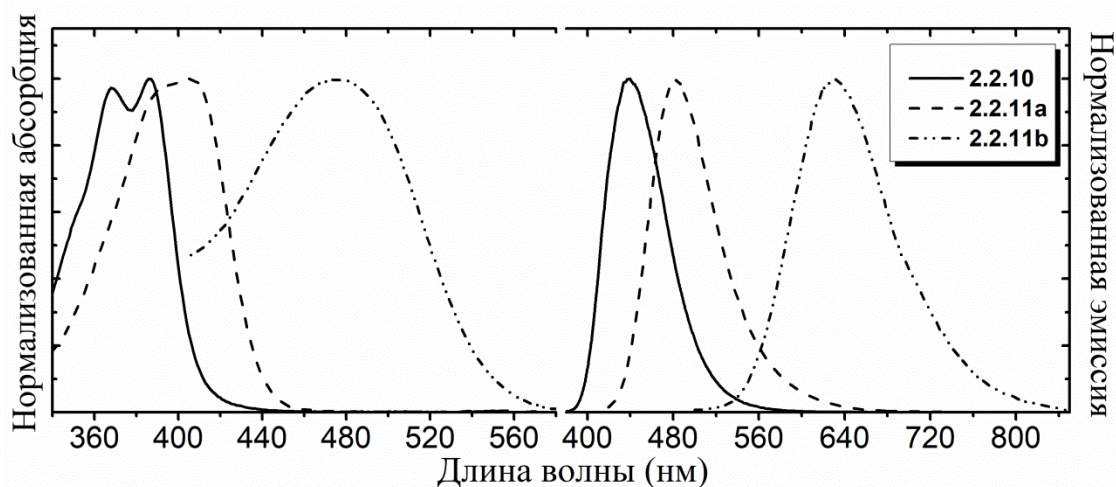


Рисунок 5. Спектры абсорбции и эмиссии соединений **2.2.10** и **2.1.11** в диоксане.

Таким образом, можно заключить, что арилацетиленовые аналоги борированного хромофора GFP являются весьма перспективными флуоресцентными красителями, а реакция Соногаширы – удобным методом создания подобных соединений.

3. Функционализированные синтетические аналоги хромофора GFP

Отдельной синтетической задачей в создании флуоресцентных красителей является введение в молекулу какой-либо функциональной (линкерной) группы, обеспечивающей специфическое взаимодействие красителя с целевым объектом. Как правило, введение подобных групп осуществляется на самых ранних этапах синтеза и накладывает определенные ограничения на все последующие стадии. В настоящей работе на примере некоторых аминопроизводных борированного хромофора GFP и представителей других классов флуоресцентных красителей мы продемонстрировали удобные методы функционализации, которые могут быть использованы на последних этапах синтеза.

3.1 Введение функциональных групп пригодных для конъюгации с другими молекулами

Разработанный нами подход основан на использовании реакции [2+3] циклоприсоединения азидов к терминальным енаминам с образованием 1,2,3-триазолов. В литературе приведено крайне мало примеров подобных взаимодействий, хотя родственная реакция циклоприсоединения ацетиленов к азидам приобрела большую популярность в органическом синтезе. Использование терминальных енаминов было продемонстрировано лишь на примере производных нитрометана, ацетонитрила, нитротолуолов и некоторых гетероциклических соединений.

Изучение этого превращения мы начали с синтеза модельных соединений **2.3.2**. В качестве исходных соединений были выбраны аминопроизводные борированного хромофора GFP, содержащие простые алкильные заместители на

атоме азота. Из них с помощью реакции присоединения ацеталей формамидов к активированной метильной группе были получены терминальные енаминные производные **2.3.1**, из которых при последующем взаимодействии с азидами были синтезированы функционализированные производные **2.3.2**:

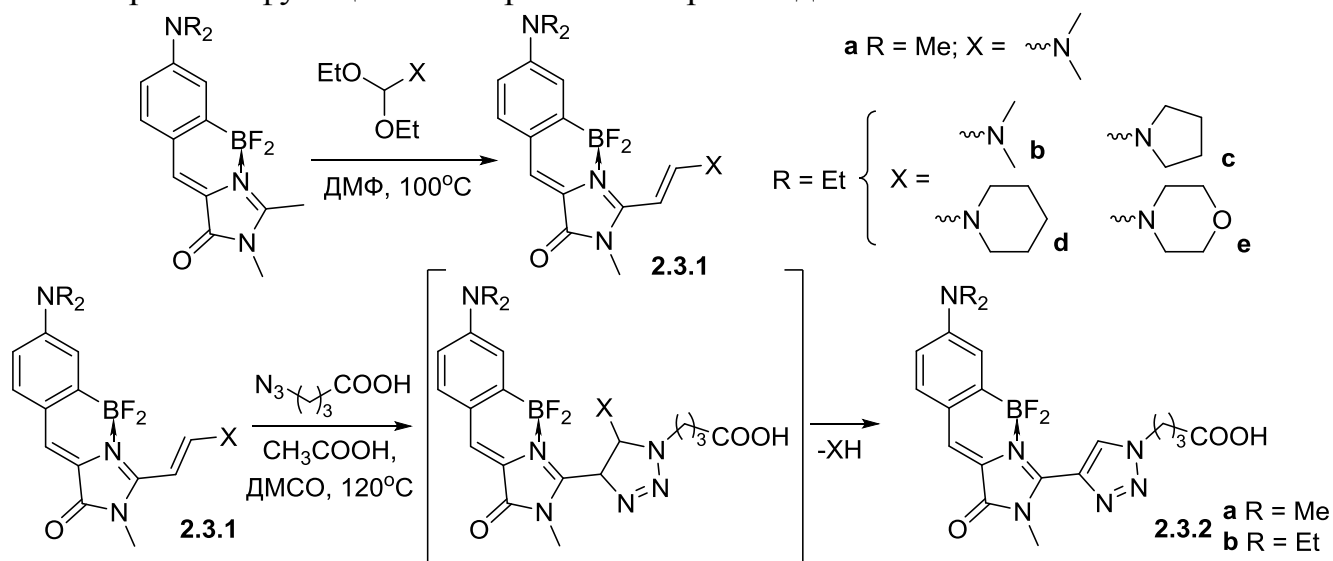


Схема 15. Схема получения функционализированных производных **2.3.2**.

Варьирование растворителей на стадии циклоприсоединения показало, что наиболее эффективно реакция проходит в среде диметилсульфоксида и диметилформамида, а при использовании таких растворителей, как диоксан и нитробензол происходит большое количество побочных процессов.

Скорость этого превращения потенциально могла бы зависеть от электронного характера аминозаместителя енаминной компоненты. Чтобы изучить влияние этой группы на прохождение реакции, мы создали ряд енаминов **2.3.1**, содержащих как простые аминоалкильные заместители, так и циклические амины, где в качестве исходного флуоресцентного красителя было использовано соединение **2.2.2b**.

Однако исследование реакционной способности полученных соединений показало, что время реакции в ряду синтезированных производных **2.3.1** изменяется незначительно. Так, реакция с енамином, содержащим морфолин (соединение **2.3.1e**), проходила за 12 часов, а в случае диметиламинного заместителя (соединение **2.3.1b**) время реакции составило 16 часов.

В результате нами было получено два функционализированных аналога аминопроизводных борированного хромофора GFP, содержащих карбоксильные группы (соединения **2.3.2**, Схема 15). Такие линкеры можно использовать для связывания флуоресцентных меток с различными объектами, содержащими свободные amino-, а также тиольные и спиртовые группы. При этом использование алифатического линкера, не сопряженного с π -системой флуорофора, гарантирует отсутствие изменения оптических свойств при связывании.

При дальнейшем изучении этого метода функционализации мы установили, что его можно использовать для модификации не только синтетических аналогов хромофора GFP, но и для других флуоресцентных красителей (Схема 16). Для большинства молекул красителей характерно наличие электронодонорной и электроноакцепторной частей, введение метильной группы в последнюю,

обеспечивает успешное проведение реакции присоединения ацеталей форамидов и получение енаминных производных (соединения **2.3.3** и **2.3.5**). Последующее циклоприсоединение к азидам проходит так же эффективно. Кроме того было установлено, что при использовании ароматических азидов время реакции значительно сокращается (до 5 часов):

