

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
імені В. Н. Каразіна

**Кафедра органічної хімії**

УДК : 547.8 + 577.336

*До захисту допускаю*

\_\_\_\_\_ Завідувач кафедри  
« \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 р. д.х.н., проф. А. О. Дорошенко

СИНТЕЗ ТА СПЕКТРАЛЬНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНІ ВЛАСТИВОСТІ НОВИХ  
ГІДРОФОБНО-МОДИФІКОВАНИХ ПОХІДНИХ ФЛАВОНОЛУ

Кваліфікаційна робота магістра  
II курсу хімічного факультету  
СНІЖКА АРСЕНІЯ ДМИРОВИЧА

Науковий керівник

д.х.н., с.н.с.

О.В. Кириченко

ХАРКІВ 2024

## РЕФЕРАТ

Флуоресцентні зонди на основі флавонолу є перспективними для використання у медико-біологічних дослідженнях. Функціоналізація флавонолів за рахунок введення якірних груп підвищує їх селективність та спорідненість при нековалентному зв'язуванні з досліджуваними біологічними об'єктами. З цією метою в роботі проведено синтез флуоресцентних барвників на основі 3-гідрокси-4Н-хромен-4-ону, які містять у 4'-положенні бензольного кільця гідрофобні алкільні радикали різної довжини.

Досліджено спектрально-флуоресцентні властивості синтезованих сполук у розчинниках різної природи. З використанням флуоресцентної спектроскопії, молекулярного докінгу та молекулярно-динамічного моделювання досліджено взаємодію синтезованих флавонолів з ферментом  $\beta$ -глюкозидазою. Показано, що введення гідрофобних алкільних радикалів забезпечує більш ефективне зв'язування з молекулою білка, що є перспективним для розробки нових інгібіторів  $\beta$ -глюкозидази. Продемонстровано використання функціоналізованих флавонолів для дослідження розчинів полівінілпіролідону.

Отримані модельні та цільові сполуки – похідні 3-гідрокси-4Н-хромен-4-он-2-алкоксикарбонових кислот мають синтетичний потенціал для подальшої їх модифікації шляхом введення в молекулу барвника функціональних та якірних груп (-ОН, -SH, -NH<sub>2</sub>).

Кваліфікаційна робота викладена на 51 аркушах, містить 2 розділи, 17 рисунків, 3 таблиці та 116 літературних джерел.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** флавонол,  $\beta$ -глюкозидаза, полівінілпіролідон, флуоресценція, молекулярний докінг, МД моделювання

## ABSTRACT

Fluorescent probes based on flavonol are promising for use in medical and biological research. Functionalization of flavonols due to the introduction of anchor groups increases their selectivity and affinity during non-covalent binding to the studied biological objects. For this purpose, the work carried out the synthesis of fluorescent dyes based on 3-hydroxy-4H-chromen-4-one, which contain hydrophobic alkyl radicals of different lengths in the 4'-position of the benzene ring.

The spectral-fluorescence properties of the synthesized compounds in solvents of different nature were investigated. Interaction of synthesized flavonols with  $\beta$ -glucosidase enzyme was investigated using fluorescence spectroscopy, molecular docking and molecular dynamic modeling. It has been shown that the introduction of hydrophobic alkyl radicals provides more effective binding to the protein molecule, which is promising for the development of new  $\beta$ -glucosidase inhibitors. The use of functionalized flavonols for the study of polyvinylpyrrolidone solutions has been carried out.

The obtained model and target compounds - derivatives of 3-hydroxy-4H-chromen-4-one-2-alkoxycarboxylic acids have synthetic potential for their further modification by introducing functional and anchor groups (-OH, -SH, -NH<sub>2</sub>) into the dye molecule.

The thesis is presented on 51 pages, contains 2 chapters, 17 pictures, 3 tables and 116 references.

**KEYWORDS:** flavonol,  $\beta$ -glucosidase, polyvinylpyrrolidone, fluorescence, molecular docking, MD simulation.

## ЗМІСТ

ЗМІСТ .....	4
ВСТУП.....	5
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	6
1.1 Синтетичні підходи до флавонолів .....	6
1.2 Особливості флуоресценції флавонолів .....	8
1.3 Використання флавонолів у якості зондів.....	10
1.4 Гідрофобна модифікація зондів.....	12
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	15
2.1 Прилади та матеріали .....	15
2.2 Синтез вихідних сполук .....	15
2.3 Синтез цільових сполук.....	16
2.3.1 Синтез 2-(4-(3-(2-гідроксифеніл)-3-оксопроп-1-ен-1-іл)фенокси)оцтової кислоти ( <b>4a</b> ).....	17
2.3.2 Синтез 6-(4-(3-(2-гідроксифеніл)-3-оксопроп-1-ен-1-іл)фенокси)гексанової кислоти ( <b>4b</b> ).....	17
2.3.3 Синтез 12-(4-(3-(2-гідроксифеніл)-3-оксопроп-1-ен-1- іл)фенокси)додеканової кислоти ( <b>4c</b> ) .....	18
2.3.4 Синтез 2-(4-(3-гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-іл)фенокси)оцтової кислоти ( <b>5a</b> ).....	19
2.3.5 Синтез 6-(4-(3-гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-іл)фенокси)гексанової кислоти ( <b>5b</b> ).....	19
2.3.6 Синтез 12-(4-(3-гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-іл)фенокси)додеканової кислоти ( <b>5c</b> ) .....	20
2.3.7 Синтез 2-(4-(гексилокси)феніл)-3-гідрокси-4Н-хромен-4-ону ( <b>5d</b> ) .....	20
2.3.8 Синтез 2-(4-(додещилокси)феніл)-3-гідрокси-4Н-хромен-4-ону ( <b>5e</b> ).....	21
2.4 Оптимізація методу синтезу та ідентифікація сполук .....	21
2.5 Спектрально-флуоресцентні властивості отриманих сполук.....	24
2.6 Експериментальне дослідження взаємодії зондів з ферментом.....	26
2.7 Моделювання взаємодії зондів з ферментом .....	28
2.8 Дослідження взаємодії зондів з полівінілпіролідом.....	31
2.9 Обговорення результатів .....	35
ВИСНОВКИ.....	39
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ .....	40

## ВСТУП

Флавоноїди представляють собою важливий клас природних сполук, що розповсюджені у рослинах та відомі своєю різноманітністю біологічної активності [1]. Так флавоноїди використовують у медицині для профілактики захворювань серцево-судинної системи, також флавоноїди проявляють антикоагулянтні, протизапальні та протиракові властивості [2–5]. Ці сполуки також відіграють ключову роль у рослинному метаболізмі, функціонуючи як пігменти, антиоксиданти, інгібітори ферментів та ін.

