

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА И БЕЛОК-ЛИГАНДНЫЕ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО РОТОРА
НА ОСНОВЕ БОРДИПИРРОМЕТЕНАА. Р. ДУДКО¹⁾, М. С. ХОРЕЦКИЙ¹⁾, Н. С. ФРОЛОВА¹⁾,
Я. В. ФАЛЕТРОВ^{1),2)}, В. М. ШКУМАТОВ^{1),2)}¹⁾Научно-исследовательский институт физико-химических проблем БГУ,
ул. Ленинградская, 14, 220006, г. Минск, Беларусь²⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Получен и охарактеризован флуоресцентный молекулярный ротор (ФМР) на основе 4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-5-индацена. Параметры эмиссии флуоресценции соединения в значительной мере зависят от изменения вязкости среды. Так, увеличение вязкости системы при переходе из среды этанола в среду глицерина приводит к росту интенсивности эмиссии флуоресценции полученного ФМР в 27 раз. Вместе с этим соединение не обладает ярко выраженным сольватохромизмом. Рассмотренный ФМР способен также аффинно связываться с бычьим сывороточным альбумином, что подтверждается увеличением интенсивности эмиссии флуоресценции соединения при их взаимодействии. Методом молекулярного докинга определены два возможных сайта связывания соединения и описано ближайшее аминокислотное окружение лиганда. Полученные данные могут быть использованы для создания новых флуоресцентных сенсоров вязкости и белок-лигандных взаимодействий в биосистемах *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: бордипиррометен; бычий сывороточный альбумин; молекулярный докинг; молекулярный ротор; флуоресценция.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке Белорусского фонда фундаментальных исследований (грант № Х21М-059) и в рамках государственной программы научных исследований «Химические технологии и материалы».

Образец цитирования:

Дудко АР, Хорецкий МС, Фролова НС, Фалетров ЯВ, Шкуматов ВМ. Флуоресцентные свойства и белок-лигандные взаимодействия молекулярного ротора на основе бордипиррометена. *Журнал Белорусского государственного университета. Химия.* 2022;1:61–71.
<https://doi.org/10.33581/2520-257X-2022-1-61-71>

For citation:

Dudko AR, Horetski MS, Frolova NS, Faletrov YV, Shkumatov VM. Fluorescent properties and protein-ligand interactions of boron dipyrromethene molecular rotor. *Journal of the Belarusian State University. Chemistry.* 2022;1:61–71. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2520-257X-2022-1-61-71>

Авторы:

Анастасия Руслановна Дудко – стажер младшего научного сотрудника лаборатории биохимии лекарственных препаратов.

Матвей Сергеевич Хорецкий – младший научный сотрудник лаборатории биохимии лекарственных препаратов.

Нина Степановна Фролова – научный сотрудник лаборатории биохимии лекарственных препаратов.

Ярослав Вячеславович Фалетров – кандидат химических наук, доцент; ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии лекарственных препаратов¹⁾, доцент кафедры высокомолекулярных соединений химического факультета²⁾.

Владимир Макарович Шкуматов – член-корреспондент НАН Беларуси, доктор биологических наук, профессор; главный научный сотрудник лаборатории биохимии лекарственных препаратов¹⁾, профессор кафедры высокомолекулярных соединений химического факультета²⁾.

Authors:

Anastasiya R. Dudko, junior researcher trainee at the laboratory of biochemistry of drugs.

chem.dudkoar@gmail.com

Matvey S. Horetski, junior researcher at the laboratory of biochemistry of drugs.

matvey.horetski@gmail.com

Nina S. Frolova, researcher at the laboratory of biochemistry of drugs.

biopharm@bsu.by

Yaroslav V. Faletrov, PhD (chemistry), docent; leading researcher at the laboratory of biochemistry of drugs^a and associate professor at the department of macromolecular compounds, faculty of chemistry^b.

yaroslav82@tut.by

Vladimir M. Shkumatov, corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, doctor of science (biology), full professor; chief researcher at the laboratory of biochemistry of drugs^a and professor at the department of macromolecular compounds, faculty of chemistry^b.

vlad.shkumatov@tut.by

FLUORESCENT PROPERTIES AND PROTEIN-LIGAND INTERACTIONS OF BORON DIPYRROMETHENE MOLECULAR ROTOR

A. R. DUDKO^a, M. S. HORETSKI^a, N. S. FROLOVA^a,
Y. V. FALETROV^{a, b}, V. M. SHKUMATOV^{a, b}

^aResearch Institute for Physical Chemical Problems, Belarusian State University,
14 Leninhradskaia Street, Minsk 220006, Belarus

^bBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: A. R. Dudko (chem.dudkoar@gmail.com)

A fluorescent molecular rotor (FMR) based on boron dipyrromethene core was obtained. Fluorescence emission properties of the compound strongly depend on the medium viscosity. The emission intensity increases 27 times after viscosity changing from ethanol to glycerol medium. At the same time, the compound appeared almost insensitive to solvatochromic effects. Obtained FMR also can affinity bind with the bovine serum albumin protein active sites followed by noticeable emission intensity growth. Possible ligand binding sites and main amino acid surrounding were described with molecular docking simulations and are in an agreement with experimental data. The results can be used for further design and synthesis of novel fluorescent viscosity and protein-ligand interactions sensors suitable for implementation in biosystems *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: boron dipyrromethene; bovine serum albumin; molecular docking; molecular rotor; albumin; fluorescence.

Acknowledgements. The work was supported by Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant No. X21M-059) and governmental program of scientific researches «Chemical technologies and materials».

Введение

Современные физико-химические методы исследования, использующие флуоресценцию в качестве аналитического сигнала, являются востребованными в разных областях химии, биологии, медицины. Так, к наиболее распространенным методам относят получение и применение различных флуоресцентно меченных биологически активных соединений. Данные производные содержат фрагмент флуорофора, но сохраняют физико-химические свойства, схожие с физико-химическими свойствами природных аналогов [1–4]. Это значительно упрощает изучение динамических процессов в клетках и их визуализацию [5; 6]. Например, использование флуоресцентных меток позволяет избежать применения радиоактивно меченных соединений, основными недостатками которых являются ограниченные времена полураспада, накопление высокоактивных отходов и трудность коммерческого использования [7; 8]. Отдельной группой флуоресцентных соединений, применяемых в изучении клеточных процессов, выступают флуоресцентные молекулярные ротаторы (ФМР) [9]. Структурные фрагменты таких флуорофоров способны претерпевать свободное вращение относительно друг друга или некоторого макроскопического объекта, такого как поверхность или твердое тело. Составная часть ФМР, которая осуществляет вращение и обычно имеет наименьший момент инерции, является ротатором, стационарная часть ФМР – статором [10]. Как правило, статор и ротатор составляют единую систему сопряжения, поэтому параметры их вращения относительно друг друга влияют и на флуоресцентные свойства соединения в целом. В то же время внутримолекулярное вращение в ФМР зависит от параметров среды, а именно свойств микроокружения молекул. В связи с этим подобные структуры применяются в качестве молекулярных инструментов для изучения микровязкости клеточного содержимого [11; 12]. Аномальные изменения данных показателей зачастую сопутствуют таким заболеваниям, как болезнь Альцгеймера, атеросклероз, диабет [13–15].