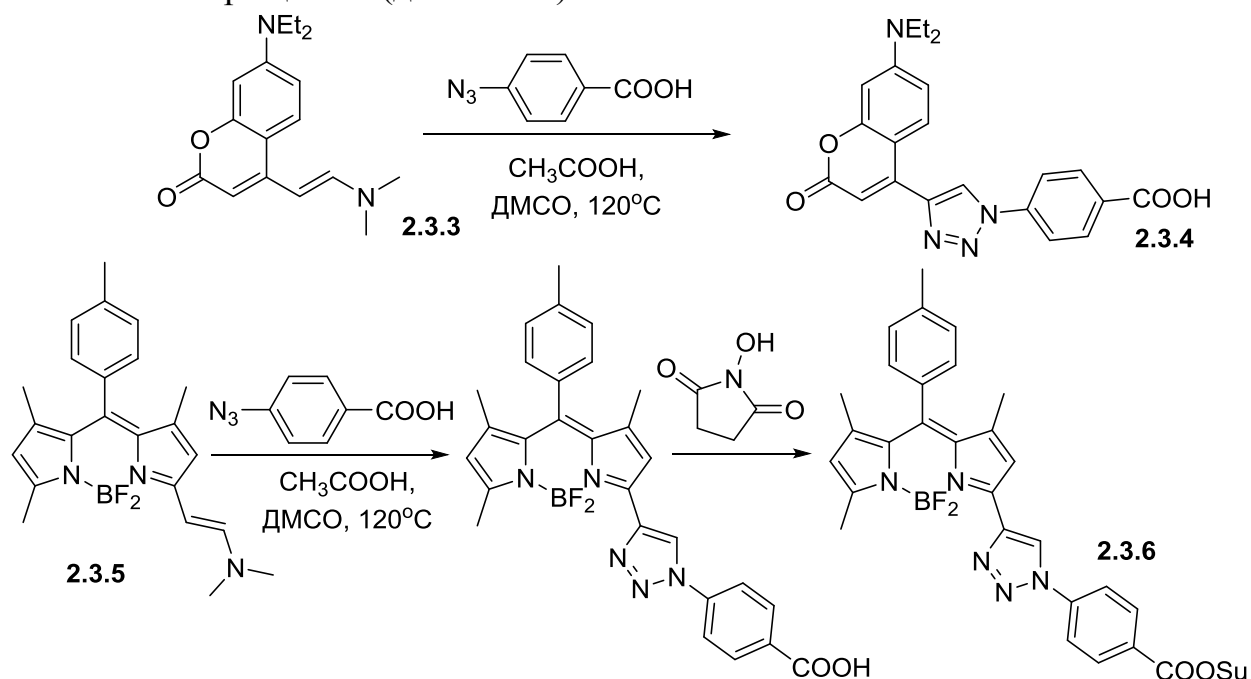


Схема 16. Функционализированные производные VODIPY и кумарина.

Введение в молекулу енаминных и триазольных заместителей привело к определенным изменениям оптических свойств. На примере соединений **2.3.1b-e** и **2.3.2b** мы установили, что они отличаются от своего предшественника **2.2.2b** заметным батохромным сдвигом максимумов абсорбции и эмиссии (Рисунок 6, Таблица 7):