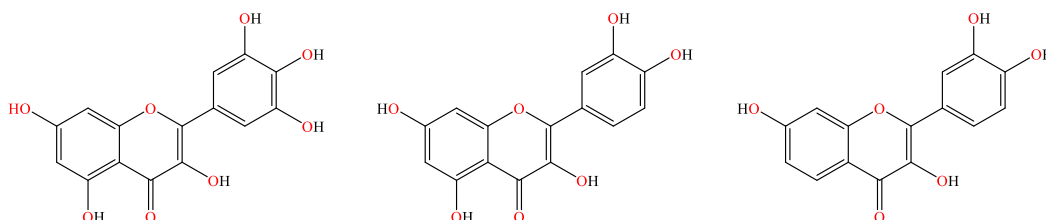


Рисунок 1.1 - Приклади природних флавонолів: міріцетин, кверцетин, фізетин.

Серед сімейства флавоноїдів, завдяки своїм оптичним властивостям вирізняються флавоноли (3-гідроксихромони). Вони є перспективними для використання в якості флуоресцентних зондів для дослідження найрізноманітніших об'єктів, включаючи біологічні об'єкти, такі як ферменти, ліпідні мембрани та клітини.

Тому метою даної роботи є дослідження впливу гідрофобних алкільних радикалів на зв'язування флавонолу з ферментом  $\beta$ -глюкозидазою та полімером полівінілпіролідом.

## ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

## 1.1 Синтетичні підходи до флавонолів

Існує декілька принципово різних підходів до синтезу флавонолів. Найважливішим з них можна назвати підхід з використанням реакції Алгара-Фліна-Оямади (АФО) [6–9]. Цей підхід реалізується двостадійним синтезом: конденсацією бензальдегідів та 2-гідроксиацетофенонів з наступною окислювальною циклізацією під дією пероксиду водню.

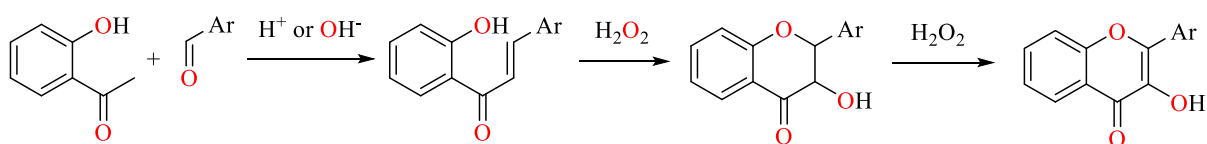


Рисунок 1.2 - Синтез флавонолів за реакцією Алгара-Фліна-Оямади.

Механізм цієї реакції точно не встановлений, але вважають, що реакція може протікати як асистоване пероксидом водню приєднання за Міхаелем або через утворення епоксиду [10–12].

З альтернативних методів можна виділити використання реакції Алана-Робінсона [13]. Даний підхід реалізується взаємодією 2-гідроксиацетофенонів з англідами у присутності основи. Використовуючи в якості реагентів  $\alpha$ -алкокси-2-гідроксиацетофенони та ароматичні англіди можна в одну стадію утворити хромоновий фрагмент. Однак для отримання флавонолів таким методом необхідне подальше кислотне розщеплення продукту.

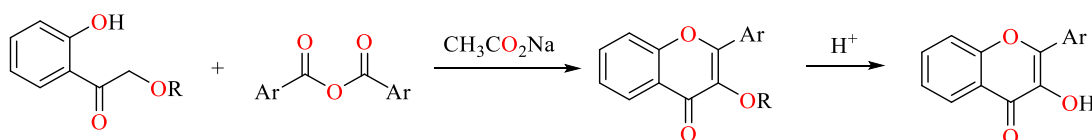


Рисунок 1.3 - Синтез флавонолів за реакцією Алана-Робінсона.

Також можна виділити синтетичну послідовність Ауверса, що складається з конденсації бензофуран-3(2H)-онів з бензальдегідами, бромовання отриманого

продукту та подальшого перегрупування у присутності луку [14–18]. Однак остання реакція цієї послідовності є достатньо чутливою до електронних ефектів замісників, і при наявності донорних замісників часто не приводить до утворення цільових флавонолів [19].

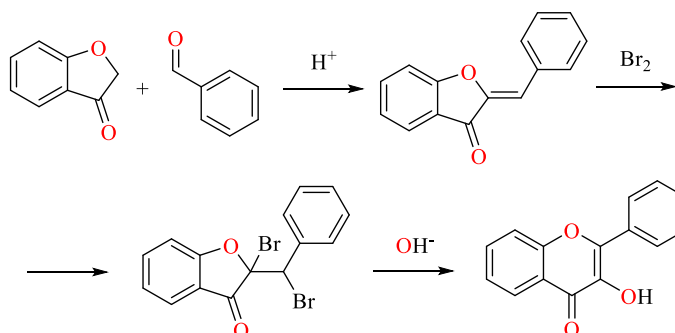


Рисунок 1.4 - Синтез флавонолів за методом Ауверса.

Також можливі синтетичні підходи включають методи отримання флавонолів з інших представників ряду флавоноїдів. Так Е. Вейц та А. Шеффер запропонували отримувати флавоноли шляхом епоксидування флавонів з наступним розкладанням нестійкого проміжного продукту [20,21].