Представителями классических ФМР являются стильбены, бензилиденовые малонитрилы, различные арилметиновые структуры [16]. В качестве ФМР также находят применение тиофлавины Т. Его связывание с амилоидными фибриллами и прочими белковыми агрегатами позволяет следить за их образованием через увеличение квантового выхода флуоресценции (Ф) тиофлавина Т [17; 18]. Однако максимальная величина квантового выхода флуоресценции тиофлавина Т в изученных системах невелика и составляет менее 10 %, поэтому целесообразно разрабатывать другие структуры ФМР, обладающие большими значениями квантового выхода флуоресценции [19]. К таким структурам можно отнести производные 4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-5-индацена (BODIPY), часто характеризующиеся высокими значениями коэффициентов молярного поглощения (ϵ), квантового выхода флуоресценции и приемлемой устойчивостью в биологических средах [20–22]. Вместе с тем разнообразие структурные модификации BODIPY позволяют получать флуорофоры с заданными оптическими свойствами, что также обеспечивает интерес к BODIPY. Как и другие ФМР, BODIPY-ФМР применяют в качестве

сенсоров микровязкости окружения. Так, представленные в литературе соединения на основе BODIPY могут проникать в митохондрии клеток HeLa и позволяют проводить количественное определение изменения микровязкости органелл с помощью метода визуализации времени жизни флуоресценции (*fluorescence lifetime imaging*), использующего коррелированный по времени счет одиночных фотонов (*time correlated single photon counting*) [23; 24]. К другим примерам применения BODIPY-ФМР можно отнести мониторинг мембранной вязкости в дифференцирующих стволовых клетках [25].

Зависимость флуоресцентных свойств BODIPY-ФМР от состава и вязкости среды также позволяет следить за реализацией белок-лигандных взаимодействий. Связывание ФМР в активных центрах белков способно воспроизводить высоковязкие среды за счет относительной фиксации структуры ФМР в пространстве. Это делает возможным изучение различных клеточных процессов, связанных с целевыми белками, а также детектирование самих биомолекул через изменение параметров флуоресценции ФМР. Так, известны случаи использования некоторых BODIPY-ФМР для исследования компонентов плазмы крови, а возможность взаимодействия BODIPY-ФМР с альбумином подтверждает вероятность применения белка в качестве модельной системы для анализа взаимодействий BODIPY-ФМР и биомолекул [26; 27]. К другим примерам использования BODIPY-ФМР в данной области можно отнести изучение процессов агрегации амилоидных пептидов, важных маркеров болезни Альцгеймера, через ковалентную модификацию пептидов по аминокислотным остаткам лизина с помощью BODIPY-ФМР [28; 29].

Вместе с тем уже представленные в литературе BODIPY-ФМР, как правило, используются в качестве флуоресцентной метки для других целевых соединений, а данные о физико-химических свойствах и белок-лигандных взаимодействиях индивидуальных BODIPY-ФМР недостаточно описаны [30; 31]. Вследствие этого важным является изучение свойств индивидуальных BODIPY-ФМР как инструментов для определения вязкостных характеристик сред, температуры и белок-лигандных взаимодействий [32]. В настоящей работе получено производное BODIPY флуорофора, обладающее свойствами ФМР. Соединение содержит только один фенильный заместитель в *мезо*-положении BODIPY и является удобной модельной системой. Оптические свойства полученного производного в значительной мере зависят от вязкости среды и реализации белок-лигандных взаимодействий, показанных на примере бычьего сывороточного альбумина (БСА). Установленные зависимости важны для разработки новых флуоресцентных красителей на основе BODIPY-ФМР и для их применения в различных микробиологических и биохимических исследованиях [33; 34].

Материалы и методы исследования

Все реагенты и растворители были коммерчески доступны, очищены и подготовлены непосредственно перед использованием согласно стандартным методикам [8]. Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) регистрировались на приборе Bruker Avance III 400 MHz (Швейцария) в дейтерохлороформе (CDCl_3) при 293 К. Химические сдвиги (δ) указаны в миллионных долях относительно остаточного сигнала CDCl_3 , принятого за 7,26 м. д. Спектры поглощения и эмиссии флуоресценции соединений записывали на спектрофлуориметре SOLAR CM2203 (Беларусь) в термостатированной кварцевой кювете с длиной светового пути 1 см. Для осуществления молекулярного докинга кристаллическую структуру БСА взяли из базы данных белков RCSB PDB (код структуры белка 4f5s). Предварительную обработку структуры белка проводили в программе *Discovery Studio 2016* и программном пакете *MGLTools* (версия 1.5.6). Структуру лиганда заранее оптимизировали в программе *ORCA* (версия 4.2.0) (PBE0-D3BJ/def2-SVP) [35–39]. Молекулярный докинг осуществляли с помощью программного пакета *Autodock Vina* [40]. Область докирования лиганда имела центр, соответствующий центру сайта связывания белка, и размеры $30 \times 30 \times 30 \text{ \AA}$ с параметром тщательности 512.

Получение 4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-8-фенил-5-индацена (соединение 1). Соединение **1** получили путем конденсации пиррола и бензальдегида с последующим окислением соответствующего дипиррометана 2,3-дихлоро-5,6-дицианобензохиноном до дипиррометена и его комплексации с эфиром трифторида бора (рис. 1) согласно описанной в литературе методике [41]. Выход вещества составил 14 %.

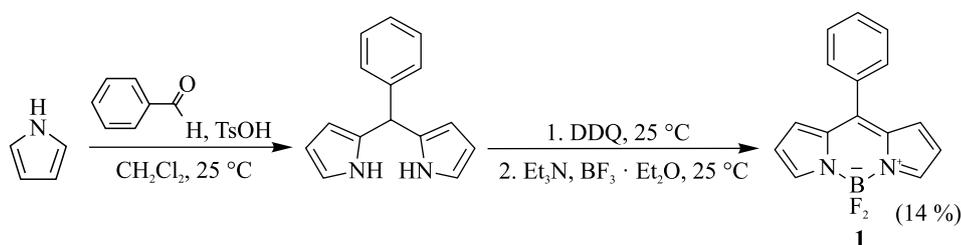


Рис. 1. Схема синтеза соединения **1**
Fig. 1. Synthetic scheme of compound **1**

Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м. д.): 7,95 (2H, с), 7,64–7,48 (5H, м), 6,94 (2H, д, $J = 4,2$ Гц), 6,55 (2H, д, $J = 3,7$ Гц); спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м. д.): 147,51, 144,24, 135,08, 133,90, 130,89, 130,60, 128,56, 118,67.

