

УДК 544.52

КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ СТИРИЛИЗОКСАЗОЛОВОГО  
КРАСИТЕЛЯ С АЛЬБУМИНОМ© 2024 г. И. Д. Бурцев<sup>1, \*</sup>, Д. А. Василенко<sup>2</sup>, Н. Е. Астахова<sup>2</sup>,  
Е. Б. Аверина<sup>2</sup>, А. В. Трофимов<sup>1, 3</sup>, В. А. Кузьмин<sup>1, 4</sup><sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия<sup>3</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),  
Долгопрудный, Россия<sup>4</sup>Национальный исследовательский университет “МИФИ”, Москва, Россия

\*Email: burtsevid@gmail.com

Поступила в редакцию 14.12.2023 г.

После доработки 17.01.2024 г.

Принята к публикации 18.01.2024 г.

DOI: 10.31857/S0023119324030082 EDN: UUATPW

## ВВЕДЕНИЕ

Производные изоксазола представляют собой соединения, обладающие перспективными фотохимическими характеристиками. Различные модификации молекул данного класса позволяют варьировать их свойства [1, 2]. Так, введение ароматических заместителей и нитрогруппы приводит к bathochromному смещению поглощения и флуоресценции, а также обуславливает повышение фотоактивности [3]. Включение в структуру молекул таких лигандов, как краун-эфир способствует образованию комплексов с ионами металлов и повышению флуоресценции [4]. Таким образом, данные соединения находят применение в качестве флуоресцентных меток и сенсоров на различные ионы металлов в клеточной среде [5, 6].

Альбумин является основным компонентом плазмы крови и способен осуществлять доставку лекарственных соединений, в частности фотовизуализаторов в клетки [7]. Определение констант связывания новых синтетических красителей с альбу-

мином позволяет охарактеризовать их возможный путь внутриклеточного транспорта [8].

Целью настоящей работы было получение спектрально-кинетических характеристик комплексов нитроизоксазола 16-({5-[(E)-2-нафто[2,1-b]фуран-2-илвинил]-4-нитроизоксазол-3-ил}карбонил)-1,4,7,10,13-пентаокса-16-азациклооктадекана, далее – флуорофор, с альбумином. Флуорофор был получен с использованием разработанного нами ранее метода, основанного на реакции конденсации 5-метил-4-нитроизоксазолов с ароматическими альдегидами [2]. Исходный краунсодержащий 5-метил-4-нитроизоксазол был синтезирован реакцией ацилирования 18-азакраун-6 хлорангидридом 4-нитро-5-метилизоксазол-3-карбоновой кислоты.

Флуорофор был охарактеризован методом ЯМР <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C спектроскопии, его состав подтвержден масс-спектром высокого разрешения (HRMS-ESI). <sup>1</sup>H NMR (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.55–3.75 (м, 20H, 10CH<sub>2</sub>), 3.80–3.94 (м, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 7.51–7.56 (м, 1H, CH), 7.57 (с, 1H, CH), 7.61–7.66 (м, 1H, CH), 7.68 (д, <sup>3</sup>J = 16.0 Гц, 1H, CH=), 7.65–7.70 (м, 1H, CH),



7.73 (д,  $^3J = 16.0$  Гц, 1H, CH=), 7.88–7.84 (м, 1H, CH), 7.92–7.97 (м, 1H, CH), 8.10–8.16 (м, 1H, CH).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  46.7 ( $\text{CH}_2$ ), 50.0 ( $\text{CH}_2$ ), 69.35 ( $\text{CH}_2$ ), 69.43 ( $\text{CH}_2$ ), 70.60 ( $2\text{CH}_2$ ), 70.62 ( $\text{CH}_2$ ), 70.70 ( $\text{CH}_2$ ), 70.74 ( $\text{CH}_2$ ), 70.8 ( $2\text{CH}_2$ ), 70.9 ( $\text{CH}_2$ ), 109.1 (CH), 112.3 (CH), 112.9 (CH), 123.5 (CH), 124.5 (C), 125.6 (CH), 126.6 ( $\text{CNO}_2$ ), 127.5 (CH), 127.6 (C), 129.2 (CH), 129.4 (CH), 129.7 (CH), 130.6 (C), 151.7 (C), 154.2 (C), 154.7 (C), 158.9 (C), 166.2 (C). HRMS-ESI ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ): Найдено: 618.2051. Вычислено для  $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{Na}^+$ : 618.2058.

В качестве модели для изучения фотохимических свойств красителя в биологических средах рассматривается его взаимодействие с бычьим сывороточным альбумином (БСА).