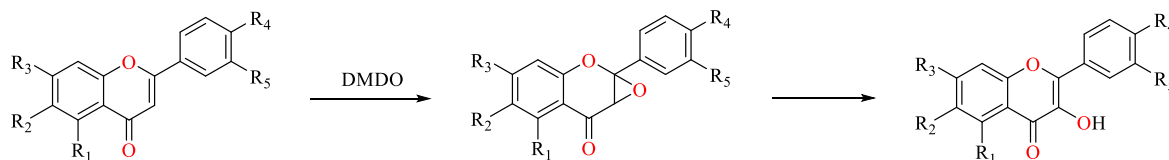


Рисунок 1.5 - Схема перетворення флавонів на флавоноли.

Як інший приклад можна привести нітרוзування флаванонів дією амлінітриту. Подальший гідроліз утвореного продукту дає можливість отримати відповідний флавонол.

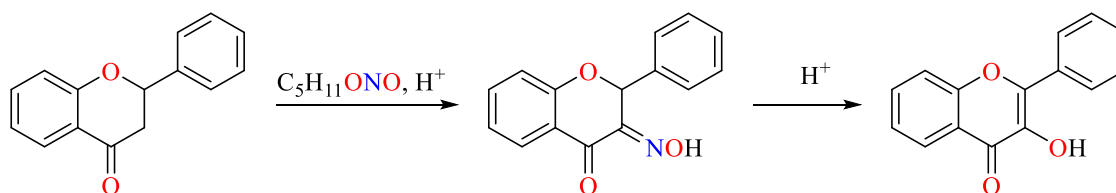


Рисунок 1.6 - Схема перетворення флаванонів на флавоноли.

## 1.2 Особливості флуоресценції флавонолів

Флуоресцентні зонди на основі флавонолу представляють клас барвників, емісійні властивості яких дуже чутливі до їхнього безпосереднього оточення [22–26]. Примітною особливістю цих зондів є наявність гідроксильної групи в 3-му положенні хромонового фрагмента, завдяки чому вони здатні до внутрішньо молекулярного переносу протону у збудженому стані (ESIPT).

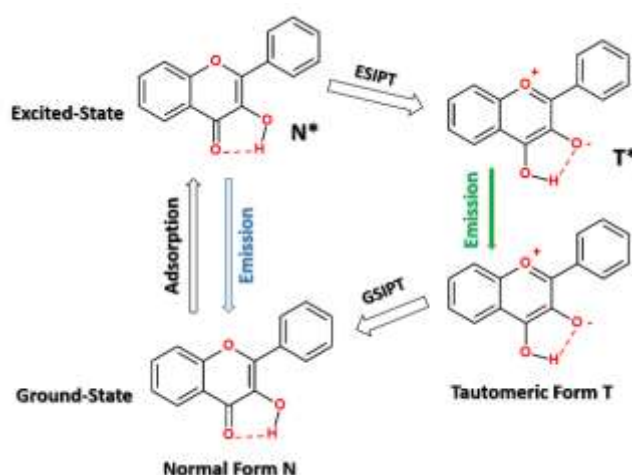


Рисунок 1.7 - Схема фототаутомеризації флавонолу.

Реакція переносу протона відбувається через внутрішньо молекулярний водневий зв'язок, що призводить до надзвичайно швидкої фототаутомеризації ( $10^{-12}$  с) з нормального стану (N\*) у стан таутомера (T\*) [27].

ESIPT призводить до появи достатньо рідкісного явища - двосмугової флуоресценції. Суттєвою перевагою зондів ESIPT є те, що співвідношення інтенсивності їхніх нормальних та таутомерних смуг випромінювання можна регулювати донорними або акцепторними замісниками у молекулі флавонолу.

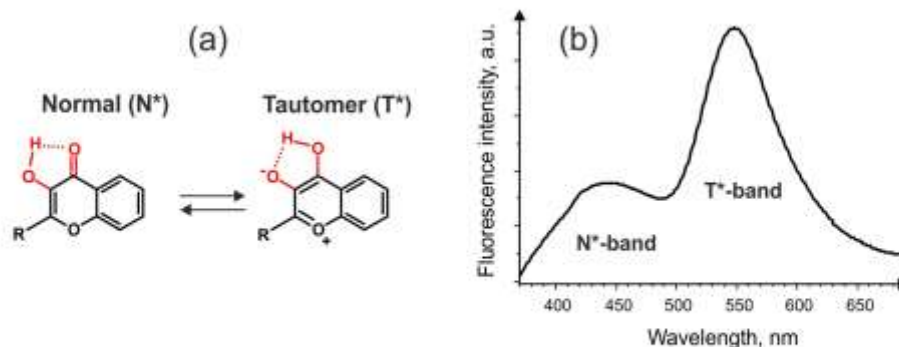


Рисунок 1.8 - Двосмугова флуоресценція флавонолів.

Використання флуоресцентної спектроскопії для дослідження різноманітних об'єктів зазвичай пов'язане з явищем погашення флуоресценції. Таким чином у системі білок-ліганд, задача полягає у аналізі погашення сигналу флуоресценції в присутності різних концентрацій ліганду.

Погашення флуоресценції може бути статичним або динамічним (колізійним) в залежності від характеру взаємодій. При динамічному погашенні флуорофор, який перебуває у збудженому стані, деактивується, повертаючись до основного стану через зіткнення з іншою молекулою, яку називають погашувачем (quencher). З іншого боку, статичне погашення відбувається, шляхом утворення комплексу, який знаходиться у основному стані або не здатний до флуоресценції. Механізм погашення можна встановити за допомогою температурного експерименту [28].