Общая методика определения коэффициентов молярного поглощения и квантового выхода флуоресценции соединения 1. Для вычисления коэффициентов молярного поглощения и построения графика их зависимости от длины волны поглощения ($\lambda_{\text{полл}}$) использовали растворы соединения **1** в этаноле различной концентрации. Значения оптических плотностей (D) анализируемых растворов находились в диапазоне от 0,1 до 1,0. Сдвиги Стокса рассчитывали как разность длин волн максимумов поглощения и эмиссии флуоресценции флуорофора. Для вычисления квантового выхода флуоресценции соединения **1** в этаноле использовали раствор флуоресцеина в 0,1 моль/л NaOH ($\Phi_{\text{ст}} = 79\%$) в качестве стандарта. Измерения и обработка данных проводились согласно описанному в литературе протоколу [42]. Значения оптических плотностей рабочих растворов на длине волны возбуждения ($\lambda_{\text{возб}}$) находились в диапазоне от 0,02 до 0,1 для минимизации концентрационного тушения флуоресценции. Квантовый выход флуоресценции рассчитывали по формуле

$$\Phi_x = \Phi_{\text{ст}} \left(\frac{\text{grad}_x}{\text{grad}_{\text{ст}}} \right) (\eta_x^2 \eta_{\text{ст}}^2),$$

где Φ_x и $\Phi_{\text{ст}}$ – значения квантовых выходов флуоресценции соединения **1** и стандарта соответственно; grad_x и $\text{grad}_{\text{ст}}$ – тангенсы угла наклона графика соответствующих линеаризованных зависимостей площади под кривой эмиссии флуоресценции соединения **1** и стандарта от значений оптических плотностей их растворов; η_x и $\eta_{\text{ст}}$ – показатели преломления сред, в которых проводилась запись спектров соединения **1** и стандарта.

Определение зависимости интенсивности эмиссии флуоресценции соединения 1 от вязкости среды. Для определения влияния вязкости среды на флуоресцентные свойства **1** равные навески соединения растворяли в одинаковых объемах смесей этанол – глицерин с различной мольной долей (χ) глицерина и термостатировали в течение 30 мин при 25 °С. Вязкость полученных смесей, использованная при обработке данных, представлена в работе [43]. Для всех образцов записывали спектры эмиссии флуоресценции на длине волны возбуждения 360 нм и определяли площади под кривыми эмиссии флуоресценции ($S_{\text{фл}}$). Для вычисления коэффициента чувствительности соединения **1** к изменению вязкости среды (η) рассматривали зависимость значения десятичного логарифма изменения $S_{\text{фл}}$ от величины десятичного логарифма η . Искомый коэффициент приняли как тангенс угла наклона графика аппроксимированной линейной зависимости. Из-за отсутствия ярко выраженного сольватохромизма соединения **1** влияние полярности среды на результаты описанных измерений считали несущественным.

Обратное титрование соединения 1 бычьим сывороточным альбумином. Раствор соединения **1** приготовили в 1 ммоль/л фосфатном буфере с добавлением 5 % N,N-диметилформамида [44]. В свою очередь, раствор БСА приготовили в аналогичном растворе лиганда для поддержания постоянной концентрации последнего в процессе титрования. На начальном этапе записывали спектры поглощения и эмиссии флуоресценции образца, содержащего индивидуальный лиганд. Затем раствор БСА добавляли к раствору лиганда в заданном соотношении. После каждого добавления порции белка и перед следующим измерением спектров поглощения и эмиссии флуоресценции образец термостатировали в течение 10 мин при температуре 25 °С. Длина волны возбуждения для всех измерений составляла 490 нм. Для построения кривой титрования были найдены отношения $S_{\text{фл}}$ соответствующих образцов с БСА к $S_{\text{фл}}^0$ исходного индивидуального раствора лиганда ($S_{\text{фл}}^0$). Построен график зависимости найденных отношений $\frac{S_{\text{фл}}}{S_{\text{фл}}^0}$ от количества добавленных эквивалентов белка.

Результаты и их обсуждение

Соединение **1** содержит в структуре BODIPY только фенильный заместитель, возможность вращения которого относительно плоскости BODIPY обуславливает использование данного соединения в качестве ФМР (см. рис. 1, соединение **1**). Вместе с тем, за исключением фрагмента BF_2 , в структуре соединения **1** отсутствуют заместители, способные к специфическому взаимодействию (образованию водородных связей, ковалентному связыванию) с молекулярным окружением соединения **1**, что делает его хорошим модельным BODIPY-ФМР.

Соединение **1** обладает высокими значениями коэффициентов молярного поглощения в широком диапазоне длин волн (рис. 2, а), при этом максимальная величина коэффициентов молярного поглощения наблюдается в видимой области спектра при $\lambda_{\text{полл}} = 499$ нм и равняется $56\,835 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. В то же время квантовый выход флуоресценции составляет лишь 2,86 %. Низкое значение квантового

выхода флуоресценции, вероятно, связано с возможностью незатрудненного внутримолекулярного вращения фенильного заместителя относительно плоскости BODIPY в среде этанола, имеющего сравнительно низкую вязкость (1,214 мПа · с при 25 °С) [43]. Это приводит к преобладанию процессов безызлучательной релаксации флуорофора из возбужденного состояния. Вместе с тем, как показано на рис. 2, формы спектров поглощения и эмиссии флуоресценции соединения **1** в этаноле сходные, что свидетельствует о подобии геометрий основного и того возбужденного состояния, из которого происходит излучательная релаксация флуорофора.

