



УДК 577.112.342;577.112.4

СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ПРОДУКТОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПОЛИФТОРИРОВАННЫХ ПИРАЗОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ПИРИЛИЕВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ С БЫЧИМ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ И АМИНОКИСЛОТАМИ

© 2025 г. В. В. Шелковников*, **, #, Д. Д. Дорошенко*, И. Ю. Каргаполова*,
П. А. Козлаков**, Н. А. Шестаков**, Ю. С. Сотникова*

* Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН,
Россия, 630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 9

** Новосибирский государственный технический университет,
Россия, 630073 Новосибирск, просп. Карла Маркса, 20

Поступила в редакцию 18.09.2024 г.

После доработки 25.09.2024 г.

Принята к публикации 26.09.2024 г.

Синтезированы и охарактеризованы пирилоцианиновые красители, содержащие в донорной части пиразолиновый фрагмент и диалкиламино-заместители (пиперидино-, дибутиламино-, 4-гидроксипиперидино-) в полифторированном ароматическом кольце. Показана способность пирилиевых красителей реагировать с бычьим сывороточным альбумином (BSA) и аминокислотами, такими как Lys, Arg, Cys, Phe, с образованием пиридоцианинового люминофора. Исследованы спектрально-люминесцентные свойства образующихся люминофоров. Выделен продукт реакции тетрафторбората (*E*)-2,6-диметил-4-(4-{3-фенил-5-[2,3,5,6-тетрафтор-4-(пиперидин-1-ил)фенил]-4,5-дигидро-1*H*-пиразол-1-ил}-стирил)пирилия с Lys, его структура подтверждена методом ЯМР и данными элементного анализа. Определено вероятное место связывания синтезированных пирилиевых красителей с BSA – это ε-аминогруппа аминокислотного остатка Lys. Рассчитано, что количество связанного с BSA люминофора составляет две молекулы пирилиевого красителя на одну молекулу BSA. Синтезированные пирилиевые красители реагируют с BSA в смеси фосфатного буфера с метанолом (pH 7.4) на 3–4 порядка быстрее, чем известный юлолидиновый краситель Ру-1. Определены относительные скорости реакции тетрафторбората (*E*)-2,6-диметил-4-(4-{3-фенил-5-[2,3,5,6-тетрафтор-4-(4-гидроксипиперидин-1-ил)фенил]-4,5-дигидро-1*H*-пиразол-1-ил}стирил)пирилия с аминокислотами: Lys > Cys >> Phe ≥ Arg

Ключевые слова: полифторированные пирилоцианиновые/пиридоцианиновые красители, синтез, аминокислоты, BSA, спектрально-люминесцентные свойства, реакционная способность

DOI: 10.31857/S0132342325010053, **EDN:** LZSEUQ

ВВЕДЕНИЕ

Исследования активных реакционноспособных флуоресцентных красителей для получения меченых белков и аминокислот важны для об-

ластей биоинженерии и биомедицины, в частности для получения биоизображений с целью визуализации клеток, изучения структуры меченых белков биофизическими методами [1–4]. Из-

Сокращения: BSA – бычий сывороточный альбумин; PLC – пирилоцианиновый хромофор; PLC-NBu₂ – пирилоцианиновый хромофор с дибутиламиногруппой; PLC-Pip – пирилоцианиновый хромофор с пиперидиногруппой; PLC-Pip-OH – пирилоцианиновый хромофор с 4-гидроксипиперидиногруппой; PDC – пиридоцианиновый хромофор; PDC-NBu₂ – пиридоцианиновый хромофор с дибутиламиногруппой; PDC-Pip – пиридоцианиновый хромофор с пиперидиногруппой; PDC-Pip-OH – пиридоцианиновый хромофор с 4-гидроксипиперидиногруппой.

#Автор для связи (тел.: +7 (383) 330-89-96; эл. почта: vice@nioch.nsc.ru).

вестные классы красителей для этих целей – флуорофоры на основе 4,4-дифтор-4-бор-3а,4а-диаза-*s*-индацена (BODIPY-красители) [5–7], люминофоры с флуоресцеиновой, родаминовой, цианиновой структурой [8], люминофоры на основе пирена, пиранона, производных кумарина, тетразина и родамина [9–11].

Среди различных классов люминофоров можно выделить полиметиновые пирилиевые и тио-пирилиевые красители, используемые как люминесцентные метки для белков [12–16]. Пирилиевые красители способны взаимодействовать с аминоклассами белков с образованием люминесцентных продуктов, что позволяет использовать их в области протеомики. Ранее показано, что пирилиевые красители на основе соли 2,4,6-триметилпирилия взаимодействуют с соединениями, содержащими первичные аминоклассы, такими как *p*-толуидин, образуя пиридоцианины, обладающие яркой люминесценцией [17]. Юлолидиновый пирилиевый краситель Ру-1 при взаимодействии с сывороточным альбумином человека образует люминесцентный продукт с максимумом люминесценции при 602 нм [18]. В результате реакции пирилоцианинового красителя с первичной аминоклассой субстрата образуется пиридоцианиновый краситель (PDC) по ANRORC-механизму (Addition of Nucleophiles, Ring Opening and Ring Closure – раскрытие цикла при присоединении нуклеофильного агента с последующей рециклизацией) [19]. Благодаря интенсивной люминесценции PDC эту реакцию используют для выявления первичных аминов в различных прикладных целях [20, 21]. Получение люминесцентной метки биомолекулой при образовании пиридоцианинового люминофора по ANRORC-механизму имеет несколько преимуществ. Встраивание люминесцентного красителя в целевую биомолекулу, как правило, требует использования линкера с привлечением определенной синтетической процедуры [22]. В случае ANRORC-присоединения пирилиевого красителя по аминоклассе вводить линкер не обязательно, реакция протекает самопроизвольно, нет необходимости привлечения дополнительных химических реакций. При связывании выбранного люминофора, например, с белком, требуется выделение и отмывка биоконъюгата от несвязанного люминофора, избавление от фоновой люминесценции. Пирилоцианины практически не люминесцируют, появ-

ление люминесценции, характерной для пиридоцианинового красителя, однозначно свидетельствует об образовании ковалентной связи с белком. При этом отсутствует фоновая люминесценция несвязанного люминофора. При наличии в исследуемом растворе только белка, исключая взаимодействие с посторонними аминоклассами, белок можно определять *in situ* без отмывки.

В настоящее время в биомедицине большой интерес вызывают соединения, содержащие один или несколько атомов фтора. В частности, фторсодержащие гетероциклы широко используются в медицинской химии и включены в 20% фармацевтических препаратов [23–25].

Полифторароматические соединения используются для создания фторсодержащих люминофоров [26, 27], которые за счет липофильных свойств улучшают проникновение люминофора в клетку, и их применение перспективно для получения биоизображений и в клинических исследованиях. Другой аспект использования полифторароматических блоков (в частности, фторзамещенных производных бензола) – это изучение их диполь-дипольного π -стэкинг-взаимодействия с аминоклассой Phe в белках [28, 29]. Интересно отметить, что согласно работе [30] для пентафторбензола, связанного с гетероароматическим катионным центром, как и в нашем случае, потенциал Гиббса, характеризующий вероятность самопроизвольного протекания химической реакции, при π -стэкинг-взаимодействии с нефторированным аналогом возрастает в 15 раз, $\Delta G = -15$ ккал/моль против $\Delta G = -1$ ккал/моль.

Соединения, содержащие 2-пиразолиновый фрагмент [31, 32], и другие препараты, содержащие связь N–N [33], применяются в противоопухолевой терапии в силу способности ингибировать ферменты, катализирующие пролиферацию раковых клеток, и в терапии нейродегенеративных расстройств [34]. Синтез фторсодержащих пирилиево-пиразолиновых гибридов позволит объединить наличие атомов фтора и пиразолинового блока в структуре пирилиевого красителя как потенциального люминофора для белка.

В исследованиях [35, 36] разработаны методы синтеза предшественников полифторароматических пирилиевых красителей, содержащих пиразолиновые блоки. Реакцией полифторсодер-

жащих халконов с фенилгидразином получены 1,3,5-триарил-2-пиразолины, из которых формилированием по Вильсмайеру синтезированы соответствующие альдегиды (**I**), способные вступать в конденсацию с солями 1,3,5-триметилпирилия. Нуклеофильная подвижность *para*-атома фтора в перфторфенильном кольце исходных соединений позволяет в умеренных условиях проводить его замещение разнообразными нуклеофилами, расширяя базу соединений для последующей направленной модификации люминофоров. Реакции данных красителей с белками и аминокислотами не изучены. Представляло интерес исследовать взаимодействие пирилоцианиновых красителей (PLC), содержащих как полифторированный, так и пиразолиновый фрагмент, с бычьим сывороточным альбумином (BSA) и некоторыми аминокислотами, входящими в состав BSA. В качестве аминокислот были выбраны Lys и Arg как аминокислотные остатки, содержащие боковые аминогруппы, способные к ковалентному связыванию с красителем, Phe как ароматическая аминокислота и Cys как известная аминокислота, используемая для ковалентной связи с разнообразными метками через сульфогидрильную SH-группу [37, 38].