Кількісно динамічне погашення флуоресценції добре описується теоріями Форстера та Декстера [29,30]. За теорією Форстера передача енергії від збудженої молекули (донора) до погашувача (акцептора) відбувається через диполь-дипольну взаємодію [29]. Погашення флуоресценції за моделлю Форстера є більш далекодіючим (до 100 Å), сильно залежить від взаємної орієнтації донора і акцептора та спадає пропорційно  $r^{-6}$ , де  $r$  - відстань між донором і акцептором. З іншого боку, за теорією Декстера, передача енергії відбувається завдяки перекриттю молекулярних орбіталей донора і акцептора при їх зіткненні, а ефективність передачі спадає експоненційно ( $e^{-r}$ ) [30–34].

Але існують й інші шляхи погашення флуоресценції, наприклад, утворення водневих зв'язків з молекулами розчинника. В літературі, на прикладі 1H-Піроло-[3,2-h]-хіноліну було показано, що флуорофори, які можуть бути одночасно донорами та акцепторами водневого зв'язку, у присутності полярних протонних

розчинників зазнають фототаутомеризації та значного погашення флуоресценції [35–38]. Подібне явище спостерігається і для флавонолів.

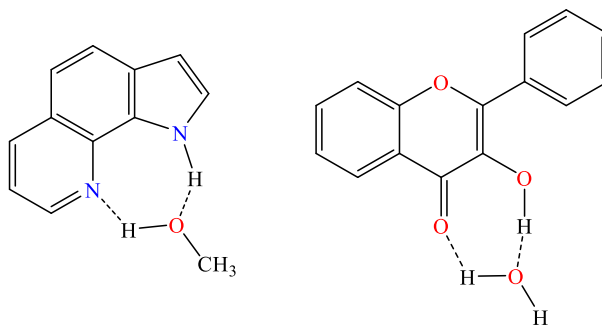


Рисунок 1.9 - Утворення водневих зв'язків флуоресцентних зондів з молекулами протонних розчинників.

### 1.3 Використання флавонолів у якості флуоресцентних зондів

Тривалість випромінювання, квантовий вихід та співвідношення інтенсивності нормальних та таутомерних смуг випромінювання флавонолів сильно залежать від властивостей навколишнього середовища [22,39]. Зонди на основі флавонолу використовувалися як чутливі до навколишнього середовища флуорофори для моніторингу полярності розчинника і рН, визначення слідів води в органічних розчинниках, а також як чутливі флуоресцентні індикатори для визначення іонів металів: алюмінію, свинцю, ртуті, цинку, заліза, міді і паладію [40–46].

Унікальні оптичні властивості та біосумісність роблять флавоноли перспективним флуоресцентним зондом для вивчення структури амфіфільних полімерів та біомакромолекул [47]. Значний «turn-on» ефект спостерігався при селективному зв'язуванні флавонолів до деяких білків, таких як лізоцими та альбуміни [48,49]. Під «turn-on» ефектом у літературі мається на увазі підвищення інтенсивності флуоресценції під час взаємодії зонду з об'єктом дослідження, і, навпаки, гасіння флуоресценції називають «turn-off» ефектом [50].

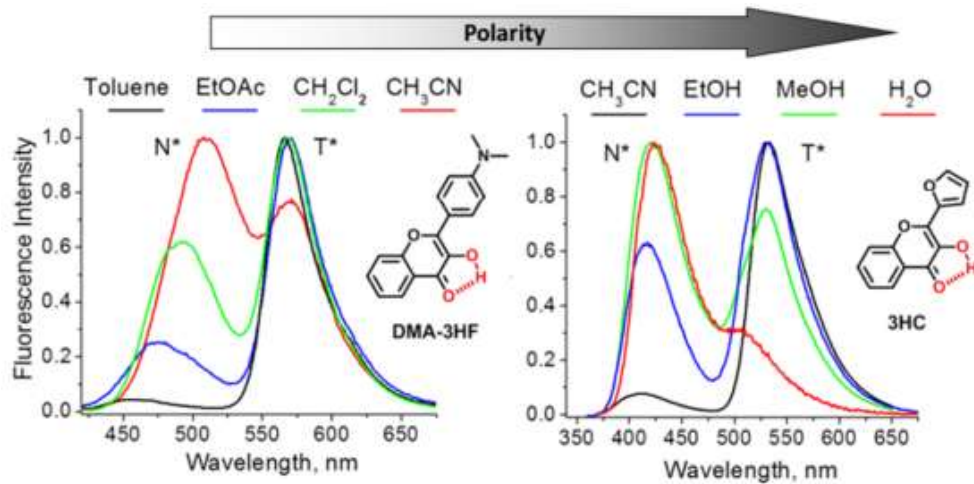


Рисунок 1.10 - Залежність флуоресценції флавонолів від полярності розчинника [51].

Крім того, зонди на основі флавонолів продемонстрували низький вплив на структуру ліпідної мембрани, тому деякі флавоноли були використані для флуоресцентних зображень клітин [52–55].

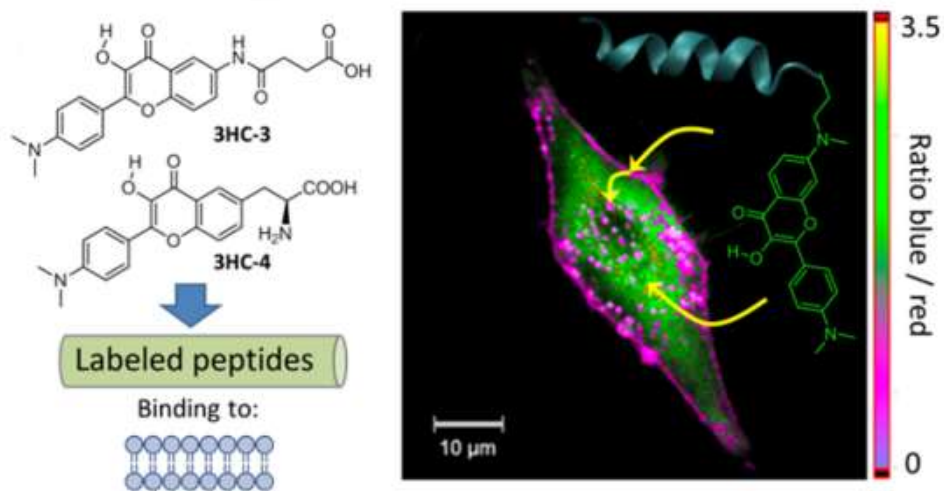


Рисунок 1.11 - Використання флавонолів для флуоресценто-мікроскопічних досліджень [55].