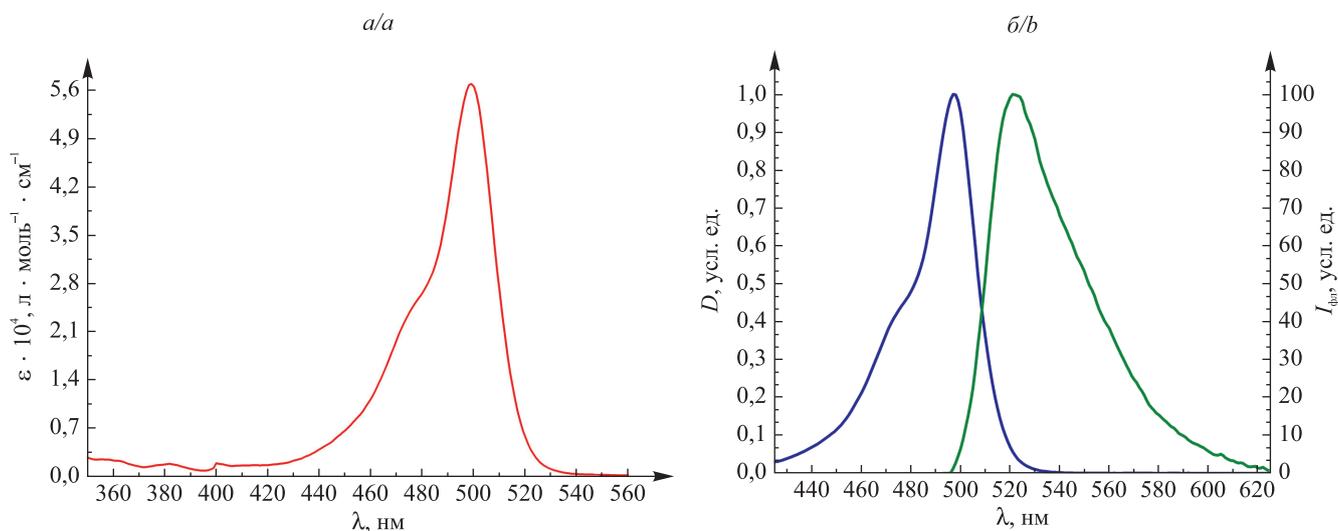


Рис. 2. Зависимость коэффициента молярного поглощения соединения **1** от длины волны (λ) (а) и спектры поглощения (—) и эмиссии флуоресценции (—) соединения **1** в этаноле (б)

Fig. 2. Molar absorption coefficient dependence on the absorption wavelength (λ) (a) and absorption (—) and emission (—) spectra of compound **1** in ethanol (b)

Для изучения влияния полярности растворителя на оптические свойства соединения **1** определяли длины волн максимумов поглощения ($\lambda_{\text{макс. погл}}$) и эмиссии флуоресценции ($\lambda_{\text{макс. эм}}$), а также рассчитывали значения сдвигов Стокса ($\Delta\lambda$) в различных растворителях. Данные представлены в таблице. Для растворителей приведены значения полярности (E_T^N), полученные из соответствующих спектров поглощения 2,6-дифенил-4-(2,4,6-трифенил-1-пиридино)фенолята [45].

**Значения длин волн максимумов поглощения
и эмиссии флуоресценции, а также соответствующих
сдвигов Стокса соединения **1** в различных растворителях**

**Wavelengths of absorption and emission maxima
and Stokes shifts of compound **1** in various solvents**

Растворитель	E_T^N	$\lambda_{\text{макс. погл}}$, нм	$\lambda_{\text{макс. эм}}$, нм	$\Delta\lambda$, нм
Этанол	0,654	499	518	19
1,2-Дихлорэтан	0,327	501	524	23
Дихлорметан	0,309	501	523	22
Этилацетат	0,228	498	523	25
Толуол	0,099	504	530	26
<i>n</i> -Гексан	0,009	500	522	22

Полученные данные свидетельствуют о слабовыраженном сольватохромизме соединения **1**. Так, сдвиги $\lambda_{\text{макс. погл}}$ при переходе от этанола к *n*-гексану составляют менее 5 нм. Сходные данные наблюдаются и для соответствующих значений $\lambda_{\text{макс. эм}}$. Сдвиги Стокса соединения **1** также слабо зависят от изменения полярности среды и находятся в диапазоне от 19 до 26 нм. Этот факт можно объяснить отсутствием в соединении **1** функциональных групп, способных вступать во взаимодействие с растворителем

и значительно влиять на дипольный момент молекулы в различных электронных состояниях, формируя при этом возбужденные состояния, чувствительные к полярности среды, например возбужденное состояние с переносом заряда [12]. Это также согласуется со сходностью формы спектров поглощения и эмиссии флуоресценции соединения **1**. Отсутствие выраженных сольватохромных эффектов позволяет не учитывать полярность используемой среды и упрощает применение производного соединения **1** в качестве молекулярного инструмента определения вязкости среды, а также специфических белок-лигандных взаимодействий.

Для оценки влияния вязкости микроокружения на оптические свойства соединения **1** изучали параметры эмиссии флуоресценции соединения **1** в системах этанол – глицерин различных мольных соотношений. На рис. 3 изображены некоторые рассмотренные растворы соединения **1** в системе этанол – глицерин с различной мольной долей глицерина.

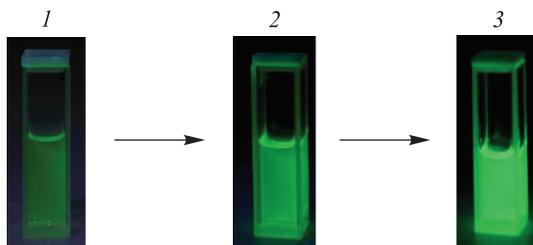


Рис. 3. Растворы соединения **1** в системе этанол – глицерин с различной мольной долей глицерина:
 $\chi = 0$ (1); $\chi = 0,45$ (2); $\chi = 1$ (3)

Fig. 3. Solutions of compound **1** in ethanol – glycerol mixtures with different glycerol mole fractions:
 $\chi = 0$ (1); $\chi = 0.45$ (2); $\chi = 1$ (3)

Полученные спектры эмиссии флуоресценции растворов соединения **1** (рис. 4, а) свидетельствуют о значительном росте интенсивности флуоресценции ($I_{\text{фл}}$) по мере увеличения вязкости среды. Вместе с тем изменение интенсивности флуоресценции нелинейно зависит от мольной доли глицерина в смеси. Так, увеличение мольной доли глицерина от 0 до 0,45 приводит к росту интенсивности флуоресценции в 3 раза. В чистом глицерине интенсивность флуоресценции увеличивается в 27 раз относительно интенсивности флуоресценции соединения **1** в этаноле.