Целью данной работы был синтез гибридных пирилевых красителей, содержащих пиразолиновый фрагмент с полифторированным ароматическим кольцом, замещенным диалкил-аминогруппами (дибутиламино-, пиперидино-, 4-гидроксипиперидиногруппы), а также исследование спектрально-люминесцентных свойств продуктов их взаимодействия с BSA и некоторыми аминокислотами, входящими в состав белка: Cys, Phe, Lys и Arg.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структуры синтезированных пирилевых цианиновых красителей (PLC – пирилоцианины), содержащих диалкил(циклоалкил)аминозамещенный полифторированный фрагмент и пиразолиновый гетероцикл, приведены на рис. 1.

PLC (**IIa–IIc**) были получены с выходами 72–94% кипячением формильных производных полифторфенилсодержащих пиразолинов (**Ia–Ic**) с тетрафторборатом 2,4,6-триметилпирилия в MeOH (схема 1).

Вероятное место связывания PDC-BSA. При взаимодействии красителей PLC-Pip, PLC-Pip-OH и PLC-NBu₂ (**IIa–c**) с BSA происходит ковалентное связывание красителя с белком и образование PDC-люминофора. Реакция может про-

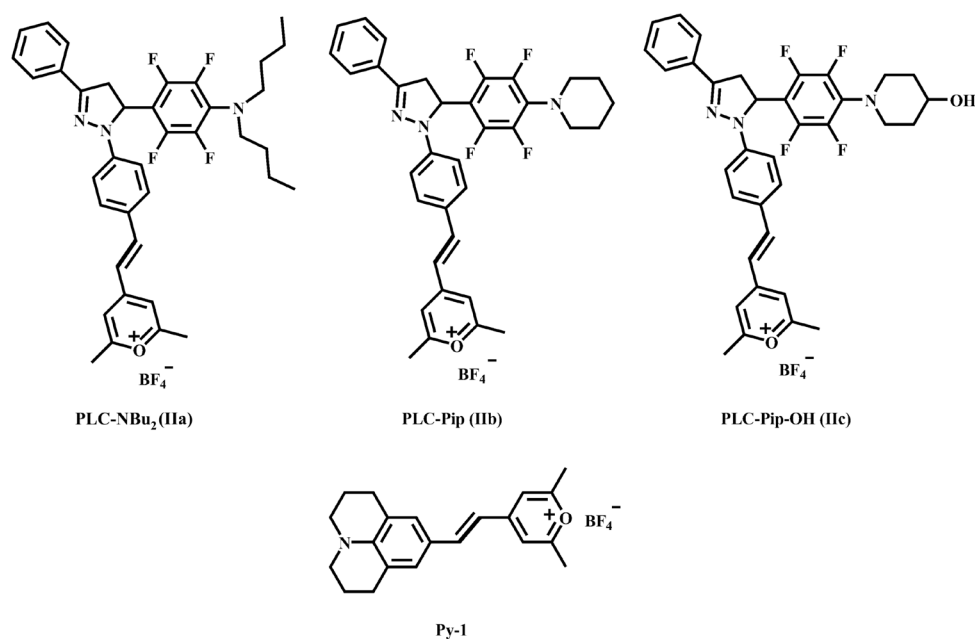


Рис. 1. Структуры фторсодержащих пирилево-пиразолиновых красителей и юлолидинового красителя Py-1.

текать по разным аминогруппам: по латеральной ϵ -аминогруппе аминокислоты Lys и/или Arg, находящейся в цепи белка, по α -аминогруппе *N*-концевой аминокислоты и по ϵ -аминогруппе *C*-концевой аминокислоты Lys [39]. При нейтральных значениях pH, что близко к нашим экспериментальным условиям (фосфатный буфер, pH 7.4), гуанидиновая группа Arg практически полностью находится в протонированной форме. Для гуанидиновой аминогруппы Arg $pK_a(\text{NH}_3) = 12.85$ выше, чем значение $pK_a(\text{NH}_3)$ боковой аминогруппы Lys, равное 10.53 [40], поэтому взаимодействие гуанидинового фрагмента аминогруппы Arg с катионом PLC менее вероятно.

При реакции PLC с BSA или аминокислотой в фосфатном буфере происходит обесцвечивание исходного красителя и образуется люминесцирующий продукт оранжевого цвета. На рис. 2 представлен электронный спектр поглощения хромофора PLC-Pip в EtOH ($\epsilon_{\text{макс}} = 598 \text{ нм}$, $\epsilon_{598} =$

$4.37 \times 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$) и продукта его взаимодействия с Lys в смеси фосфатный буфер/EtOH (10 : 1) с $\epsilon_{\text{макс}} = 458 \text{ нм}$. Электронные спектры поглощения красителей PLC-Pip-OH и PLC-NBu₂ аналогичны. Максимумы в спектрах электронного поглощения для PLC-Pip-OH и PLC-NBu₂ в EtOH также находятся при 583 нм, коэффициенты экстинкции $\epsilon_{598} = 4.14 \times 10^4$ и $\epsilon_{595} = 4.17 \times 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ соответственно. Спектральные характеристики возбуждения и люминесценции PDC-Pip для BSA и аминокислот Lys, Arg, Cys и Phe представлены на рис. 3.

В табл. 1 приведены значения максимумов в спектрах электронного поглощения и флуоресценции продуктов, образующихся при взаимодействии PLC с BSA и аминокислотами.

Из сопоставления длин волн максимумов флуоресценции пиридоцианиновых люминофоров, образованных красителями PLC-Pip, PLC-NBu₂ в реакции с аминокислотами и BSA, приведенных в

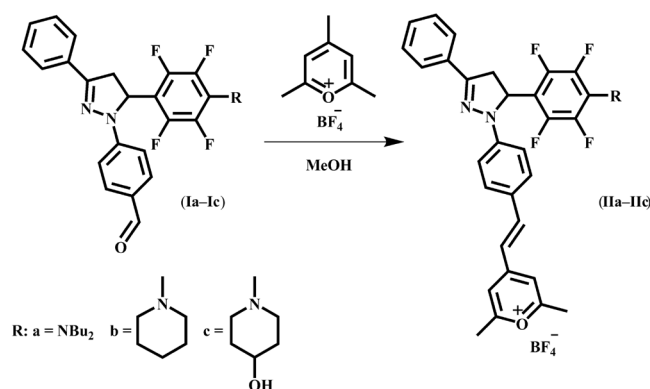


Схема 1. Реакции соединений (Ia–с) с тетрафторборатом 2,4,6-триметилпирилия в MeOH.

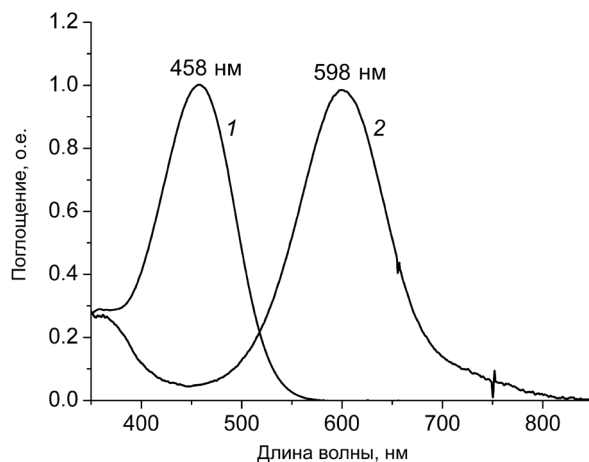


Рис. 2. Нормированные электронные спектры поглощения продукта PDC-Pip-Lys (1) в смеси фосфатный буфер/EtOH (10 : 1) и исходного красителя PLC-Pip в EtOH (2).