Нещодавно було продемонстровано, що зонди на основі флавонолу, такі як 4'-фторфлавонол  $\beta$ -D-глюкопіранозид, можна використовувати як флуоресцентний індикатор активності  $\beta$ -глюкозидази [56,57].

$\beta$ -Глюкозидази є сімейством ферментів гідролаз, які каталізують гідроліз арил- і алкіл- $\beta$ -D-глюкозидів і целобіоз.  $\beta$ -глюкозидази присутні в рослинах, грибах, тваринах і бактеріях. Крім того, ці ферменти є перспективними реагентами в різних біотехнологічних процесах, оскільки вони можуть каталізувати гідроліз багатьох штучних субстратів при виробництві біопалива та розщепленні олігосахаридів [58].

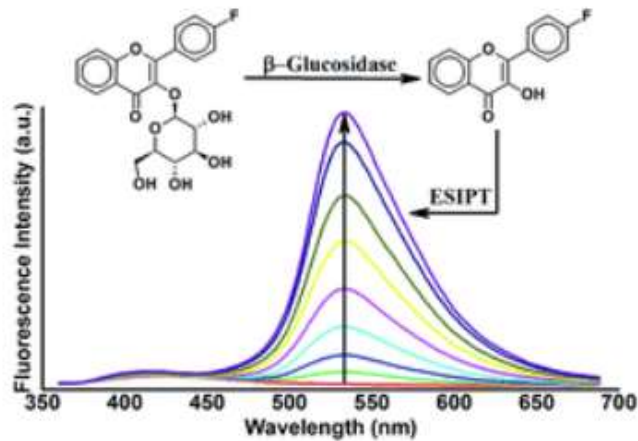


Рисунок 1.12 - Флуоресцентне визначення активності  $\beta$ -глюкозидази [56].

Регулювання активності  $\beta$ -глюкозидази відіграє ключову роль у лікуванні хвороби Гоше та ефективності хіміотерапії раку молочної залози [59,60]. Тому багато інгібіторів глікозидази були виділені з природних джерел або синтезовані для оптимізації їх інгібіторної дії [61–64].

Інгібування каталітичної активності ферментів глікозидаз має великий потенціал для розробки високоефективних і специфічних ліків проти таких захворювань, як діабет, рак, та вірусні інфекції [65,66].

#### 1.4 Гідрофобна модифікація зондів

Гідрофобна модифікація флуоресцентних зондів часто використовується для дослідження структури, локальної полярності та динамічної поведінки біологічних мембран [67]. Наприклад, зонди Prodan та Laurdan були використані для

дослідження локальної в'язкості та полярності ліпідного бішару, а також для визначення вмісту холестерину в живих клітинах [68–74]. Іншим прикладом є використання гідрофобно модифікованого триптофану (ТОЕ) для дослідження взаємодії білків з мембранами [75–77].

Використання жирних алкільних радикалів для гідрофобної модифікації є гарною альтернативою до гідрофобних ароматичних флуорофорів таких як пірен, 1,6-дифеніл-1,3,5-гексатриен, 8-анілінонафталін-1-сульфонат для дослідження структури білків, оскільки їх енергія зв'язування та орієнтація регулюється довжиною та розгалудженістю алкільного радикалу [78,79].

Так для флуоресцентних зондів NBD-С<sub>n</sub> з алкільними радикалами різної довжини (n = 4, 8, 12, 16) було досліджено взаємодію з бичачим сироватковим альбуміном у водному розчині. Було встановлено, що енергія зв'язування лінійно збільшується зі зростанням довжини алкільного радикалу [80]. Також ці зонди були використані для дослідження структури та проникнення ліпідних мембран [81,82].

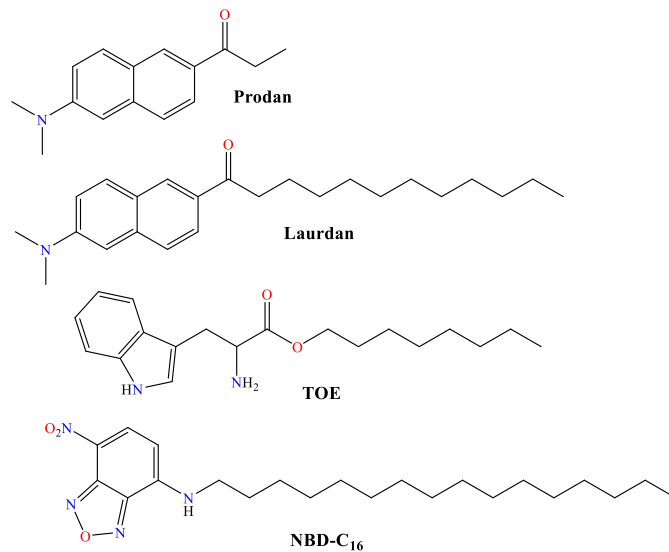


Рисунок 1.13 - Гідрофобно модифіковані флуоресцентні зонди.

В літературі також зустрічається подібна гідрофобна модифікація флавонолів і такі зонди показують непогану селективність та чутливість до різних біологічних об'єктів. Наприклад, зонд F8N1S виявився чутливим до дипольних і трансмембранних потенціалів ліпідних бішарів, а зонд F2N12S – до поверхневого потенціалу, що дозволяє досліджувати апоптоз клітин [83–86].