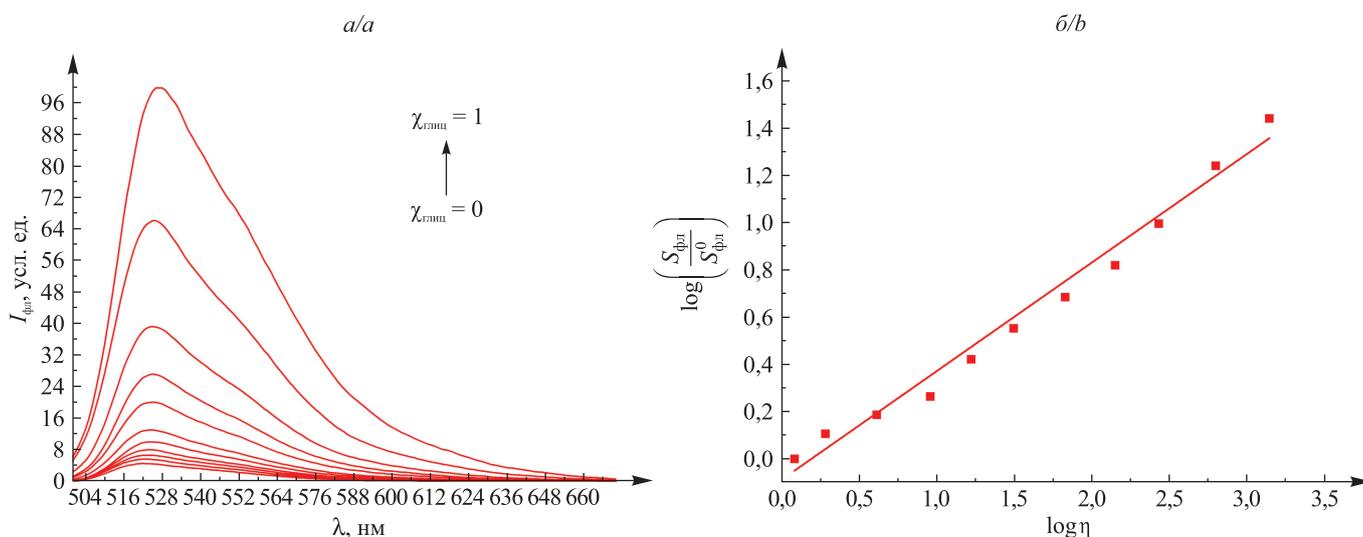


Рис. 4. Спектры эмиссии флуоресценции соединения **1** в системах этанол – глицерин различных соотношений (а) и зависимость десятичного логарифма отношения $\frac{S_{\text{фл}}}{S_{\text{фл}}^0}$ от десятичного логарифма вязкости (η) среды (б)

Fig. 4. Emission spectra of compound **1** in different ethanol – glycerol mixtures (а) and the $\frac{S_{\text{фл}}}{S_{\text{фл}}^0}$ ratio decimal logarithm dependence on the medium viscosity value (η) decimal logarithm (b)

Вследствие того, что для соединения **1** сольватохромные эффекты выражены крайне слабо, зависимость интенсивности эмиссии флуоресценции от вязкости системы может быть количественно описана уравнением Хоффмана – Фёрстера [46]:

$$\log \left(\frac{S_{\text{фл}}}{S_{\text{фл}}^0} \right) = C + x \log \eta, \quad (1)$$

где $S_{\text{фл}}$ – площадь под кривой эмиссии флуоресценции исследуемых растворов соединения **1**; $S_{\text{фл}}^0$ – площадь под кривой эмиссии флуоресценции стандартного раствора соединения **1** в этаноле; C и x – зависящие от растворителя и ФМР константы; η – вязкость среды.

На основе уравнения (1) построили график зависимости логарифма изменения площади под кривой эмиссии флуоресценции соединения **1** от логарифма вязкости среды (рис. 4, б). Полученная зависимость является линейной в широком интервале вязкостей изучаемых сред и характеризуется коэффициентом корреляции $R^2 = 0,985$. Тангенс угла наклона полученного графика равен 0,49 и соответствует величине чувствительности флуоресценции соединения **1** к изменению вязкости окружения. Результаты хорошо коррелируют с литературными данными для подобных соединений и дополнительно подтверждают преимущественное влияние именно вязкости среды на эмиссию флуоресценции соединения **1** и незначительную роль полярности среды [47]. Полученные данные делают перспективным дальнейшее изучение зависимости флуоресцентных свойств соединения **1** от вязкости окружения в клеточных и других средах, а также применение соединения **1** в качестве сенсора микровязкости его окружения.

Так как параметры эмиссии флуоресценции соединения **1** значительно зависят от вязкости среды и слабо зависят от изменения ее полярности, данное соединение может использоваться в качестве флуорогенного сенсора реализации белок-лигандных взаимодействий. Фиксация структуры флуорофора в центре связывания белка за счет различных нековалентных взаимодействий с его аминокислотным окружением может воспроизводить эффект увеличения вязкости микроокружения молекул соединения. Аналогично изменению вязкости среды за счет изменения состава растворителя белок-лигандные взаимодействия должны оказывать влияние на оптические свойства исследуемого BODIPY-ФМР. В связи с этим методом прямого титрования оценивали возможность применения соединения **1** как флуорогенного сенсора белок-лигандных взаимодействий. Для этого в качестве модельного белка использовали БСА, являющийся одним из наиболее распространенных белков плазмы крови млекопитающих и отвечающий за многие биохимические процессы, в том числе за транспортную функцию [48]. В качестве аналитического сигнала в процессе титрования детектировалось увеличение площади под кривой эмиссии флуоресценции растворов соединения **1**. Полученные спектры эмиссии флуоресценции растворов соединения **1** после добавления различного количества эквивалентов БСА свидетельствуют об усилении интенсивности флуоресценции соединения **1** с увеличением концентрации БСА (рис. 5). Так, после добавления четырех эквивалентов БСА наблюдается рост интенсивности максимума эмиссии флуоресценции соединения **1** в 3,5 раза по сравнению с исходной величиной. Длина волны максимума эмиссии флуоресценции при этом претерпевает несущественный батохромный сдвиг, что согласуется с вышеописанными сольватохромными свойствами соединения **1**.

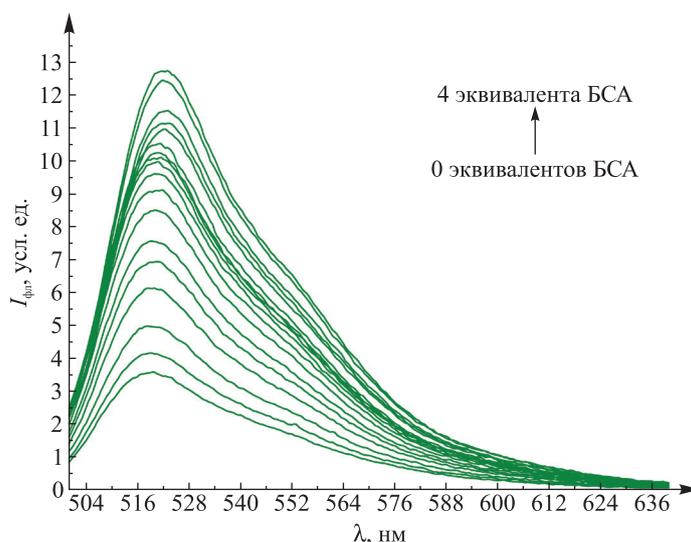


Рис. 5. Спектры эмиссии флуоресценции растворов соединения **1** после добавления различных количеств эквивалентов БСА

Fig. 5. Emission spectra of compound **1** after addition of a different amounts of bovine serum albumin equivalents