табл. 1, следует, что наиболее близкие значения с PDC-BSA проявляются для Lys. Люминесценция PDC-Pip с другими аминокислотами сдвинута в длинноволновую область с максимумом 600–620 нм. Аналогичное совпадение наблюдается для спектров возбуждения и поглощения PDC-BSA/аминокислота. На рис. 3 видно совпадение спектров люминесценции PDC-Pip-BSA и PDC-

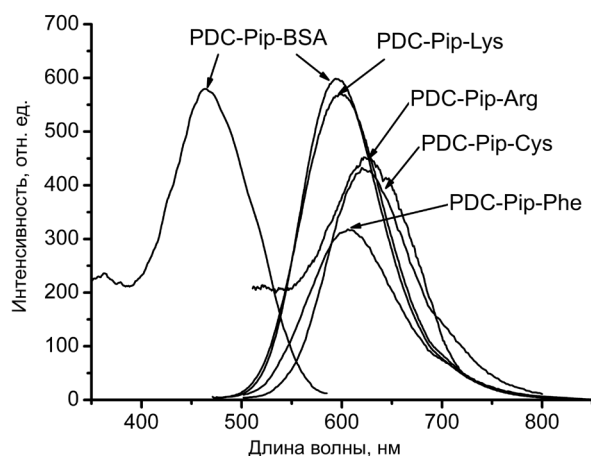


Рис. 3. Спектры возбуждения PDC-Pip-BSA (483 нм) и люминесценции PDC-Pip-BSA (596 нм), PDC-Pip-Lys (598 нм), PDC-Pip-Arg (620 нм), PDC-Pip-Cys (613 нм), PDC-Pip-Phe (606 нм) в смеси фосфатный буфер/EtOH (10 : 1).

Таблица 1. Спектральные характеристики продуктов PDC–биомолекула в смеси фосфатный буфер/EtOH (10 : 1)

Краситель–реагент	$\lambda_{\text{макс. погл.}}, \text{ нм}$	$\lambda_{\text{макс. фл.}}, \text{ нм}$
PDC-NBu ₂ -Lys	466	587
PDC-NBu ₂ -Arg	461	601
PDC-NBu ₂ -Cys	492	614
PDC-NBu ₂ -Phe	463	612
PDC-NBu ₂ -BSA	455	588
PDC-Pip-Lys	458	598
PDC-Pip-Cys	460	613
PDC-Pip-Arg	464	620
PDC-Pip-Phe	463	606
PDC-Pip-BSA	443	596
PDC-Pip-OH-Lys	472	606
PDC-Pip-OH-Cys	478	614
PDC-Pip-OH-Arg	485	606
PDC-Pip-OH-Phe	496	593
PDC-Pip-OH-BSA	463	592

Pip-Lys. Поэтому можно заключить, что наиболее вероятно реакция PLC-Pip с BSA протекает по ϵ -аминогруппе Lys. В случае с PLC-Pip-OH максимумы люминесценции продуктов PDC-Pip-OH-BSA (592 нм) и PDC-Pip-OH-Lys (606 нм) различаются. Возможно, наличие гидроксильной группы, способной к образованию водородных связей, способствует проявлению спектральных сдвигов люминесценции данного хромофора в зависимости от сольватного окружения.

Действительно, PDC-Pip-OH-Lys проявляет повышенную лабильность люминесцентных свойств к сольватационному окружению молекулы. Например, в фосфатно-буферном растворе максимум его люминесценции $\lambda_{\text{макс}} = 613 \text{ нм}$, при добавлении 20% MeOH $\lambda_{\text{макс}} = 618 \text{ нм}$, в EtOH $\lambda_{\text{макс}} = 624 \text{ нм}$, в MeOH $\lambda_{\text{макс}} = 628 \text{ нм}$.

Показано, что добавление BSA к раствору PDC-Pip-OH-Lys гипсохромно смещает спектр люминесценции продукта. На рис. 4 показан спектр возбуждения и эмиссии продукта реакции PDC-Pip-OH-Lys, зарегистрированный в смеси фосфатный буфер/EtOH (10 : 1) до и после добавления BSA. Как видно из рисунка, при добавлении эквимольного количества BSA наблюдается отчетливый гипсохромный сдвиг люминесценции PDC-Pip-OH-Lys на 30 нм.

Для подтверждения того, что PLC-Pip-OH реагирует с Lys по ϵ -аминогруппе, была проведена реакция PLC-Pip-OH с BuNH₂, в котором аминогруппа выступает аналогом ϵ -аминогруппы Lys. Спектр флуоресценции продукта PDC-Pip-OH-BuNH₂ аналогичен спектру продукта PDC-Pip-OH-Lys ($\lambda_{\text{макс. фл.}} = 624 \text{ нм}$ в EtOH). Учитывая данные проведенных экспериментов, следует заключить, что для PDC-Pip-OH-BSA наиболее вероятное место связывания – также ϵ -аминогруппа Lys.

По данным спектров поглощения PDC-Lys в смеси фосфатный буфер/EtOH (10 : 1) вычислены молярные коэффициенты экстинкции продуктов в максимумах поглощения: PDC-Pip-Lys $\epsilon = 2.35 \times 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$, PDC-Pip-OH-Lys $\epsilon = 1.85 \times 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$, PDC-NBu₂-Lys $\epsilon = 1.53 \times 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Мольное соотношение PLC и BSA при ковалентном связывании. Для определения мольного соотношения между красителем и белком при связывании PLC с BSA использовали спектрально-люминесцентные характеристики люминофора PDC-Lys, образующегося при взаимодействии Lys

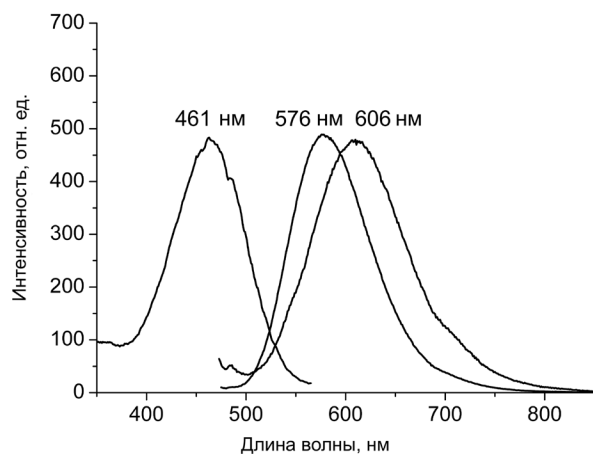


Рис. 4. Спектры возбуждения ($\lambda_{\text{макс}}=461$ нм), эмиссии PDC-Pip-OH-Lys ($\lambda_{\text{макс}}=606$ нм) и PDC-Pip-OH-Lys при добавлении эквимольного раствора BSA ($\lambda_{\text{макс}}=576$ нм), в смеси фосфатный буфер/EtOH (10 : 1).

с исходным PLC. Для подтверждения ковалентного связывания PLC-Pip с Lys синтезирован продукт их взаимодействия PDC-Pip-Lys (схема 2), выделен методом колоночной хроматографии, его

структура подтверждена данными ЯМР-спектроскопии и элементного анализа.

Проведена реакция PLC-Pip с BSA в смеси фосфатный буфер/EtOH (10 : 1) и зарегистрированы спектры поглощения (рис. 5) и люминесценции продукта. Максимум поглощения BSA в буферном растворе находится при 279 нм, а в смеси фосфатный буфер/EtOH (10 : 1) – при 277 нм. Значение коэффициента экстинкции для BSA при 279 нм известно $\varepsilon_{279} = 4.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [41], и его можно использовать для определения количества связанного с BSA красителя в фосфатном буфере. Коэффициент экстинкции люминесцентного продукта PDC-Pip-BSA был принят равным коэффициенту экстинкции, полученному из спектров поглощения синтезированного PDC-Pip-Lys $\varepsilon_{443} = 2.35 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

При исследовании реакции пирилиевых красителей с аминокислотами и BSA было выявлено, что образуются два основных продукта: ожидаемый пиридоцианиновый продукт с оранжевой люминесценцией как результат ANRORC-реакции

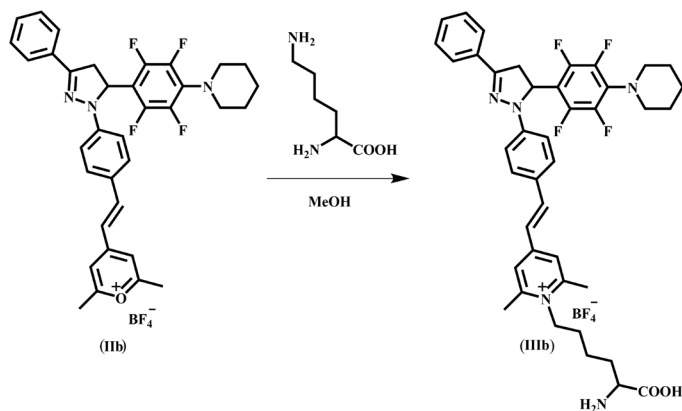


Схема 2. Реакция PLC-Pip с Lys в MeOH.