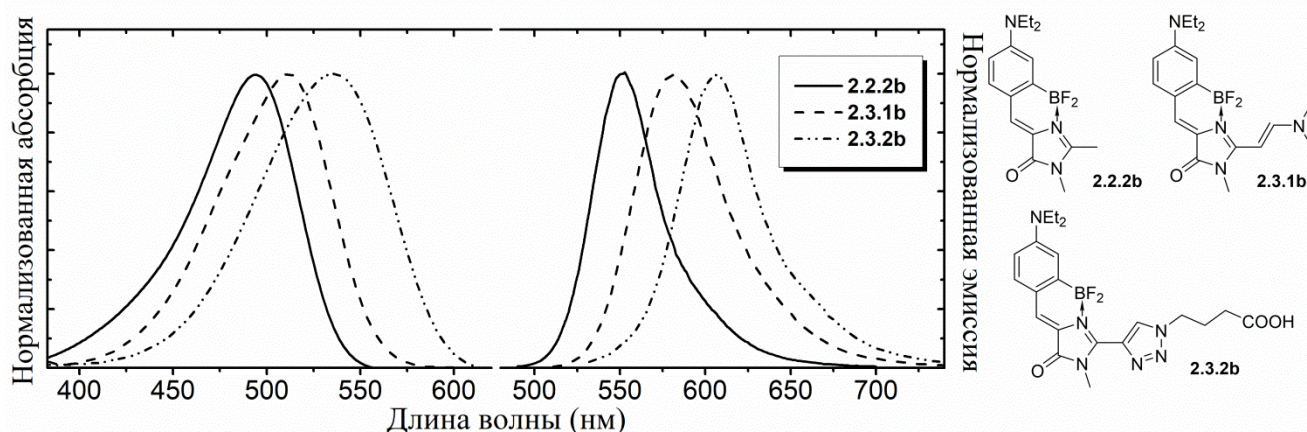


Рисунок 6. Спектры абсорбции и эмиссии соединений **2.2.2b**, **2.3.1.b** и **2.3.2b** в ацетонитриле.

Кроме того введение заместителей также влияло на величину квантового выхода флуоресценции (Таблица 7). Так, енаминные производные **2.3.1b-e** отличались незначительным варьированием квантового выхода в различных растворителях. В то время как для функционализированного аналога **2.3.2b** изменение этого показателя было сравнимо с данными, полученными ранее для исходного соединения **2.2.2b**.

Таблица 7. Оптические свойства соединений 2.2.2b, 2.3.1b-e и 2.3.2b в различных растворителях.

Соед.		H ₂ O	EtOH	CH ₃ CN	EtOAc	Диоксан
2.3.1b	Абс.	532	525	512	514	519
	Эм.	597(0.60)	591(0.67)	582(0.60)	570(0.63)	569(0.70)
2.3.1c	Абс.	534	528	514	517	523
	Эм.	599(0.50)	594(0.61)	581(0.58)	567(0.64)	568(0.70)
2.3.1d	Абс.	529	526	512	514	521
	Эм.	600(0.58)	591(0.89)	582(0.60)	572(0.82)	570(0.90)
2.3.1e	Абс.	539	529	517	518	524
	Эм.	607(0.13)	597(0.56)	591(0.51)	580(0.53)	576(0.53)
2.3.2b	Абс.	560	551	536	535	537
	Эм.	607(0.07)	601(0.38)	605(0.41)	592(0.58)	588(0.72)
2.2.2b	Абс.	520	505	494	492	497
	Эм.	563(0.03)	557(0.22)	554(0.31)	538(0.63)	538(0.72)

Изучение кислотно-основных свойств функционализированных производных в воде показало, что для них, как и для всех ранее синтезированных аминопроизводных хромофора GFP при подкислении происходит гипсохромное смещение максимума поглощения и нивелирование влияния аминозаместителя при рН в области ~1.0 – 3.0:

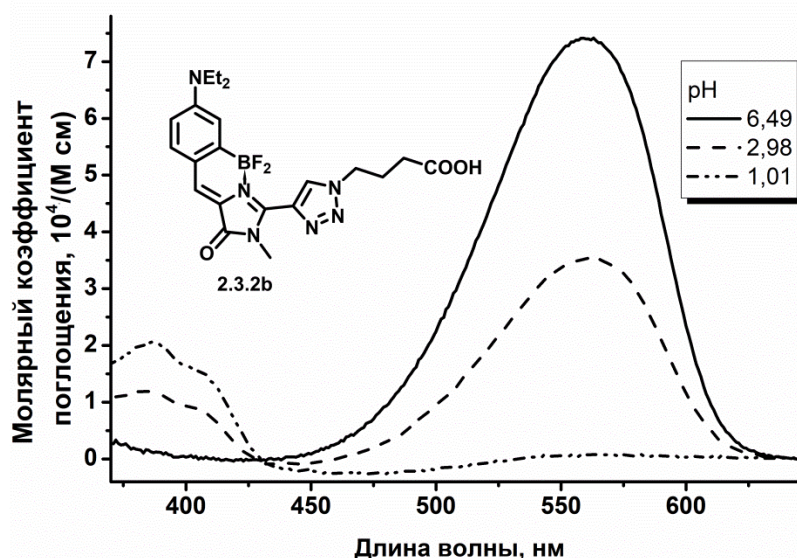


Рисунок 7. Спектры абсорбции соединения 2.3.2b в воде при различном значении рН.