Для определения возможных сайтов связывания флуорофора БСА применяли метод молекулярного докинга. Так, наибольшая аффинность соединения **1** наблюдается для двух сайтов связывания – Судлоу I (C1) и Судлоу II (C2) – бычьего сывороточного альбумина. Значения свободных энергий связывания соединения **1** в соответствующих активных центрах БСА составили $-9,4$ и $-8,5$ ккал/моль. Сайты C1 и C2 отвечают за связывание различных гидрофобных молекул и за транспорт БСА таких лекарственных препаратов и биологически активных соединений, как варфарин, гидроксихинолин, производные нафталимида и т. д. [49; 50]. Графическое изображение локализации соединения **1** в сайтах связывания C1 и C2 бычьего сывороточного альбумина представлено на рис. 6 и 7. В случае локализации соединения **1** в C1 ближайшее окружение фенильного заместителя флуорофора составляют остатки таких неполярных аминокислот, как TYR149, LEU259. Фрагмент BF_2 соединения **1** стабилизирован водородной связью между гуанидиновым фрагментом остатка ARG217 и атомами фтора соединения **1**. При локализации флуорофора в C2 ближайшее гидрофобное аминокислотное окружение составляют PHE133, TYR160, ILE181 и LEU115, аналогично стабилизирующие связывание соединения **1** с БСА.

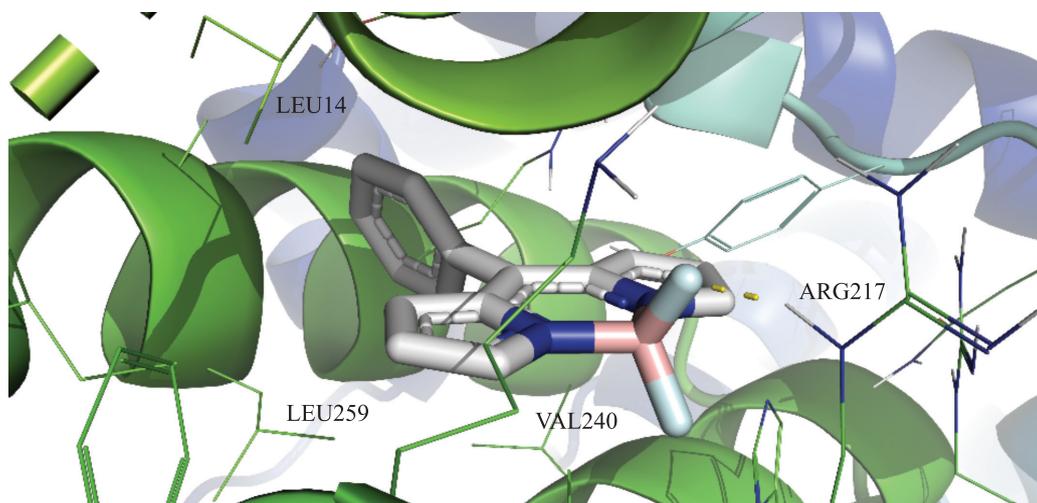


Рис. 6. Рассчитанная локализация соединения **1** в активном центре C1 бычьего сывороточного альбумина и его ближайшее аминокислотное окружение

Fig. 6. Calculated localisation of compound **1** in the C1 active site of bovine serum albumin and its' closest amino acid surrounding

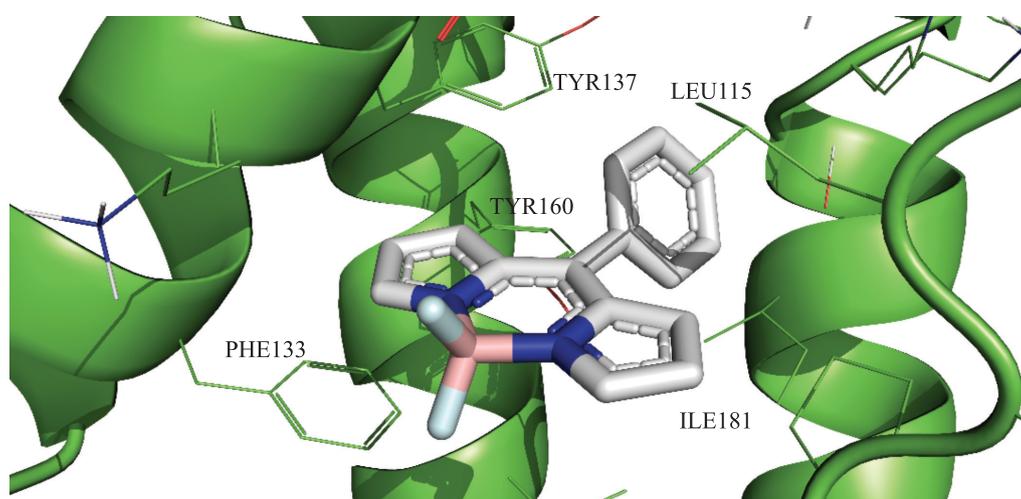


Рис. 7. Рассчитанная локализация соединения **1** в активном центре C2 бычьего сывороточного альбумина и его ближайшее аминокислотное окружение

Fig. 7. Calculated localisation of compound **1** in the C2 active site of bovine serum albumin and its' closest amino acid surrounding

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о наличии зависимости оптических свойств соединения **1**, в частности интенсивности флуоресценции и квантового выхода флуоресценции от вязкости его окружения. Показано, что увеличение вязкости системы при переходе из среды этанола в среду глицерина приводит к 27-кратному увеличению интенсивности флуоресценции соединения **1**. Обнаруженная линейная зависимость десятичных логарифмов $\frac{S_{\text{фл}}}{S_{\text{фл}}^0}$ от соответствующих десятичных логарифмов η наблюдается во всем диапазоне изучаемых вязкостей и согласуется с теорией Хоффмана – Фёрстера. Вместе с тем сольватохромные эффекты для соединения **1** выражены слабо, что делает его удобным BODIPY-ФМР для изучения изменения вязкости сред и в перспективе микровязкости в живых системах. Впервые для соединения **1** экспериментально представлена возможность аффинного связывания с БСА, также сопровождающаяся увеличением интенсивности флуоресценции соединения **1**. Методом молекулярного докинга показано, что вероятными сайтами связывания соединения **1** являются C1 и C2, ответственные за связывание белком многих значимых липофильных биологически активных соединений. Рассчитанные значения соответствующих свободных энергий связывания при этом составили –9 и –8 ккал/моль соответственно. Полученные данные указывают на перспективу развития способов использования таких BODIPY-ФМР в качестве сенсоров изменения вязкостных характеристик сред и реализации белок-лигандных взаимодействий.