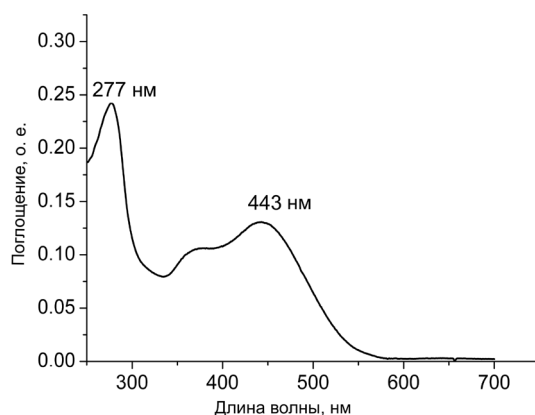


Рис. 5. Электронный спектр поглощения PDC-Pip-BSA в смеси фосфатный буфер/EtOH (10 : 1).

пирилоцианинового цикла в пиридоцианиновый PDC, а также предполагаемый продукт гидролиза, имеющий коротковолновое поглощение с максимумом в диапазоне 370–380 нм, обозначенный как P1. Продукт P1 был обнаружен по спектру поглощения при выдерживании красителя PLC в смеси фосфатный буфер/EtOH (10 : 1), его спектр сопоставлен со спектром BSA (рис. 6) для учета дополнительного поглощения от P1 при 277 нм. Степень связывания PLC с BSA определяли как мольное соотношение ($N = C_{PDC-BSA}/C_{BSA}$), исходя из данных оптических плотностей D и экстинкций ϵ , с учетом вклада в поглощение BSA поглощения продукта P1. В случае реакции PLC-Pip с BSA использовано выражение из работы [42] с учетом вклада P1 в фактор коррекции (CF):

$$\frac{C_{PDC-Pip-BSA}}{C_{BSA}} = \frac{D_{PDC-Pip-BSA(max)} \cdot \epsilon_{BSA279}}{D_{BSA279} \cdot \epsilon_{PDC-Pip-Lys(max)}}, \quad (1)$$

где $D_{BSA279} = (D_{spec279} - CF \cdot D_{PDC-Pip-BSA(max)})$. Фактор коррекции для PDC-Pip-Lys равен 0.2. Основной вклад в оптическую плотность в полосе поглощения белка вносит продукт гидролиза и суммарное значение $CF = 1.1$. Рассчитанное из формулы (1) мольное соотношение краситель/белок составило 2.4. Из вычисленного значения мольного соотношения следует, что ковалентное присоединение PLC к BSA происходит по двум-трем аминокислотным остаткам Lys. Такое соотношение достигается при начальном 8–10-кратном мольном избытке красителя по отношению к BSA.

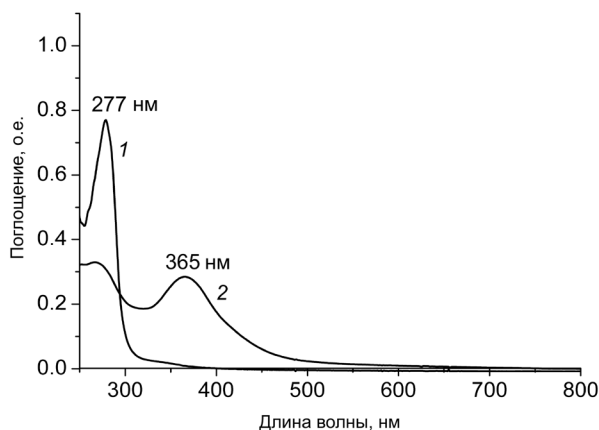


Рис. 6. Электронный спектр поглощения BSA (1) в смеси фосфатный буфер/EtOH (10 : 1) и продукта гидролиза PLC-Pip (2) в EtOH.

В случае PLC-Pip-OH и PLC-NBu₂ мольное соотношение N также составило величину, близкую к двум.

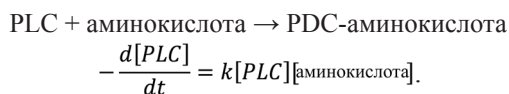
BSA представляет собой глобулярный белок, состоящий из трех спиралеобразных доменов, связанных в трехмерную жесткую устойчивую структуру. Эта структура имеет 17 дисульфидных мостиков [43] и 60 аминокислотных остатков Lys [44], из которых три (Lys 140, 561 и 587) внешние [45]. По-видимому, основная масса аминокислотных остатков Lys находится внутри глобулярной структуры белка и недоступна для PLC реагента. Кроме того, в условиях фосфатного буфера аминогруппы аминокислотных остатков Lys в BSA заряжены положительно, что приводит к взаимному отталкиванию с положительно заряженными молекулами PLC. Введение дополнительно катионных молекул PDC в BSA повышает положительный статический заряд белка. Стерические затруднения и зарядовый фактор снижают эффективность ковалентного взаимодействия PLC с BSA.

Скорость реакции PLC с BSA. На рис. 7а показана эволюция спектров поглощения реакции PLC-Pip-OH с BSA в смеси фосфатный буфер/MeOH (10 : 1). Спектр регистрировали спустя 2–3 с от начала реакции с интервалом 5 с. В процессе спектральной эволюции пик поглощения красителя PLC-Pip-OH при 586 нм убывает, и образуется пик пиридиниевого продукта PDC-Pip-OH-BSA при 463 нм. Однако первичное поглощение исходного красителя, оптическая плотность которого должна быть $\sim 1 D$, в максимуме не фиксируется, т.е. за время перемешивания растворов и введения кюветы в ячейку спектрофотометра (2–3 с) реакция уже проходит практически наполовину. Приведенные спектральные изменения и характерные времена превращений близки для всех синтезированных PLC. Условно время полупревращения PLC-BSA $\rightarrow$ PDC-BSA, которое попадает в так называемое мертвое время обычного спектрофотометрического метода, можно принять за 2–3 с. Полное превращение завершается за 5–10 мин. Для данных красителей при исследовании кинетики взаимодействия PLC-BSA на начальной стадии целесообразно применять скоростные методики измерения типа “стоп-флоу” (stop-flow). Высокая скорость взаимодействия синтезированных PLC с BSA существенно отличается от скорости взаимодействия юлолидино-

вого красителя Ру-1. При аналогичных концентрациях и условиях реакции его ковалентное связывание с белком происходит гораздо медленнее, время полупревращения для Ру-1 с BSA составляет 1.5 ч (рис. 7б), полное превращение – сутки. Скорости реакций краситель–белок для Ру-1-BSA и PLC-BSA отличаются на 3–4 порядка величины. При одинаковой акцепторной пирилевой части красителей структура донорной части резко влияет на скорость взаимодействия красителя с белком (в нашем случае – увеличивает).

Скорость реакции PLC-Pip-ОН с аминокислотами. На рис. 8а показана эволюция спектров поглощения реакции PLC-Pip-ОН с Lys в смеси растворителей MeOH/AcOH/Et₃N в соотношении (99.45 : 0.3 : 0.25) с интервалом между записью спектров 30 мин. В данной смеси ингибируется гидролиз PLC, и скорость реакции PLC с аминокислотами удовлетворительно соотносится с частотой сканирования спектра поглощения на спектрофотометре. В процессе спектральной эволюции пик поглощения красителя PLC-Pip-ОН при 589 нм убывает, и образуется пик пиридинового продукта PDC-Pip-ОН-Lys при 476 нм.

Реакция взаимодействия PLC с аминокислотой формально соответствует кинетическому уравнению второго порядка:



При проведении реакции в нашем случае аминокислоты брали в 10-кратном мольном избытке по отношению к PLC-Pip-ОН, поэтому в первом приближении изменением концентрации аминокислоты в ходе реакции можно пренебречь и учитывать протекание реакции по псевдопервому порядку:

$$-\frac{d[\text{PLC}]}{dt} = k'[\text{PLC}].$$

С учетом вышесказанного, константа скорости реакции псевдопервого порядка k' расхода PLC красителя вычисляется по следующей формуле:

$$k' = -\frac{1}{t} \ln \frac{C_t}{C_0}, \quad (2)$$

где C_0 и C_t – начальная и текущая концентрации PLC-Pip-ОН соответственно [46].