Измерение спектров поглощения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV3101PC (Япония) в кварцевых кюветках  $1 \times 1$  см. Флуоресценцию и кинетику гибели флуоресценции комплексов исследовали методом коррелированного по времени счета единичных фотонов (TCSPC) с помощью спектрофлуорометра FluoTime 300 (PicoQuant, Германия). Для регистрации флуоресценции использовался фотоумножитель HCP 14-3500 NEG (FuG Electronic GmbH, Германия). Возбуждение флуоресценции нитроизоксазола проводили светодиодом  $\lambda_{\text{возб}} = 430$  нм. Времена жизни флуоресценции рассчитывались по мультиэкспоненциальной модели в соответствии с уравнением [9]:

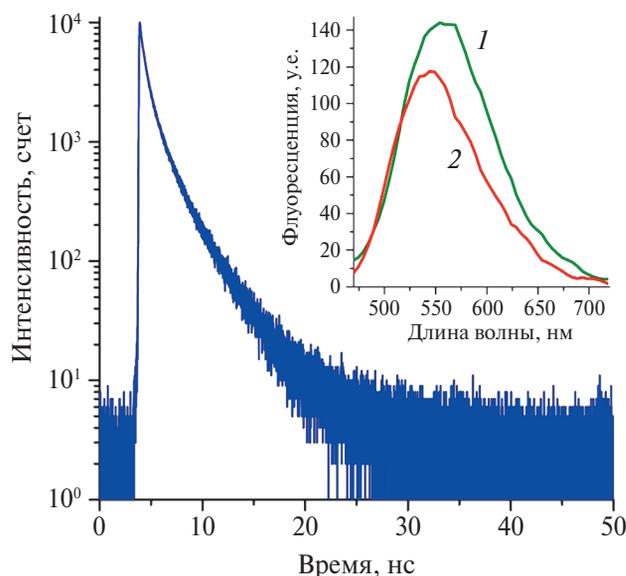
$$I = \sum A_i \exp(-t/\tau_i),$$

где  $A_i$  – амплитуда,  $\tau_i$  – время жизни  $i$ -й компоненты,  $n$  – количество компонент. Качество аппроксимации оценивали по критерию  $\chi^2$  (близкий к 1 для наилучшей аппроксимации).

Константа связывания красителя с бычьим сывороточным альбумином (БСА) определялась методами разгорания флуоресценции и изменения оптической плотности поглощения. Флуоресценция регистрировалась в растворе БСА в фосфатном буфере (рН 7.4) при возбуждении на 430 нм. Спектры поглощения регистрировались в области 350–600 нм, спектры флуоресценции регистрировались в диапазоне 450–830 нм. Полученные данные были обработаны в соответствии с уравнением:

$$P - P_0 = P_{\text{max}} \times [\text{БСА}] / (K_d + [\text{БСА}]),$$

где  $P_0$  – поглощение при 450 нм или интенсивность флуоресценции красителя ( $1 \times 10^{-6}$  М) при 550 нм (фотовозбуждение при 430 нм) в отсутствие БСА,  $P$  – поглощение или интенсивность флуоресценции в присутствии БСА ( $0 - 2 \times 10^{-4}$  М),  $P_{\text{max}}$  – погло-



**Рис.** Кинетика гибели флуоресценции комплекса при 550 нм (возбуждение 450 нм) флуорофора ( $1 \times 10^{-6}$  М) и БСА ( $1 \times 10^{-4}$  М) в фосфатном буфере. На врезке спектры флуоресценции двух комплексов краситель-БСА (1 и 2 соответственно), которым соответствуют времена жизни флуоресценции  $\tau_1 = 3.2$  нс и  $\tau_2 = 1.2$  нс.

щение или интенсивность флуоресценции пробы с максимальным количеством БСА,  $[\text{БСА}]$  – концентрация альбумина,  $K_d$  – константа диссоциации комплекса краситель-альбумин ( $K_b$  – константа связывания,  $K_b = 1/K_d$ ).

При добавлении БСА в раствор красителя в водной среде наблюдается последовательное увеличение интенсивности основной полосы поглощения красителя при 450 нм, а также уменьшение полосы поглощения при 380 нм, соответствующей поглощению димера красителя, образующегося в водной среде. Спектры флуоресценции, зарегистрированные для аналогичных проб, характеризуются значительным ростом интенсивности флуоресценции красителя при 550 нм.