Библиографические ссылки / References

1. Pratt A, Garcia-Effron G, Zhao Y, Park S, Mustaev A, Pillai S, et al. Evaluation of fungal-specific fluorescent labeled echinocandin probes as diagnostic adjuncts. *Medical Mycology*. 2013;51(1):103–107. DOI: 10.3109/13693786.2012.685767.
2. Sameiro M, Gonçalves T. Fluorescent labeling of biomolecules with organic probes. *Chemical Reviews*. 2009;109(1):190–212. DOI: 10.1021/Cr0783840.
3. Faletrov YV, Efimova VS, Horetski MS, Tugaeva KV, Frolova NS, Lin Q, et al. New 20-hydroxycholesterol-like compounds with fluorescent NBD or alkyne labels: synthesis, *in silico* interactions with proteins and uptake by yeast cells. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2020;227:104850. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2019.104850.
4. Horetski MS, Faletrov YV, Rudaya EV, Shkumatov VM. Fluorescent BODIPY dyes as ligands for major steroidogenic proteins: *in silico* evaluation. *Journal of the Belarusian State University. Chemistry*. 2018;1:22–27.
5. Hölttä-Vuori M, Uronen R-L, Repakova J, Salonen E, Vattulainen I, Panula P, et al. BODIPY-cholesterol: a new tool to visualize sterol trafficking in living cells and organisms. *Traffic*. 2008;9(11):1839–1849. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2008.00801.x.
6. Gee KR, Kang HC, Meier TI, Zhao G, Blaszcak LC. Fluorescent Bocillins: synthesis and application in the detection of penicillin-binding proteins. *Electrophoresis*. 2001;22(5):960–965. DOI: 10.1002/1522-2683(200105)22:5<960::AID-ELPS960>3.0.CO;2-9.
7. Masson JM, Labia R. Synthesis of a ¹²⁵I-radiolabeled penicillin for penicillin-binding proteins studies. *Analytical Biochemistry*. 1983;128(1):164–168. DOI: 10.1016/0003-2697(83)90357-3.
8. Preston DA, Wu CY, Blaszcak LC, Seitz DE, Halligan NG. Biological characterization of a new radioactive labeling reagent for bacterial penicillin-binding proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1990;34(5):718–721. DOI: 10.1128/aac.34.5.718.
9. Guterres MFAN, Ronconi CM. Máquinas moleculares artificiais. *Revista Virtual de Química*. 2009;1(2):104–116. DOI: 10.5935/1984-6835.20090013.
10. Kottas GS, Clarke LI, Horinek D, Michl J. Artificial molecular rotors. *Chemical Reviews*. 2005;105(4):1281–1376. DOI: 10.1021/Cr0300993.
11. Kung CE, Reed JK. Fluorescent molecular rotors: a new class of probes for tubulin structure and assembly. *Biochemistry*. 1989;28(16):6678–6686. DOI: 10.1021/Bi00442a022.
12. Uzhinov BM, Ivanov VL, Melnikov MYa. Molecular rotors as luminescence sensors of local viscosity and viscous flow in solutions and organized systems. *Russian Chemical Reviews*. 2011;80(12):1179–1190. DOI: 10.1070/Rc2011v080n12abeh004246.
13. Zubenko GS, Kopp U, Seto T, Firestone LL. Platelet membrane fluidity individuals at risk for Alzheimer's disease: a comparison of results from fluorescence spectroscopy and electron spin resonance spectroscopy. *Psychopharmacology*. 1999;145(2):175–180. DOI: 10.1007/S002130051046.
14. Nativ O, Shinitzky M, Manu H, Hecht D, Roberts CT, LeRoith D, et al. Elevated protein tyrosine phosphatase activity and increased membrane viscosity are associated with impaired activation of the insulin receptor kinase in old rats. *Biochemical Journal*. 1994;298(2):443–450. DOI: 10.1042/Bj2980443.
15. Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides JC. Modulation of particulate nitric oxide synthase activity and peroxynitrite synthesis in cholesterol enriched endothelial cell membranes. *Biochemical Pharmacology*. 1995;49(11):1589–1600. DOI: 10.1016/0006-2952(95)00094-G.
16. Haidekker MA, Theodorakis EA. Environment-sensitive behavior of fluorescent molecular rotors. *Journal of Biological Engineering*. 2010;4:11. DOI: 10.1186/1754-1611-4-11.
17. Ziaunys M, Sakalauskas A, Smirnovas V. Identifying insulin fibril conformational differences by thioflavin T binding characteristics. *Biomacromolecules*. 2020;21(12):4989–4997. DOI: 10.1021/Acs.Biomac.0c01178.
18. Amdursky N, Erez Y, Huppert D. Molecular rotors: what lies behind the high sensitivity of the thioflavin T fluorescent marker. *Accounts of Chemical Research*. 2012;45(9):1548–1557. DOI: 10.1021/Ar300053p.