Для накопления продукта PDC-аминокислота k' рассчитывали следующим образом:

$$k' = -\frac{1}{t} \ln \left[1 - \frac{C_t}{C_{\max}} \right] \text{ или } k't = \ln \left[\frac{C_{\max}}{C_{\max} - C_t} \right]. \quad (3)$$

При $t \rightarrow \infty$ $C_{\max} \rightarrow C_0$. На рис. 8б приведена линейная зависимость логарифмической анаморфозы кинетической кривой накопления продукта реакции PDC-Pip-ОН-Lys, которая соответствует протеканию реакции псевдопервого порядка. В табл. 2 представлены значения констант скорости псевдопервого порядка накопления продукта PDC-Pip-ОН-аминокислота.

Из данных табл. 2 следует, скорости реакций красителя PLC-Pip-ОН с Lys и Cys близки между собой и значительно (в 10 раз) превышают скорость реакции красителя с Phe и Arg, причем наименьшая скорость реакции наблюдалась для Arg. Полученные значения констант скоростей реакции подтверждают повышенную реакционную способность красителя PLC-Pip-ОН с Lys по сравнению с Arg.

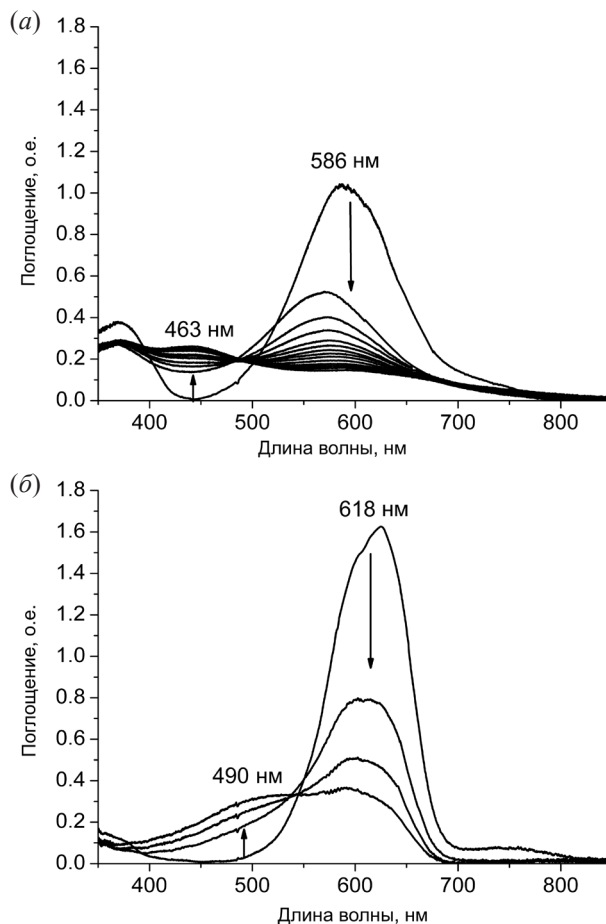


Рис. 7. Эволюция электронных спектров поглощения в смеси фосфатный буфер/MeOH (10 : 1) при взаимодействии (а) PLC-Pip-ОН с BSA с интервалом между записью спектра 5 с и (б) Ру-1 с BSA с интервалом между записью спектров 1 ч.

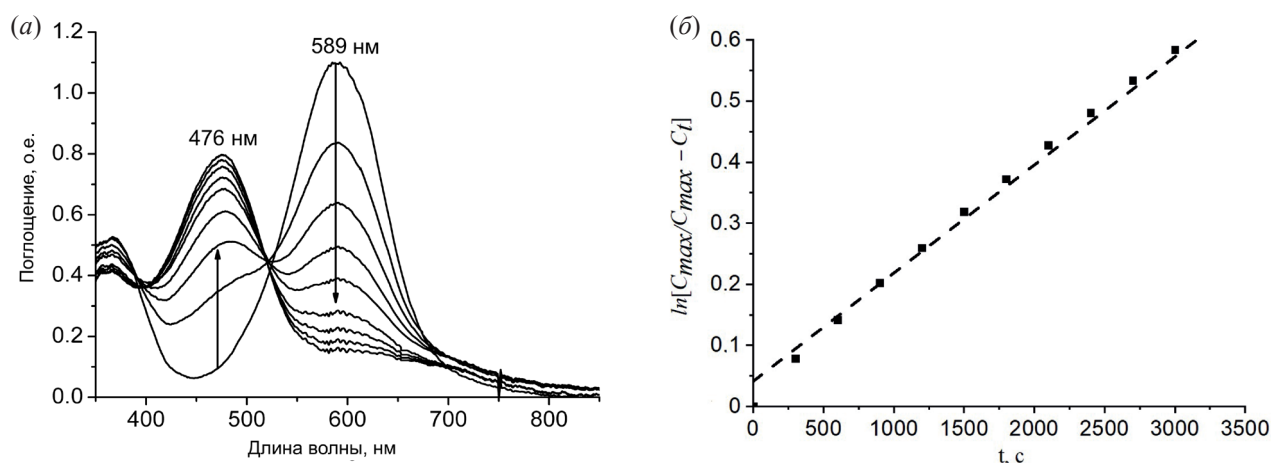


Рис. 8. (а) – Эволюция электронных спектров поглощения в смеси АсОН/МеОН/Ет₃Н при взаимодействии PLC-Pip-OH с Lys с интервалом между записью спектров 30 мин; (б) – линейная аппроксимация по уравнению псевдопервого порядка экспериментальных точек кинетической кривой накопления продукта PDC-Pip-OH-Lys, записанных с интервалом 5 мин в максимуме спектра поглощения.

Таблица 2. Константы скорости псевдопервого порядка образования PDC-Pip-OH с аминокислотами

Аминокислота	$k'_{\text{PDC-Pip-OH-аминокислота}}, \text{с}^{-1}$
Lys	16.0×10^{-5}
Arg	3.6×10^{-5}
Cys	14.0×10^{-5}
Phe	6.3×10^{-5}

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектрально-аналитические данные синтезированных соединений получены в Химическом исследовательском центре коллективного пользования СО РАН. Спектры ¹H- и ¹⁹F-ЯМР (δ, м.д.; КССВ J, Гц) регистрировали на приборе AV-300 (Bruker, Германия; 300.13 и 282.37 МГц соответственно). В спектрах ¹H-ЯМР в качестве внутреннего стандарта использовали остаточные протоны CH₃CN (δH 1.94 м.д.), CDCl₃ (δH 7.24 м.д.), CD₃OD (δH 3.30 м.д.), в спектрах ¹⁹F-ЯМР – C₆F₆. Электронные спектры поглощения регистрировали на спектрофотометрах Hewlett Packard 8453 (США) и AvaSpec-3648 (Avantes, США). Спектрофлуориметрические измерения проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США) со схемой регистрации люминесценции под углом 90° при ширине щелей возбуждения и эмиссии 5 нм.

В работе использовали L-аргинин (Sigma-Aldrich, США), L-лизин·H₂O (Reanal, Венгрия), L-цистеин (Reanal, Венгрия), L-фенилаланин (Реахим, Москва), бутиламин (Fluka, Швейцария), бычий сывороточный альбумин (Диаэм, Россия),

а также растворители марок х.ч. и ч.д.а. отечественного производства.

Альдегиды (**Ia–Ic**) получали по методике [36].

Синтез PLC (общая методика). Смесь альдегида (**Ia**) (или (**Ib**), или (**Ic**)) (0.5 ммоль) и тетрафторбората 2,4,6-триметилпирилия (0.105 г, 0.5 ммоль) кипятили в 7 мл MeOH в течение 4 ч при перемешивании на магнитной мешалке. После охлаждения отфильтровывали выпавший осадок, промывали Et₂O. Красители очищали осаждением из CH₃CN в Et₂O.

Тетрафторборат (E)-4-{4-[5-(4-дибутиламино-2,3,5,6-тетрафторфенил)-3-фенил-4,5-дигидро-1H-пиразол-1-ил]-стирил}-2,6-диметилпирилия (IIa**).** Темно-синий порошок. Выход 72%. Т. пл. 240–242°C (разл.). ЭСП, λ_{макс}/нм (lg ε): 583 (4.87) (CH₃CN), 595 (4.82) (EtOH). Спектр ¹H-ЯМР (CD₃CN): 0.86 (6H, т, J 7.3, 2CH₂CH₂CH₂CH₃), 1.19–1.34 (4H, м, 2CH₂CH₂CH₂CH₃), 1.37–1.49 (4H, м, 2CH₂CH₂CH₂CH₃), 2.66 (6H, с, 2CH₃), 3.17 (4H, т, J 7.3, 2CH₂CH₂CH₂CH₃), 3.51, 4.02, 5.93 (по 1H, все д.д., J 18.1, 12.7, 5.3, ABX, 3H пиразолина), 7.03 (1H, д, J 15.6, CH=), 7.18 (2H, д, J 8.9, 2H

аром.), 7.46–7.54 (5H, м, 3H аром., 2H пирилия), 7.71 (2H, д, J 8.9, 2H аром.), 7.82–7.89 (2H, м, 2H аром.), 8.10 (1H, д, J 15.6, CH=). Спектр ^{19}F -ЯМР (CD_3CN): 12.68, 12.69, 14.18, 17.41 (3 : 1 : 2 : 2). Элементный анализ, найдено, %: C 63.85, H 5.58, F 20.91, N 5.87. $\text{C}_{38}\text{H}_{40}\text{BF}_8\text{N}_3\text{O}$. Рассчитано, %: C 63.61, H 5.62, F 21.18, N 5.86.