3.2 Введение сенсорных групп

Одним из важных направлений использования флуоресцентных красителей является создание сенсоров – соединений, содержащих специальный фрагмент, чувствительный к определяемому веществу (аналиту). При взаимодействии таких соединений с аналитом могут происходить как обратимые изменения, так и необратимые.

Различные карбаматы являются довольно распространенным типом необратимых сенсоров, они используются для обнаружения тиолов и перекиси водорода. Поскольку полученные нами конформационно зафиксированные производные не вступают в реакции с подобными аналитами (по крайней мере,

при концентрациях ниже 0.1М при комнатной температуре), в настоящей работе на основе некоторых ранее синтезированных аминопроизводных борированного хромофора GFP (соединения **2.2.2f** и **2.3.7**) были созданы модельные карбаматные производные:

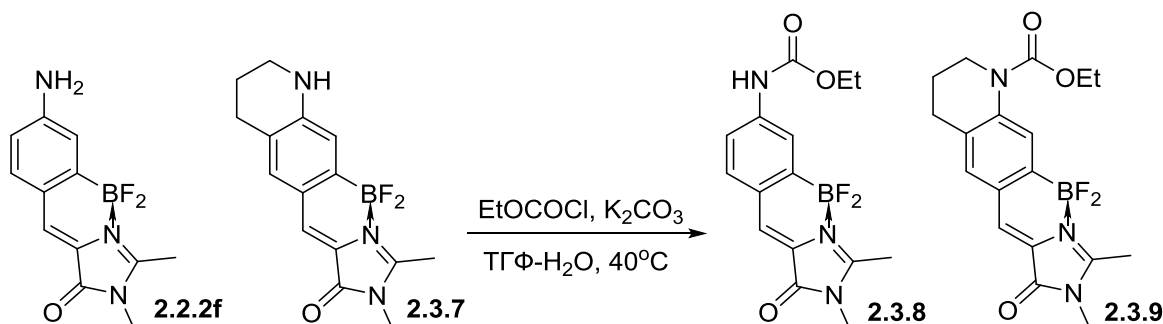


Схема 17. Схема синтеза карбаматных производных.

Сравнение оптических свойств полученных производных со свойствами предшественников показало, что при введении карбаматной группы такие характеристики, как квантовый выход флуоресценции и коэффициент молярного поглощения изменяются лишь незначительно. Однако наблюдается заметное гипсохромное смещение максимумов:

Таблица 8. Оптические свойства соединений **2.2.2f** и **2.3.7-2.3.9** в воде.

Соед.	Абс.	Эм.	КВФ
2.2.2f	461	531	0.70
2.3.7	514	558	0.63
2.3.8	405	499	0.82
2.3.9	411	522	0.57

Так, при переходе к карбаматной форме аминопроизводного **2.2.2f** в спектрах абсорбции и эмиссии наблюдается гипсохромный сдвиг на 30-50 нм, а для аналога **2.3.7** смещение в более коротковолновую область достигает 100 нм в спектрах абсорбции. Столь существенные изменения при переходе к свободной аминной форме сенсоров позволяют следить за присутствием той или иной формы с помощью различных возбуждающих лазеров и в разных каналах.

Таким образом, использование аминопроизводных борированного хромофора GFP в качестве основы для создания различных карбаматных флуоресцентных сенсоров является весьма перспективным и является одной из задач для нашей дальнейшей работы.

Другим типом сенсоров являются обратимые сенсоры. Для таких соединений характерен неоднократный переход от одной формы к другой и изменение окраски при взаимодействии с каким-либо компонентом в системе. Среди них есть широко используемые, такие как мурексид (металлоиндикаторы) и дифениламин (окислительно-восстановительный индикатор). А такие известные как лакмус и фенолфталеин (кислотно-основные индикаторы) давно используются в обучающей практике.

Для большинства синтетических аналогов хромофора GFP благодаря наличию гидрокси- и аминогрупп характерно изменение оптических свойств при изменении pH. Однако переход от одной формы к другой, как правило, не сопровождается ярко выраженным изменением величины квантового выхода

флуоресценции. Мы решили усилить зависимость оптических свойств путем введения дополнительной гидроксигруппы в первое положение имидазолонана.