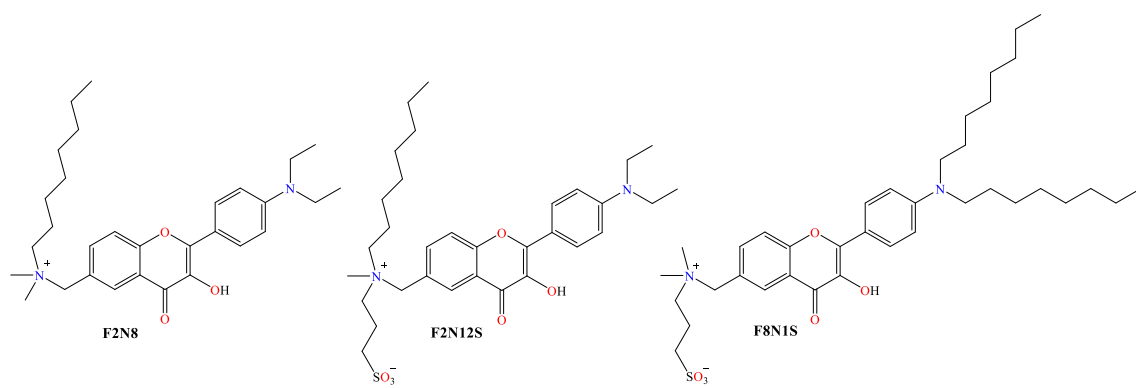


Рисунок 1.14 - Гідрофобно модифіковані флавоноли.

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### 2.1 Прилади та матеріали

Сpektри  $^1\text{H}$  і  $^{13}\text{C}$  ЯМР записані на спектрометрах «Varian 400-MR» та «Bruker Avance 400» (400 МГц для  $^1\text{H}$  і 100 МГц для  $^{13}\text{C}$  ЯМР) в DMSO-d<sub>6</sub>. Сигнали подані в шкалі  $\delta$ . Мас-спектри були записані на вискоєфективному рідинному хроматографі (HPLC) «Agilent 1100», який оснащений діодною матрицею та мас-селективним детектором «Agilent LC/MSD SL», хроматографічна колонка «SUPELCO Ascentis Express C18 2,7 мкм 4,6 мм × 15 см». Контроль за ходом реакції й індивідуальністю отриманих речовин здійснювали методом ТШХ на покритих силікагелем пластинах «Polychrom SI F254» з флуоресцентним детектором у системі гексан-етилацетат 2:1, проявник – ультрафіолетова лампа. Температури плавлення всіх синтезованих сполук визначали за допомогою автоматичного приладу Nanop MP450 у відкритих капілярних трубках.

Сpektри поглинання УФ та видимого діапазону вимірювали за допомогою багатокомірчастого спектрофотометра Agilent Cary 3500 UV-Vis. Сpektри флуоресценції записували за допомогою флуоресцентного спектрометра Hitachi F850, оснащеного монохроматорами збудження та випромінювання з подвійною решіткою.

Всі розчинники та вихідні речовини були отримані від стандартних комерційних представників і використовувалися без додаткового очищення.

### 2.2 Синтез вихідних сполук

Бромоестери **2a-c** були синтезовані з комерційно доступних  $\omega$ -бромкислот **1a-c**, шляхом нагрівання у метанолі в присутності сильної кислоти. Бензальдегіди **3a-c** були синтезовані шляхом алкілування п-гідроксибензальдегіду відповідними  $\omega$ -бромоестерами **2a-c** у диметилформаміді в присутності основи (Рис. 2.1).

Вихідні сполуки **3d,e** були синтезовані аналогічним шляхом з використанням відповідних алкілбромідів **1d,e** (Рис. 2.2).

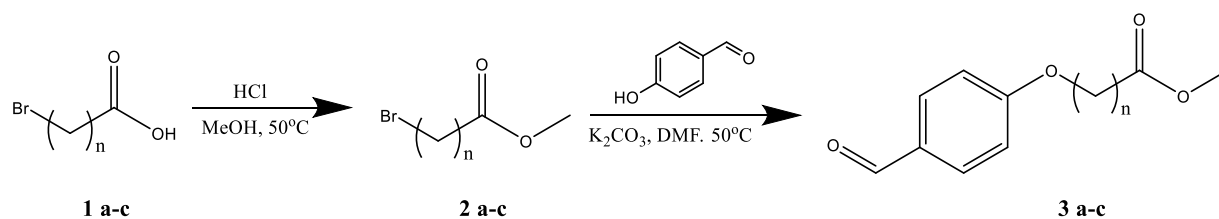


Рисунок 2.1 - Схема синтезу вихідних бензальдегідів ( $n = 1, 5, 11$ ).

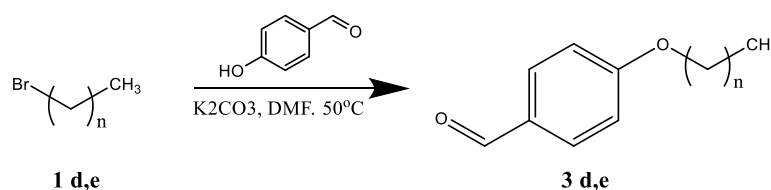


Рисунок 2.2 - Схема синтезу вихідних бензальдегідів ( $n = 5, 11$ ).

### 2.3 Синтез цільових сполук

Синтез цільових сполук було проведено загальновідомим та широко описаним методом – конденсацією відповідних бензальдегідів та 2-гідроксиацетофенонів, з наступним окисненням пероксидом водню (реакція Альгара-Фліна-Оямади) [87]. Сполуки **5a-c** було синтезовано двостадійним методом з виділенням, очисткою та ідентифікацією сполук **4a-c** (Рис. 2.3). Виходи та температури плавлення отриманих сполук зібрані у таблиці 2.1.