Тетрафторборат (E)-2,6-диметил-4-(4-{5-[4-(пиперидин-1-ил)-2,3,5,6-тетрафторфенил]-3-фенил-4,5-дигидро-1H-пиразол-1-ил}-стирил)пирилия (IIb). Темно-синий порошок. Выход 94%. Т. пл. 219–222°C (разл.). ЭСП, $\lambda_{\text{макс}}/\text{нм}$ (lg ϵ): 583 (4.84) (CH_3CN), 598 (4.64) (EtOH). Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 1.57–1.68 (6H, м, 6H пиперидина), 2.48 (6H, с, 2 CH_3), 3.11–3.23 (4H, м, 4H пиперидина), 3.33, 3.89, 5.73 (по 1H, все д.д, J 17.5, 12.5, 5.6 Гц, A BX, 3H пиразолина), 6.86 (1H, д, J 15.4, CH=), 6.99–7.09 (2H, м, 2H аром.), 7.40–7.47 (3H, м, 3H аром.), 7.57 (2H, с, 2H пирилия), 7.64 (2H, д, J 8.9, 2H аром.), 7.72–7.78 (2H, м, 2H аром.), 8.16 (1H, д, J 15.4, CH=). Спектр ^{19}F -ЯМР (CDCl_3): 10.27, 10.32, 11.79, 16.21 (3 : 1 : 2 : 2). Элементный анализ, найдено, %: C 62.20, H 4.49, F 22.40, N 6.24. $\text{C}_{35}\text{H}_{32}\text{BF}_8\text{N}_3\text{O}$. Рассчитано, %: C 62.42, H 4.79, F 22.57, N 6.24.

Тетрафторборат (E)-2,6-диметил-4-(4-{5-[4-(4-гидроксипиперидин-1-ил)-2,3,5,6-тетрафторфенил]-3-фенил-4,5-дигидро-1H-пиразол-1-ил}-стирил)пирилия (IIc). Темно-синий порошок. Выход 84.5%. Т. пл. 241–243°C (разл.). ЭСП $\lambda_{\text{макс}}/\text{нм}$ (lg ϵ): 583 (4.76) (CH_3CN), 598 (4.62) (EtOH). Спектр ^1H -ЯМР (CD_3CN): 1.42–1.59 (2H, м, 2H пиперидина), 1.79–1.88 (2H, м, 2H пиперидина), 2.62 (6H, с, 2 CH_3), 2.84 (1H, д, J 4.0, OH), 3.01–3.15 (2H, м, 2H пиперидина), 3.28–3.39 (2H, м, 2H пиперидина), 3.45 (1H, д.д, J 17.8, 5.2, 1H пиразолина), 3.69 (1H, м, 1H пиперидина), 3.99 (1H, д.д, J 17.8, 12.4, 1H пиразолина), 5.89 (1H, д.д, J 12.4, 5.21, 1H пиразолина), 7.00 (1H, д, J 15.9, CH=), 7.15 (2H, д, J 8.8, 2H аром.), 7.44–7.52 (5H, м, 3H аром., 2H пирилия), 7.69 (2H, д, J 8.8, 2H аром.), 7.78–7.86 (2H, м, 2H аром.), 8.07 (1H, д, J 15.9, CH=). Спектр ^{19}F -ЯМР (CD_3CN): 12.56, 12.68, 12.73, 17.54 (2 : 3 : 1 : 2). Элементный анализ, найдено, %: C 61.12, H 4.70, F 21.82, N 6.02. $\text{C}_{35}\text{H}_{32}\text{BF}_8\text{N}_3\text{O}_2$. Рассчитано, %: C 60.97, H 4.68, F 22.04, N 6.09.

Взаимодействие PLC с BSA с образованием люминесцирующего продукта (общая методика). PLC (1.5×10^{-6} моль) растворяли в 1 мл EtOH. BSA

(1.5×10^{-7} моль) растворяли в 10 мл фосфатного буфера. Растворы смешивали. Полученная смесь через несколько минут приобретала оранжевую окраску с ярко выраженной флуоресценцией. При таком содержании EtOH денатурация белка не происходит, и обеспечивается растворение красителя.

Взаимодействие PLC с BSA с целью исследования кинетики реакции по изменению спектров поглощения. В спектрофотометрическую кювету с длиной оптического пути 10 мм заливали раствор BSA (1.8×10^{-8} моль) в 3.6 мл фосфатного буфера и PLC (7.2×10^{-8} моль) в 0.4 мл MeOH. Растворы смешивали.

Взаимодействие PLC с аминокислотами с образованием люминесцирующего продукта (общая методика). В плоскодонную колбу емкостью 25 мл помещали 0.1 ммоль Lys либо Arg, приливали 1 мл H_2O и нагревали до 50°C при перемешивании на магнитной мешалке. К горячей суспензии добавляли по каплям раствор 0.02 ммоль PLC в 4 мл MeOH. В случае Phe и Cys добавляли 10 мкл Et_3N . Реакционную смесь кипятили 4 ч, продукты гидролиза экстрагировали Et_2O , PDC экстрагировали CHCl_3 , растворители отгоняли в вакууме ротационного испарителя.

Взаимодействие PLC-Pip-OH с аминокислотами для исследования кинетики реакции по изменению спектров поглощения (общая методика). В спектрофотометрическую кювету с длиной оптического пути 10 мм помещали 4 мл MeOH, добавляли раствор аминокислоты (14.5×10^{-7} моль) в 12 мкл AcOH, затем 10 мкл Et_3N . К полученному раствору добавляли PLC-Pip-OH (1.45×10^{-7} моль) в 10 мкл MeOH.

Тетрафторборат (E)-1-(5-амино-5-карбокспентил)-2,6-диметил-4-(4-{5-[4-(пиперидин-1-ил)-2,3,5,6-тетрафторфенил]-3-фенил-4,5-дигидро-1H-пиразол-1-ил}-стирил)-пиридин-1-ия (IIb) (взаимодействие PLC-Pip с Lys с целью выделения продукта). В плоскодонную колбу емкостью 100 мл, снабженную капельной воронкой с противодавлением, помещали 0.016 г (0.1 ммоль) Lys, приливали 20 мл MeOH и нагревали до 50°C при перемешивании на магнитной мешалке. К горячей суспензии добавляли по каплям раствор 0.067 г (0.1 ммоль) PLC-Pip в 45 мл MeOH. Реакционную смесь кипятили 4 ч, охлаждали и отфильтровывали, MeOH отгоняли из фильтрата в вакууме ротационного испарителя, остаток

обрабатывали Et_2O . Порошок оранжевого цвета. Вес 0.073 г. Продукт выделяли с использованием полупрепаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе 1200 (Agilent, США) с диодно-матричным детектором. Разделение компонентов смеси осуществляли на колонке Agilent Prep-C18 (4.6×150 мм, 10 мкм) при скорости потока 2.0 мл/мин в градиентном режиме элюирования смесью воды (А) и MeOH (Б): 55–100% Б за 25 мин. Температура колонки – 30°C ; объем вводимой пробы – 50 мкл. Получили 0.014 г красителя. Т. пл. $195\text{--}197^\circ\text{C}$ (разл.). ЭСП $\lambda_{\text{макс}}/\text{нм}$ (lge): 480 (EtOH), 458 (4.39) (фосфатный буфер/EtOH, 10 : 1). Спектр флуоресценции, $\lambda_{\text{макс}}/\text{нм}$: 627 нм (EtOH), 598 (фосфатный буфер/EtOH, 10 : 1). Спектр ^1H -ЯМР (CD_3OD): 1.56–1.74 (6H, м, 3CH_2 пиперидина), 1.82–1.99 (4H, м, 2CH_2 Lys), 2.82 (6H, с, 2CH_3), 2.90–2.97 (1H, м, CH Lys), 3.15–3.21 (4H, м, 2CH_2 пиперидина), 3.42 (1H, д.д., J 18.0, 5.7 Гц, 1H пиразолина), 3.52–3.63 (2H, м, CH_2 Lys), 3.97 (1H, д.д., J 18.0, 12.9, 1H пиразолина), 4.34–4.44 (м, 2H, CH_2 Lys), 5.89 (1H, д.д., J 12.9, 5.7, 1H пиразолина), 7.01 (1H, д, J 16.1, CH=), 7.11 (2H, д, J 8.8, 2H аром.), 7.38–7.48 (3H, м, 3H аром.), 7.58 (2H, д, J 8.8, 2H аром.), 7.74 (1H, д, J 16.1, CH=), 7.77–7.84 (4H, м, 2H аром., 2H пиридиния). Спектр ^{19}F -ЯМР (CD_3OD): 10.69, 10.74, 12.60, 17.93 (3 : 1 : 2 : 2). Элементный анализ, найдено, %: C 61.24, H 5.47, N 8.40. $\text{C}_{41}\text{H}_{44}\text{BF}_8\text{N}_5\text{O}_2$. Рассчитано, %: C 61.43, H 5.53, N 8.74.