Синтез N-гидроксипроизводных борированного хромофора GFP проводился по следующей схеме:

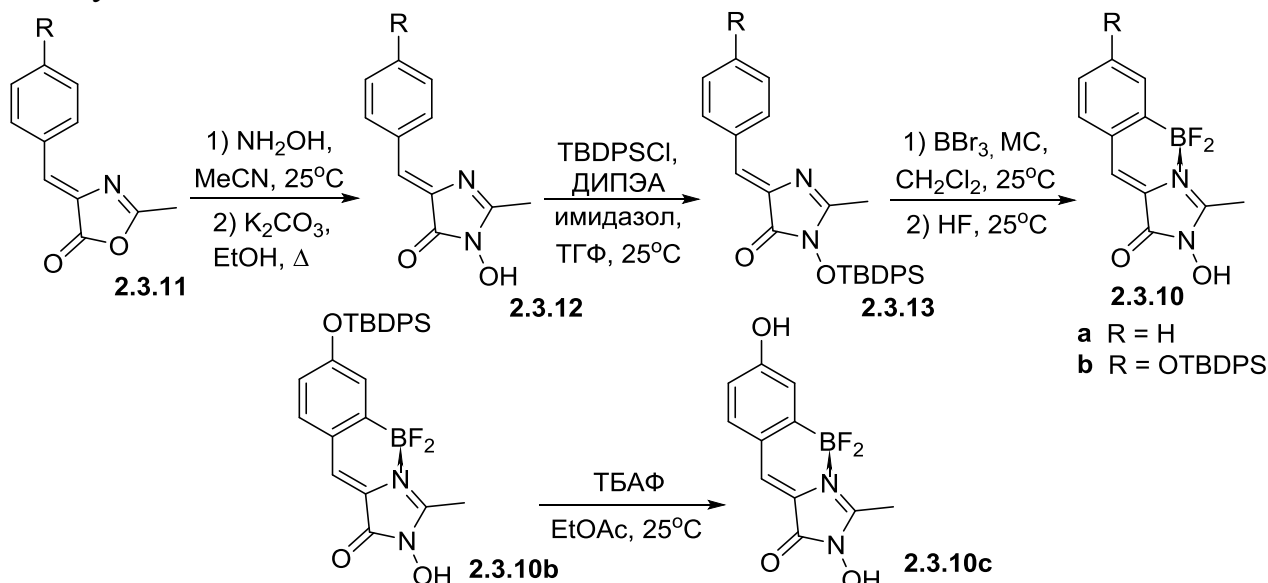


Схема 18. Синтез N-гидроксипроизводных борированного хромофора GFP 2.3.10.

Исследование оптических свойств полученных соединений показало, что все они характеризуются поглощением в области 350-430 нм и испусканием в области 400-500 нм. Величина квантового выхода существенно зависит от используемого растворителя, и при переходе к полярным растворителям этот показатель значительно уменьшается. Причем заметное варьирование квантового выхода также можно наблюдать в самом ряду производных 2.3.10:

Таблица 9. Оптические свойства соединений 2.3.10 в различных растворителях.

Соед.		H ₂ O	MeOH	CH ₃ CN	Гексан	Диоксан
2.3.10a	Абс.	-*	371	365	370	368
	Эм.	-*	447(0.02)	428(0.01)	395(0.03)	406(0.03)
2.3.10b	Абс.	-*	407	403	421	414
	Эм.	-*	457(0.04)	461(0.43)	460(0.52)	457(0.28)
2.3.10c	Абс.	412	417	407	-*	418
	Эм.	485(0.12)	479(0.20)	466(0.64)	-*	462(0.68)

Наличие N-гидроксильной группы в молекуле производных 2.3.10 предполагает возможность перехода этих соединений в депротонированную форму, а в случае соединения 2.3.10c вероятно образование дианиона:

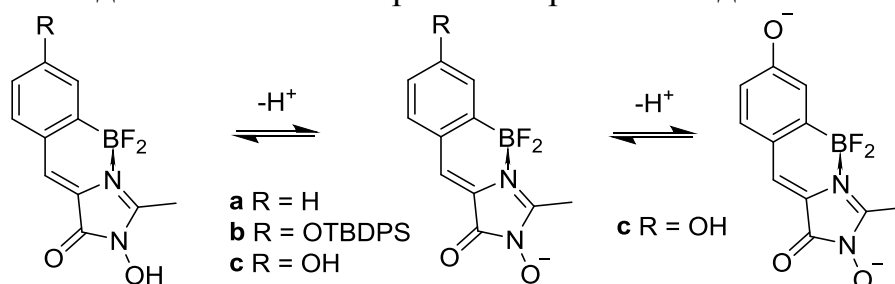


Схема 19. Депротонирование производных 2.3.10.