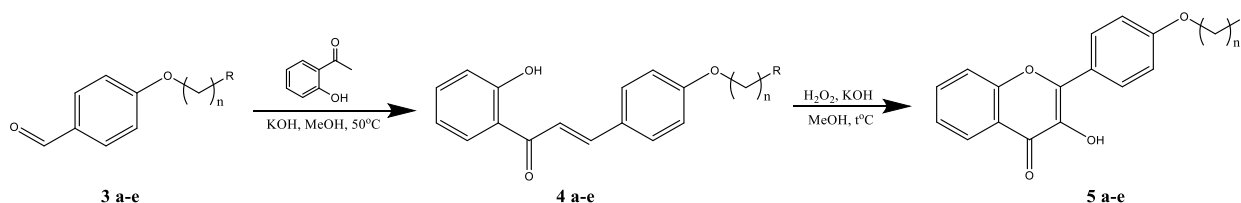


Рисунок 2.3 - Схема синтезу цільових сполук (a-c:  $n = 1, 5, 11$ ,  $R = \text{COOH}$ ; d,e:  $n = 5, 11$ ,  $R = \text{CH}_3$ ).

Таблиця 2.1 - Виходи та температури плавлення отриманих сполук.

Сполука	n	R	T <sub>пл</sub> , °C	Вихід, %
<b>4a</b>	1	COOH	195,5-196	71
<b>4b</b>	5	COOH	161-162	68
<b>4c</b>	11	COOH	122,5-123	53
<b>5a</b>	1	COOH	226-226,5	94
<b>5b</b>	5	COOH	185,5-186	79
<b>5c</b>	11	COOH	171,5-172	74
<b>5d</b>	5	CH <sub>3</sub>	109,5-110,5	65
<b>5e</b>	11	CH <sub>3</sub>	113-113,5	43

### 2.3.1 Синтез 2-(4-(3-(2-гідроксифеніл)-3-оксопроп-1-ен-1-іл)фенокси)оцтової кислоти (**4a**)

1,36 г 2-гідроксиацетофенону (10 ммоль) та 2,08 г бензальдегіду **3a** (10 ммоль) розчинили у 40 мл метанолу, додали 4,5 мл 50% водного розчину КОН (60 ммоль). Реакційну суміш перемішували 24 години при 50°C. Після цього реакційну суміш охолодили до кімнатної температури та додали 10% водний розчин HCl до pH=2. Осад відфільтрували, промили водою та гексаном, висушили та перекристалізували з ацетонітрилу.

Продукт – порошок жовтого кольору. T<sub>пл</sub> = 195,5-196°C.

Вихід продукту: 2,11 г (71% від теорії).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ, ppm: 4.74 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.94–7.05 (m, 4H, Ar), 7.55 (t, 1H, Ar), 7.79–7.96 (m, 4H, Ar), 8.26 (d, 1H, Ar), 12.70 (s, 1H, COOH).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ, ppm: 65.2, 115.4, 118.2, 119.5, 119.6, 121.0, 127.9, 131.2, 131.6, 136.6, 145.4, 160.7, 162.5, 170.4, 194.0.

LCMS [M+H]<sup>+</sup>, m/z (I rel, %): 299 (100), 300(18).

Сполуку **4b** було синтезовано за аналогічною методикою для **4a**.

### 2.3.2 Синтез 6-(4-(3-(2-гідроксифеніл)-3-оксопроп-1-ен-1-іл)фенокси)гексанової кислоти (**4b**)

Продукт – порошок жовтого кольору. T<sub>пл</sub> = 161-162°C.

Вихід продукту: 2,41 г (68% від теорії).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ , ppm: 1.33 – 1.48 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.48 – 1.62 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.65 – 1.75 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.22 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.99 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6.92 – 7.06 (m, 4H, Ar), 7.53 (t, 1H, Ar), 7.75 – 7.97 (m, 4H, Ar), 8.25 (d, 1H, Ar), 12.43 (s, 1H, COOH).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ , ppm: 24.7, 25.6, 28.8, 34.1, 68.1, 115.3, 118.2, 119.0, 119.5, 120.9, 127.4, 131.1, 131.7, 136.6, 145.6, 161.6, 162.6, 174.9, 194.0.

LCMS  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  (I rel, %): 355 (100), 356 (16).

### 2.3.3 Синтез 12-(4-(3-(2-гідроксифеніл)-3-оксопроп-1-ен-1-іл)фенокси)-додеканової кислоти (**4c**)

0,8 г (20 ммоль) гідриду натрію (60% в мінеральному маслі) суспендували в ДМФА (30 мл) при  $0^\circ\text{C}$  в інертній атмосфері. До суміші по краплях додавали 1,36 г (10 ммоль) 2-гідроксиацетофенону і перемішували протягом 10 хв. По краплях додавали розчин 3,34 г (10 ммоль) метил-12-(4-формілфенокси)додеканоата **3c** в ДМФА (10 мл), а потім реакційну суміш нагрівали до  $50^\circ\text{C}$  і перемішували протягом 3 годин. Після завершення реакції суміш розбавляли водою (200 мл) і перемішували при  $50^\circ\text{C}$  протягом години. Додавали 10% водний розчин  $\text{HCl}$ , поки не спостерігалось подальше випадання осаду. Отриманий осад відфільтровували, промили водою і  $n$ -гексаном та перекристалізували з ацетонітрилу.

Продукт – порошок жовтого кольору.  $T_{\text{пл}} = 122,5\text{-}123^\circ\text{C}$ .

Вихід продукту: 2,34 г (53% від теорії).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ , ppm: 1.12 – 1.33 (m, 12H,  $6(\text{CH}_2)$ ), 1.34 – 1.41 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.42 – 1.51 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.63 – 1.76 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.16 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.01 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6.94 – 7.03 (m, 4H, Ar), 7.54 (t, 1H, Ar), 7.75 – 7.98 (m, 4H, Ar), 8.26 (d, 1H, Ar), 11.96 (s, 1H, OH), 12.76 (s, 1H, COOH).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ , ppm: 24.5, 25.4, 28.5, 28.6, 28.7, 28.9, 33.6, 67.7, 114.8, 117.7, 118.6, 119.0, 120.5, 126.9, 130.7, 131.2, 136.1, 145.1, 161.2, 162.1, 174.5, 193.5.

LCMS  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  (I rel, %): 439 (100), 440 (19), 461 (72).