Взаимодействие PLC-Pip-OH с BuNH_2 . В плоскодонную колбу емкостью 25 мл помещали 10 мл MeOH и 0.1 ммоль BuNH_2 при перемешивании на магнитной мешалке. К полученному раствору добавляли по каплям раствор 0.1 ммоль PLC-Pip-OH в 1 мл MeOH. Реакционную смесь перемешивали 20 мин, MeOH отгоняли в вакууме ротационного испарителя.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированные фторсодержащие пирилоцианиновые красители PLC-Pip-OH, PLC-Pip и PLC-NBu₂ взаимодействуют с BSA и с аминокислотами в смеси фосфатный буфер/спирт с образованием люминесцирующих пиридоцианиновых красителей, ковалентно связанных с субстратом в результате реакции по аминокруппам. PDC/BSA в смеси фосфатный буфер/EtOH (10 : 1) имеют поглощение с максимумом $\lambda = 455$ нм (PDC-NBu₂-BSA), $\lambda = 443$ нм (PDC-

Pip-BSA), $\lambda = 463$ нм (PDC-Pip-OH-BSA) и интенсивную люминесценцию с максимумом $\lambda = 588$ нм (PDC-NBu₂-BSA), $\lambda = 596$ нм (PDC-Pip-BSA), $\lambda = 592$ нм (PDC-Pip-OH-BSA). По спектрально-люминесцентным характеристикам PDC/BSA и PDC/аминокислота показано, что наиболее вероятное место связывания PLC в BSA – ϵ -аминогруппа Lys. Наряду с PDC образуются продукты гидролиза, не связанные с белком, поглощающие в коротковолновой области. По данным спектров поглощения PDC-Pip/BSA рассчитано количество связанного с BSA люминофора, которое составило 2 молекулы PDC-Pip на 1 молекулу BSA. Показано, что практически полное взаимодействие между синтезированными PLC и BSA происходит за несколько минут при концентрации компонентов в растворе на уровне 10^{-4} – 10^{-5} М. В то же время продолжительность реакции BSA с юлолидиновым красителем Py-1 составляет несколько часов.

Методом UV-VIS-спектроскопии исследована эволюция спектральных изменений при взаимодействии PLC-Pip-OH с аминокислотами Cys, Phe, Lys и Arg в растворе. При избытке аминокислоты измерена константа скорости псевдопервого порядка образования PDC-Pip-OH-аминокислота. По уменьшению скорости в ANRORC-реакции с PLC аминокислоты располагаются в следующем ряду: Lys > Cys >> Phe $\geq$ Arg.

Учитывая высокую скорость и эффективность связывания полифторсодержащих пирилийпиразолиновых красителей с BSA и аминокислотами, полученные красители имеют перспективу применения в области биоимиджинга, протеомики и биомедицины.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Химическому исследовательскому центру коллективного пользования НИОХ СО РАН за проведение спектральных и аналитических измерений, а также Н.А. Орловой за помощь в технической подготовке текста.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках госзаданий НИОХ СО РАН № 0238-2021-0006, 1220 4040 0029-2 и FWUE-2025-0007.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равноценный вклад в написание статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roura S., Gálvez-Montón C., Bayes-Genis A. // J. Cell Mol. Med. 2013. V. 17. P. 693–703. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12018>
2. Richter J.R., Kasten B.B., Zinn K.R. // Adenoviral Vectors for Gene Therapy (2nd Edn). Academic Press, 2016. P. 767–802. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800276-6.00031-0>
3. Akkoul S., Ledee R., Leconge R., Leger C., Harba R., Pesnel S., Lerondel S., Lepape A., Vilcahuaman L. // Image and Signal Processing – 3rd International Conference. Cherbourg–Oceville, France, 2008. P. 163–172. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-69905-7>
4. Pletneva N.V., Goryacheva E.A., Artemyev I.V., Arkhipova S.F., Pletnev V.Z. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 498–505. <https://doi.org/10.1134/S1068162020040160>
5. Zhu S., Zhang J., Janjanam J., Bi J., Vegesna G., Tiwari A., Luo F., Wei J., Liu H. // Anal. Chim. Acta. 2013. V. 758. P. 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.026>
6. Donuru V.R., Zhu S., Green S., Liu H. // Polymer. 2010. V. 51. P. 5359–5368. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.09.029>
7. Ксенофонтова К.В., Ксенофонтов А.А., Ходов И.А., Румянцев Е.В. // Изв. вузов. Сер. Химия и хим. технология. 2020. Т. 63. С. 4–11. <https://doi.org/10.6060/ivkkt.20206305.6101>
8. Hötzer B., Medintz Hildebrandt N. // Small. 2012. V. 8. P. 2297–2326. <https://doi.org/10.1002/smll.201200109>
9. Sokolov A.I., Myasnenko I.N., Baleeva N.S., Baranov M.S. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2021. V. 47. P. 334–337. <https://doi.org/10.1134/S1068162021010234>
10. Matvienko I.V., Bayramov V.M., Parygina N.A., Kurochkin V.E., Alekseev Ya.I. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 349–359. <https://doi.org/10.1134/S1068162020030127>
11. Krueger A.T., Imperiali B. // ChemBioChem. 2013. V. 14. P. 788–799. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300079>
12. Ding B., Xiao Y., Zhou H., Zhang X., Qu C., Xu F., Deng Z., Cheng Z., Hong X. // J. Med. Chem. 2019. V. 62. P. 20492059. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01682>
13. Beltran A., Burguete M.I., Luis S.V., Galindo F. // Eur. J. Org. Chem. 2017. V. 2017. P. 4864–4870. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201700815>
14. Bayer M., Koenig S. // Electrophoresis. 2016. V. 37. P. 2953–2958. <https://doi.org/10.1002/elps.201600318>
15. Romieu A., Richard J.-A. // Tetrahedron Lett. 2016. V. 57. P. 317–320. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.12.010>
16. Kolchina E.F., Shelkovnikov V.V. // Russ. J. Org. Chem. 2015. V. 51. P. 1398–1403. <https://doi.org/10.1134/S1070428015100073>
17. Шелковников В.В., Каргаполова И.Ю., Коротаев С.В., Орлова Н.А., Чуйков И.П., Надолинный В.А. // Изв. АН. Сер. хим. 2014. № 3. С. 635–641. <https://doi.org/10.1007/s11172-014-0485-y>
18. Wetzl B.K., Yarmoluk S.M., Craig D.B., Wolfbeis O.S. // Angew. Chem. 2004. V. 43. P. 5400–5402. <https://doi.org/10.1002/anie.200460508>
19. Katritzky A.R., Mokrosz J.L., De Rosa M. // J. Chem. Soc. 1984. № 5. P. 849–855.
20. Azab H.A., El-Korashy S.A., Anwar Z.M., Khairy G.M., Duerkop A. // Chemistry. 2012. V. 243. P. 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2012.05.029>
21. Чубаков В.П., Чубаков П.А., Плеханов А.И., Орлова Н.А., Каргаполова И.Ю., Шелковников В.В. // Рос. нанотехнологии. 2016. Т. 11. № 7–8. С. 30–34. <https://doi.org/10.1134/S1995078016040054>
22. Sapozhnikova K.A., Gulyak E.L., Misyurin V.A., Simonova M.A., Ryabukhina E.V., Alexeeva A.V., Tikhonova N.A., Lyzhko N.A., Popova G.P., Misyurin A.V., Ustinov A.V., Korshun V.A., Alferova V.A., Ryazantsev D.Y., Brylev V.A. // Molecules. 2023. V. 28. P. 425. <https://doi.org/10.3390/molecules28010425>
23. Thayer A.M. // Chem. Eng. News. 2006. V. 84. № 23. P. 15–24.
24. Mena F., Mena B., Sharts O.N. // J. Mol. Pharm. Org. Process. 2013. V. 1. P. 1–6. <https://doi.org/10.4172/2329-9053.1000104>
25. Носова Э.В., Липунова Г.Н., Чарушин В.Н. // Усп. химии. 2009. Т. 78. № 5. С. 421–441. <https://doi.org/10.1070/RC2009v078n05ABEH004049>
26. Casa S., Henary M. // Molecules. 2021. V. 26. P. 1160. <https://doi.org/10.3390/molecules26041160>
27. Moseev T.D., Varaksin M.V., Virlova E.A., Medvedeva M.V., Svalova T.S., Melekhin V.V., Tsmokaluk A.N., Kozitsina A.N., Charushin V.N., Chupakhin O.N. // Dyes Pigm. 2022. V. 202. P. 110251. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2022.110251>