Изучение спектров абсорбции в фосфатном буфере при разном значении рН показало, что для всего ряда соединений при рН 4-5 наблюдается небольшой гипсохромный сдвиг и изменение формы сигнала, что очевидно связано с депротонированием N-гидроксильной группы и образованием аниона:

Таблица 10. Кислотно-основные свойства соединений 2.3.10 в фосфатном буфере.

Соед.	Абс. Нейтр.	Абс. Анион.	pKa
2.3.10a	373	356	5.4
2.3.10b	409	397	5.2
2.3.10c	412	398; 486	8.9; 5.3

При значениях рН > 6 спектры соединений **2.3.10a,b** не изменялись, а в спектрах производного **2.3.10c** при рН 8-9 наблюдалось заметное батохромное смещение примерно на 80 нм, что вероятно объясняется образованием дианиона.

При дальнейшем изучении свойств N-гидроксипроизводных было установлено, что производные **2.3.10a,b** малорастворимы в полярных растворителях и имеют крайне низкий квантовый выход флуоресценции, как в воде, так и в фосфатном буфере.

Весьма неожиданные результаты были получены для фенольного аналога **2.3.10c**. При исследовании его спектров эмиссии в фосфатном буфере при значении рН 0.5-4.5 наблюдалась интенсивная флуоресценция, а при рН > 5 происходил резкий спад флуоресцентного сигнала:

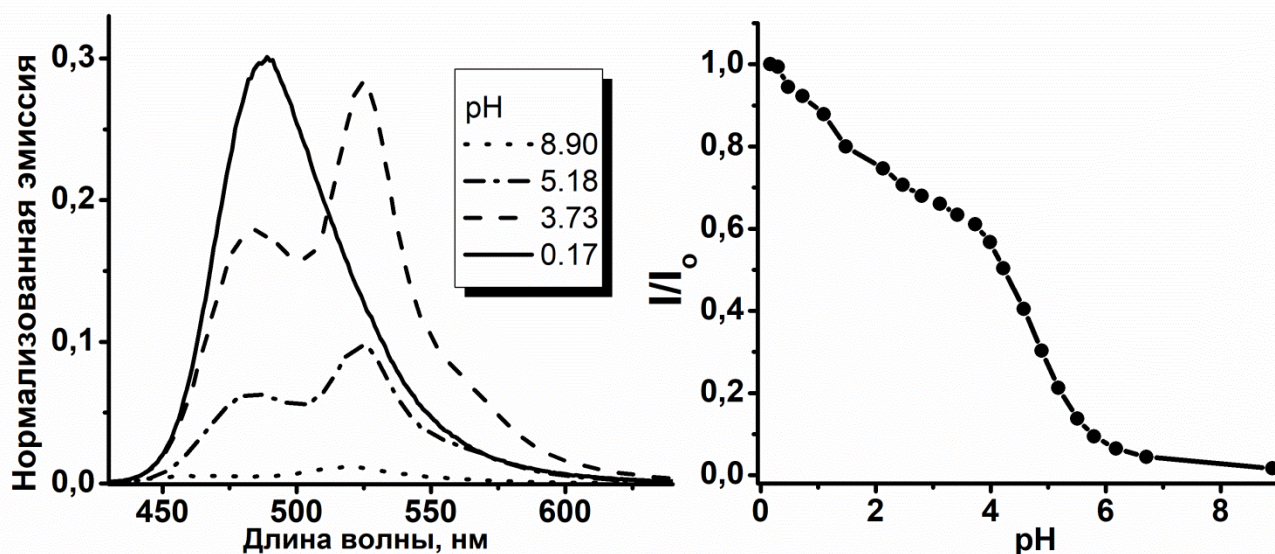


Рисунок 8. Спектры эмиссии соединения 2.3.10c в фосфатном буфере при различном значении рН.

Такое необычное поведение дигидроксипроизводного выгодно выделяет его среди других аналогов борированного хромофора GFP. Резкое изменение флуоресцентных свойств, происходящее при рН 4-6 (физиологический диапазон), позволит успешно использовать его в качестве рН-сенсора для широкого спектра задач и экспериментов в живых системах.