19. Maskevich AA, Stsiapura VI, Kuzmitsky VA, Kuznetsova IM, Povarova OI, Uversky VN, et al. Spectral properties of thioflavin T in solvents with different dielectric properties and in a fibril-incorporated form. *Journal of Proteome Research*. 2007;6(4):1392–1401. DOI: 10.1021/Pr0605567.
20. Kamkaew A, Lim SH, Lee HB, Kiew LV, Chung LY, Burgess K. BODIPY dyes in photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews*. 2013;42(1):77–88. DOI: 10.1039/C2cs35216h.
21. Miao W, Yu C, Hao E, Jiao L. Functionalized BODIPYs as fluorescent molecular rotors for viscosity detection. *Frontiers in Chemistry*. 2019;7:825. DOI: 10.3389/Fchem.2019.00825.
22. Boens N, Leen V, Dehaen W. Fluorescent indicators based on BODIPY. *Chemical Society Reviews*. 2012;41(3):1130–1172. DOI: 10.1039/C1cs15132k.
23. Yang Z, He Y, Lee JH, Park N, Suh M, Chae WS, et al. A self-calibrating bipartite viscosity sensor for mitochondria. *Journal of the American Chemical Society*. 2013;135(24):9181–9185. DOI: 10.1021/JA403851P.
24. Su D, Teoh CL, Gao N, Xu Q-H, Chang Y-T. A simple BODIPY-based viscosity probe for imaging of cellular viscosity in live cells. *Sensors*. 2016;16(9):1397. DOI: 10.3390/S16091397.
25. Kashirina AS, López-Duarte I, Kubánková M, Gulin AA, Dudenkova VV, Rodimova SA, et al. Monitoring membrane viscosity in differentiating stem cells using BODIPY-based molecular rotors and FLIM. *Scientific Reports*. 2020;10(1):14063. DOI: 10.1038/S41598-020-70972-5.
26. Marfin YuS, Aleksakhina EL, Merkushev DA, Rummyantsev EV, Tomilova IK. Interaction of BODIPY dyes with the blood plasma proteins. *Journal of Fluorescence*. 2016;26(1):255–261. DOI: 10.1007/S10895-015-1707-X.
27. Vodyanova OS, Kochergin BA, Usoltsev SD, Marfin YuS, Rummyantsev EV, Aleksakhina EL, et al. BODIPY dyes in bio environment: spectral characteristics and possibilities for practical application. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2018;350:44–51. DOI: 10.1016/J.jphotochem.2017.09.049.
28. Dzyuba SV. BODIPY dyes as probes and sensors to study amyloid- β -related processes. *Biosensors*. 2020;10(12):192. DOI: 10.3390/Bios10120192.
29. Kubánková M, López-Duarte I, Bull JA, Vadukul DM, Serpell LC, de Saint Victor M, et al. Probing supramolecular protein assembly using covalently attached fluorescent molecular rotors. *Biomaterials*. 2017;139:195–201. DOI: 10.1016/J.biomaterials.2017.06.009.
30. Tiwari R, Shinde PS, Sreedharan S, Dey AK, Vallis KA, Mhaske SB, et al. Photoactivatable prodrug for simultaneous release of mertansine and CO along with a BODIPY derivative as a luminescent marker in mitochondria: a proof of concept for NIR image-guided cancer therapy. *Chemical Science*. 2021;12(7):2667–2673. DOI: 10.1039/D0sc06270g.
31. Testolin G, Cirsni K, Rox K, Prochnow H, Fetz V, Grandclaudon C, et al. Synthetic studies of cystobactamids as antibiotics and bacterial imaging carriers lead to compounds with high *in vivo* efficacy. *Chemical Science*. 2020;11(5):1316–1334. DOI: 10.1039/C9sc04769g.
32. Adhikari S, Moscatelli J, Smith EM, Banerjee C, Puchner EM. Single-molecule localization microscopy and tracking with red-shifted states of conventional BODIPY conjugates in living cells. *Nature Communications*. 2019;10(1):3400. DOI: 10.1038/S41467-019-11384-6.
33. Guan Q, Fu D-D, Li Y-A, Kong X-M, Wei Z-Y, Li W-Y, et al. BODIPY-decorated nanoscale covalent organic frameworks for photodynamic therapy. *iScience*. 2019;14:180–198. DOI: 10.1016/J.isci.2019.03.028.
34. Sun S, Zhuang X, Wang L, Liu B, Zhang B, Chen Y. BODIPY-based conjugated polymer covalently grafted reduced graphene oxide for flexible nonvolatile memory devices. *Carbon*. 2017;116:713–721. DOI: 10.1016/J.carbon.2017.02.034.
35. Adamo C, Barone V. Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: the PBE0 model. *Journal of Chemical Physics*. 1999;110(13):6158–6170. DOI: 10.1063/1.478522.
36. Tsuzuki S, Uchimaru T. Accuracy of intermolecular interaction energies, particularly those of hetero-atom containing molecules obtained by DFT calculations with Grimme's D2, D3 and D3BJ dispersion corrections. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2020;22(39):22508–22519. DOI: 10.1039/D0cp03679j.
37. Weigend F, Ahlrichs R. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: design and assessment of accuracy. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2005;7(18):3297–3305. DOI: 10.1039/B508541A.
38. Neese F. The ORCA program system. *WIREs Computational Molecular Science*. 2012;2(1):73–78. DOI: 10.1002/Wcms.81.
39. Neese F. Software update: the ORCA program system, version 4.0. *WIREs Computational Molecular Science*. 2018;8(1):e1327. DOI: 10.1002/Wcms.1327.
40. Allouche A-R. Gabedit – a graphical user interface for computational chemistry softwares. *Journal of Computational Chemistry*. 2011;32(1):174–182. DOI: 10.1002/jcc.21600.
41. Wagner RW, Lindsey JS. Boron-dipyrromethene dyes for incorporation in synthetic multi-pigment light-harvesting arrays. *Pure and Applied Chemistry*. 1996;68(7):1373–1380. DOI: 10.1351/Pac199668071373.
42. Würth C, Grabolle M, Pauli J, Spieles M, Resch-Genger U. Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples. *Nature Protocols*. 2013;8(8):1535–1550. DOI: 10.1038/NPROT.2013.087.
43. Alkindi AS, Al-Wahaibi YM, Muggeridge AH. Physical properties (density, excess molar volume, viscosity, surface tension, and refractive index) of ethanol + glycerol. *Journal of Chemical and Engineering Data*. 2008;53(12):2793–2796. DOI: 10.1021/Je8004479.
44. Amorim VG, Melo SMG, Leite RF, Coutinho PA, da Silva SMP, Silva AR, et al. Synthesis and characterization of two novel red-shifted isothiocyanate BODIPYs and their application in protein conjugation. *Dyes and Pigments*. 2020;182:108646. DOI: 10.1016/J.dyepig.2020.108646.
45. Giernoth R. Solvents and solvent effects in organic chemistry. 4th ed. by Christian Reichardt and Thomas Welton [book review]. *Angewandte Chemie International Edition*. 2011;50(48):11289. DOI: 10.1002/anie.201105531.
46. Lee S-C, Heo J, Woo HC, Lee J-A, Seo YH, Lee C-L, et al. Fluorescent molecular rotors for viscosity sensors. *Chemistry – A European Journal*. 2018;24(52):13706–13718. DOI: 10.1002/Chem.201801389.

47. Liu X, Chi W, Qiao Q, Kokate SV, Cabrera EP, Xu Z, et al. Molecular mechanism of viscosity sensitivity in BODIPY rotors and application to motion-based fluorescent sensors. *ACS Sensors*. 2020;5(3):731–739. DOI: 10.1021/Acscensors.9b01951.
48. Aguilera-Garrido A, del Castillo-Santaella T, Yang Y, Galisteo-González F, Gálvez-Ruiz MJ, Molina-Bolívar JA, et al. Applications of serum albumins in delivery systems: differences in interfacial behaviour and interacting abilities with polysaccharides. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2021;290:102365. DOI: 10.1016/J.Cis.2021.102365.
49. Abou-Zied OK, Al-Lawatia N. Exploring the drug-binding site Sudlow I of human serum albumin: the role of water and Trp214 in molecular recognition and ligand binding. *ChemPhysChem*. 2011;12(2):270–274. DOI: 10.1002/Cphc.201000742.
50. Joshi R, Jadhao M, Kumar H, Ghosh SK. Is the Sudlow site I of human serum albumin more generous to adopt prospective anti-cancer bioorganic compound than that of bovine: a combined spectroscopic and docking simulation approach. *Bioorganic Chemistry*. 2017;75:332–346. DOI: 10.1016/J.Bioorg.2017.10.013.

Получена 21.10.2021 / исправлена 09.12.2021 / принята 09.12.2021.
Received 21.10.2021 / revised 09.12.2021 / accepted 09.12.2021.