Константы связывания, рассчитанные по спектрам поглощения и флуоресценции, близки по значению и составили  $K_b = (1.7 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , что свидетельствует о достаточно сильном взаимодействии флуорофора с молекулой альбумина. Увеличение флуоресценции при комплексообразовании указывает на повышение жесткости структуры молекулы красителя в комплексе с альбумином, что уменьшает вклад колебательной релаксации в механизм гибели синглетно-возбужденной молекулы флуорофора в комплексе. Кинетика гибели флуоресценции комплекса при 550 нм флуорофора ( $1 \times 10^{-6}$  М) и БСА ( $2 \times 10^{-4}$  М) в растворе характери-

зается двумя временами жизни  $\tau_1 = 3.2$  нс и  $\tau_2 = 1.2$  нс (рис. 1), что указывает на образование двух флуоресцирующих комплексов, образованных между флуорофором и двумя различными сайтами связывания в молекуле альбумина. Спектрально-кинетический расчет времяразрешенной флуоресцентной спектроскопии (TRES), выполненный в программе EasyTau 2 (PicoQuant), указывает на примерно равный вклад этих двух сайтов в комплексообразование флуорофора с альбумином.

Таким образом показано, что увеличение флуоресценции флуорофора обусловлено образованием двух комплексов с молекулой альбумина. Флуорофоры на основе исследованного стирилового красителя могут быть использованы для флуоресцентного анализа биомакромолекул.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Синтез флуорофора был выполнен при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 22-73-00058. Спектральные измерения выполнены на базе коллективного научного центра

ИБХФ РАН “Новые материалы и технологии” государственная программа РФ №122041400114-2.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sadchikova E., Safronov N., Beliaev N. et al. // Molecules. 2023. V. 28. № 7. P. 3192.*
2. *Sadovnikov K., Vasilenko D., Gracheva Yu. et al. // ChemistrySelect. 2023. V. 8. № 20. e202300830.*
3. *Chen M.-C., Chen D.-G., Chou P.-T. // ChemPlus-Chem. 2021. V. 86. № 1. P. 11.*
4. *Lebedeva A., Fedorova O., Tsvetkov V. et al. // Dyes and Pigments. 2018. V. 157 P. 80.*
5. *Moiola M., Bova A., Crespi S. et al. // Chemistry Open. 2019. V. 8. № 6. P. 770.*
6. *Sato K., Kawasaki A., Karuo Y. et al. // Beilstein J. Org. Chem. 2020. V. 16. P. 1411.*
7. *Larsen M., Kuhlmann M., Hvam M. et al. // Mol. Cell. Ther. 2016. V.4. P. 3.*
8. *Sedov I., Nikiforova A., Khaibrakhmanova D. // Biophysica. 2021. V. 1. № 3. P. 344.*
9. *Burtsev I., Dubinina T., Egorov A. et al. // Dyes and Pigments. 2022. V. 207. P. 110690.*

**COMPLEXATION OF STYRYL ISOXAZOLE DYE WITH ALBUMIN****I. D. Burtsev<sup>1</sup>, D. A. Vasilenko<sup>2</sup>, N. E. Astakhova<sup>2</sup>, E. B. Averina<sup>2</sup>,  
A. V. Trofimov<sup>1,3</sup>, V. A. Kuzmin<sup>1,4</sup>**<sup>1</sup>*N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS (IBCP RAS), Moscow, Russia*<sup>2</sup>*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*<sup>3</sup>*Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Russia*<sup>4</sup>*National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russia**\*Email: burtsevid@gmail.com*

## REFERENCES

1. *Sadchikova E., Safronov N., Beliaev N. et al. // Molecules. 2023. V. 28. № 7. P. 3192.*
2. *Sadovnikov K., Vasilenko D., Gracheva Yu. et al. // ChemistrySelect. 2023. V. 8. № 20. e202300830.*
3. *Chen M.-C., Chen D.-G., Chou P.-T. // ChemPlus-Chem. 2021. V. 86. № 1. P. 11.*
4. *Lebedeva A., Fedorova O., Tsvetkov V. et al. // Dyes and Pigments. 2018. V. 157 P. 80.*
5. *Moiola M., Bova A., Crespi S. et al. // Chemistry Open. 2019. V. 8. № 6. P. 770.*
6. *Sato K., Kawasaki A., Karuo Y. et al. // Beilstein J. Org. Chem. 2020. V. 16. P. 1411.*
7. *Larsen M., Kuhlmann M., Hvam M. et al. // Mol. Cell. Ther. 2016. V.4. P. 3.*
8. *Sedov I., Nikiforova A., Khaibrakhmanova D. // Biophysica. 2021. V. 1. № 3. P. 344.*
9. *Burtsev I., Dubinina T., Egorov A. et al. // Dyes and Pigments. 2022. V. 207. P. 110690.*