ВЫВОДЫ

1. Синтезированы флуоресцентные аналоги хромофоров белков Sirius и CFP. Показано ключевое влияние подвижности бензилиденового фрагмента на флуоресцентные свойства этих хромофоров.
2. Получены флуоресцентные аналоги хромофора белка Kaede. Синтезирован ряд производных с различными заместителями во втором и четвертом положениях имидазолонна. Показано, что подвижность заместителей в этих положениях существенно влияет на флуоресцентные свойства.
3. Синтезирован ряд аминных аналогов конформационно зафиксированного хромофора GFP, содержащих на атоме азота разные заместители. Предложены подходы, способствующие стабилизации квантового выхода флуоресценции.
4. Получен ряд производных хромофора GFP с увеличенной системой сопряженных связей. Установлено, что подобная модификация приводит к заметному батохромному смещению спектров поглощения и испускания.
5. На основе реакции [2+3] циклоприсоединения азидов к терминальным енаминам разработан удобный метод введения функциональных групп в молекулу флуоресцентных красителей.
6. Показана перспективность использования синтетических аналогов хромофора GFP в качестве основы для создания флуоресцентных сенсоров.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. **Baleeva N.S.**, Myannik K.A., Yampolsky I.V., Baranov M.S. Bioinspired Fluorescent Dyes Based on a Conformationally Locked Chromophore of the Fluorescent Protein Kaede // *Eur. J. Org. Chem.* 2015, Т. 2015. № 26. С. 5716-5721.
2. Golodukhina S.V., **Baleeva N.S.**, Mineyev K.S., Baranov M.S. Reversible condensation of 4-arylidene-1,2-dimethyl-1H-imidazol-5(4H)-ones with aromatic acyl chlorides // *Chem. Het. Comp.* 2015, Т. 51. № 10. С. 944-947.
3. **Baleeva N.S.**, Tsarkova A.S., Baranov M.S. Conformationally locked chromophores of CFP and Sirius protein // *Tetrahedron Lett.* 2016. Т. 57. № 27-28. С. 3043-3045.
4. **Балеева Н.С.**, Ямпольский И.В., Баранов М.С. Борированные производные хромофора зеленого флуоресцентного белка как потенциальные флуоресцентные сенсоры // *Биорг. Хим.* 2016. Т. 42. № 4. С. 501-504.
5. Seth O., Baranov M.S., **Baleeva N.S.**, Antonova M.M, Johnson K.A., Solntsev K.M. pH-Sensitive fluorophores from locked GFP chromophores by a non-alternant analogue of the photochemical meta effect // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2016. Т. 18. С. 26703-26711.
6. **Балеева Н.С.**, Баранов М.С. Реакция Соногаширы как новый метод модификации борированных производных хромофора зеленого флуоресцентного белка // *Биорг. Хим.* 2017. Т. 43. № 5. С. 581-584.
7. **Baleeva N.S.**, Zaitseva S.O., Gorbachev D.A., Zagudaylova M.B., Baranov M.S. The role of N-substituents in radiationless deactivation of aminated derivatives of locked GFP chromophore // *Eur. J. Org. Chem.* 2017. Т. 2017. № 35. С. 5219-5224.
8. **Baleeva N.S.**, Zaitseva S.O., Mineev K.S., Khavroshechkina A.V., Zagudaylova M.B., Baranov M.S. Enamine–azide [2+3]-cycloaddition as a method to introduce functional groups into fluorescent dyes // *Tetrahedron Lett.* 2019. Т. 60. № 5. С. 456-459.

Тезисы докладов на конференциях

1. **Балеева Н.С.** Флуоресцентные красители на основе хромофора зеленого флуоресцентного белка. // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2014» [Электронный ресурс] – М.: Макс Пресс. – 2014. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).
2. **Балеева Н.С.** Универсальный метод функционализации флуоресцентных красителей. // Материалы XXVIII Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». – М: ИБХ РАН - 2016, С. 94.
3. **Балеева Н.С.** Нафталиновые производные хромофора GFP как флуоресцентные красители. // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2016» [Электронный ресурс] – М.: Макс Пресс. – 2016. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).

Для заметок