28. Pace C.J., Zheng H., Mylvaganam R., Kim D., Gao J. // *Angew. Chem.* 2012. V. 51. P. 103–107.
<https://doi.org/10.1002/ange.201105857>
29. Pace C.J., Gao J. // *Acc. Chem. Res.* 2013. V. 46. P. 907–915.
<https://doi.org/10.1021/ar300086n>
30. Huang Z., Chen X., Wu G., Metrangolo P., Whitaker D., McCune J.A., Scherman O.A. // *J. Am. Chem. Soc.* 2020. V. 142. P. 7356–7361.
<https://doi.org/10.1021/jacs.0c02275>
31. Matiadis D., Sagnou M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 1–38.
<https://doi.org/10.3390/ijms21155507>
32. George R.F., Kandeel M., El-Ansary D.Y., El Kerdawy A.M. // *Biochem. J.* 2020. V. 9. P. 103780.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103780>
33. Wu P., Nielsen T.E., Clausen M.H. // *Trends Pharmacol. Sci.* 2015. V. 36. P. 422–439.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.005>
34. Ahsan M.J., Ali A., Ali A., Thiriveedhi A., Bakht M.A., Yusuf M., Salahuddin, Afzal O., Altamimi A.S.A. // *ACS Omega.* 2022. V. 7. P. 38207–38245.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.2c05339>
35. Шмуйлович К.С., Орлова Н.А., Карпова Е.В., Шакиров М.М., Шелковников В.В. // *Изв. АН. Сер. Хим.* 2010. № 7. С. 1378–1382.
<https://doi.org/10.1007/s11172-010-0255-4>
36. Shelkovnikov V.V., Orlova N.A., Kargapolova I.Y., Erin K.D., Maksimov A.M., Chernonosov A.A. // *Russ. J. Org. Chem.* 2019. V. 55. P. 1504–1517.
<https://doi.org/10.1134/S1070428019100087>
37. Chen M.Z., Moily N.S., Bridgford J.L., Wood R.J., Radwan M., Smith T.A., Song Z., Tang B.Z., Tilley L., Xu X., Reid G.E., Pouladi M.A., Hong Y., Hatters D.M. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 474.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00203-5>
38. Ariyasu S., Hayashi H., Xing B., Chiba S. // *Bioconj. Chem.* 2017. V. 28. P. 897–902.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00024>
39. Weijers R.N. // *Clin. Chem.* 1977. V. 23. P. 1361–1362.
<https://doi.org/10.1093/clinchem/23.7.1361>
40. Молекулярная биология. Структура и функции белков: Учебник для биол. спец., вузов / Под ред. А.С. Спирина. Издательство: М.: Высшая школа, 1996. 335 с.
41. Zhao P., Huang J.-W., Ji L.-N. // *Spectrochimica Acta Part A.* 2012. V. 88. P. 130–136.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.12.017>
42. Спицын А.Н., Уткин Д.В., Куреев М.Н., Овчинникова М.В., Кузнецов О.С., Ерохин П.С., Кочубей В.И. // *Опт. и спектр.* 2020. Т. 128. С. 430–434.
<https://doi.org/10.21883/OS.2020.03.49071.76-19>
43. Борзова В.А. // Механизмы защитного действия шаперонов при агрегации белков. Дисс. канд. биол. наук, Институт биохимии им. А.Н. Баха. Москва, 2016.
44. Azim-Zadeh O., Hillebrecht A., Linne U., Marahiel M.A., Klebe G., Lingelbach K., Nyahlwidhe J. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 21609–21617.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M610921200>
45. Anthony-Regnitz C.M., Wilson A.E., Sweazea K.L., Braun E.J. // *J. Mol. Evol.* 2020. V. 88. P. 653–661.
<https://doi.org/10.1007/s00239-020-09964-y>
46. Семиохин И.А., Страхов Б.В., Осипов А.И. // Кинетика химических реакций: учеб. пособие. М.: Изд-во МГУ, 1995, 351 с.

Spectral-Luminescent Properties of Products of Interaction of Polyfluorinated Containing a Pyrazoline Fragment Pyrylium Dyes with Bovine Serum Albumin and Amino Acids

V. V. Shelkovnikov^{*, **, #}, D. D. Doroshenko^{*}, I. Yu. Kargapolova^{*}, P. A. Kozlakov^{**},
N. A. Shestakov^{**}, and Yu. S. Sotnikova^{*}

[#] Phone: +7 (383) 330-89-96; e-mail: vice@nioch.nsc.ru

^{*} Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
prosp. Akad. Lavrent'eva 9, Novosibirsk, 630090 Russia

^{**} Novosibirsk State Technical University, prosp. Karla Marksa 20, Novosibirsk, 630073 Russia

Studies of reaction ability fluorescent dyes for the production of labeled proteins and amino acids are important for the fields of bioengineering and biomedicine, in particular for obtaining bioimages for the purpose of cell visualization, studying the structure of labeled proteins by biophysical methods. Pyrylium dyes are able to interact with amino groups of proteins to form luminescent products, which allows them to be used in the field of proteomics. It is interesting to study the conjugation pyrylium dyes, containing both polyfluorinated fragment responsible to increased lipophilicity at proteins conjugation and pyrazoline fragment demonstrating anticancer activity. Pyrylium dyes containing a pyrazoline fragment and dialkylamino substituents (piperidino-, dibutylamino-, 4-hydroxypiperidino-) in a polyfluorinated aromatic ring in the donor part were synthesized by Knoevenagel condensation reaction. The reaction of pyrylium dyes with compounds containing a primary amino group was carried out to obtain a pyridinium dyes by the ANRORC mechanism (Addition of Nucleophiles, Ring Opening and Ring Closure). The ability of pyrylium dyes to react with bovine serum albumin (BSA) and amino acids such as Lys, Arg, Cys, Phe to form pyridinium luminophore was shown. The spectral-luminescent properties of the resulting luminophores were investigated. The product of the reaction of pyrylium dye (*E*)-2,6-dimethyl-4-(4-{3-phenyl-5-[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(piperidine-1-yl)phenyl]-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole-1-yl}-styryl)pyrylium tetrafluoroborate with Lys was isolated and its structure was confirmed by NMR spectroscopy. The binding site of pyrylium dyes with BSA – ϵ -amino group of Lys was determined. Along with pyridinium luminophores, in aqueous solutions hydrolysis products are formed that are not bonded with protein and absorb in the short-wavelength region. The calculated amount of luminophore bound to BSA is two molecules of pyrylium dye per one molecule of BSA. The synthesized pyrylium dyes react with BSA in the mixture of phosphate buffer with methanol (pH 7.4) 3–4 orders of magnitude faster than the well-known julolidine dye Py-1. The relative reaction rates of (*E*)-2,6-dimethyl-4-(4-{3-phenyl-5-[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(4-hydroxypiperidine-1-yl)phenyl]-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole-1-yl}styryl) pyrylium tetrafluoroborate with amino acids were determined as Lys > Cys >> Phe $\geq$ Arg. The obtained polyfluoro pyrylium-pyrazolinium dyes have the application perspective in the field of bioimaging, proteomic and biomedicine, due to high conjunction rate and efficiency with BSA and amino acids.

Keywords: polyfluorinated pyrylium/pyridocyanine dyes, synthesis, amino acids, BSA, spectral luminescent properties, reactivity