2.3.4 Синтез 2-(4-(3-гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-іл)фенокси)оцтової кислоти (**5a**)

0,6 г (2 ммоль) 2-(4-(3-(2-гідроксифеніл)-3-оксопроп-1-ен-1-іл)фенокси)оцтової кислоти **4a** і 0,67 г гідроксиду калію (12 ммоль) розчиняли в метанолі (25 мл). До суміші по краплях додавали 0,7 мл (6 ммоль) 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Через 30 хв суміш підкислювали 10% водним розчином HCl до pH=2. Отриманий осад відфільтрували, промили водою і н-гексаном та перекристалізували із суміші етанол-тетрагідрофуран

Продукт – порошок жовтого кольору. T<sub>пл</sub> = 226-226,5°C.

Вихід продукту: 0,58 г (94% від теорії).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ, ppm: 4.78 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.01 – 7.20 (m, 2H, Ar), 7.44 (t, 1H, Ar), 7.64 – 7.85 (m, 2H, Ar), 8.09 (d, 1H, Ar), 8.17 (d, 2H, Ar), 9.45 (s, 1H, OH), 13.08 (s, 1H, COOH).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ, ppm: 64.5, 114.5, 118.3, 121.3, 124.0, 124.4, 124.7, 129.3, 133.4, 138.2, 145.4, 154.4, 158.5, 158.8, 169.8, 172.6.

LCMS [M+H]<sup>+</sup>, m/z (I rel, %): 313 (100), 314 (13).

Сполуки **5b** та **5c** було синтезовано за аналогічною методикою для **5a**.

2.3.5 Синтез 6-(4-(3-гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-іл)фенокси)гексанової кислоти (**5b**)

Продукт – порошок жовтого кольору. T<sub>пл</sub> = 185,5-186,0°C.

Вихід продукту: 0,58 г (79% від теорії).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ, ppm: 1.44 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.74 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.22 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.03 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.10 (d, 2H, Ar), 7.44 (t, 1H, Ar), 7.75 (d, 2H, Ar), 8.09 (d, 1H, Ar), 8.19 (m, 2H, Ar), 10.5 (bs, 1H, OH), 12.0 (bs, 1H, COOH).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ, ppm: 29.5, 30.3, 33.6, 38.9, 72.8, 119.2, 119.7, 123.6, 128.6, 129.4, 130.0, 134.6, 138.7, 143.3, 158.8, 159.6, 165.1, 177.8, 179.8.

LCMS [M+H]<sup>+</sup>, m/z (I rel, %): 369 (100), 370 (15).

### 2.3.6 Синтез 12-(4-(3-гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-іл)фенокси)додеканової кислоти (**5c**)

Продукт – порошок жовтого кольору.  $T_{пл} = 171,5-172^{\circ}C$ .

Вихід продукту: 0,67 г (74% від теорії).

$^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ , ppm: 1.09 – 1.32 (m, 12H, 6(CH<sub>2</sub>)), 1.32 – 1.40 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.42 – 1.52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.60 – 1.79 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.16 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.99 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.07 (d, 2H, Ar), 7.43 (t, 1H, Ar), 7.62 – 7.84 (m, 2H, Ar), 8.09 (d, 1H, Ar), 8.17 (d, 2H, Ar), 9.43 (s, 1H, OH), 11.96 (s, 1H, COOH).

$^{13}C$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ , ppm: 25.0, 26.0, 29.0, 29.1, 29.2, 29.3, 29.4, 29.5, 34.2, 68.1, 114.9, 118.8, 121.8, 123.9, 124.9, 125.2, 129.8, 133.9, 138.6, 146.0, 154.9, 160.4, 173.1, 175.0.

LCMS [M+H]<sup>+</sup>, m/z (I rel , %): 453 (100), 454 (21), 475 (95), 476 (22).

### 2.3.7 Синтез 2-(4-(гексилокси)феніл)-3-гідрокси-4Н-хромен-4-ону (**5d**)

1,36 г (10 ммоль) 2-гідроксіацетофенону та 2,06 г бензальдегіду **4d** (10 ммоль) розчинили в метанолі (50 мл) і до реакційної суміші при перемішуванні додали розчин 3,36 г (60 ммоль) гідроксиду калію у воді (10 мл). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 12 годин. До реакційної суміші по краплях додавали 3,4 мл (30 ммоль) 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Через 30 хв реакційну суміш підкислювали 10% водним розчином HCl до pH=2. Отриманий осад відфільтрували, промили водою і н-гексаном та перекристалізували з суміші етанол-ДМФА.

Продукт – порошок жовтого кольору.  $T_{пл} = 109.5-110.5^{\circ}C$ .

Вихід продукту: 2,20 г (65% від теорії).

$^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ , ppm: 0.84 (t, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.22-1.29 (m, 4H, 2(CH<sub>2</sub>)), 1.34-1.39 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.65-1.71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.99 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.06 (d, 2H, Ar), 7.42 (t, 1H, Ar), 7.71 (t, 1H, Ar), 7.71-7.77 (m, 1H, Ar), 8.08 (d, 1H, Ar), 8.16 (d, 2H, Ar), 9.43 (s, 1H, OH).

$^{13}C$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ , ppm: 14.4, 22.6, 25.7, 29.1, 31.5, 68.1, 114.9, 118.8, 121.8, 123.9, 124.9, 125.2, 129.8, 133.9, 138.6, 146.0, 154.9, 160.4, 173.1.

LCMS [M+H]<sup>+</sup>, m/z (I rel , %): 339 (100), 341 (25).

Сполуку **5e** було синтезовано за аналогічною методикою для **5d**

### 2.3.8 Синтез 2-(4-(додецилокси)феніл)-3-гідрокси-4Н-хромен-4-ону (**5e**)

Продукт – порошок жовтого кольору.  $T_{пл} = 113.0-113.5^{\circ}C$ .

Вихід продукту: 1,81 г (43% від теорії).

$^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ , ppm: 0.82 (t, 3H,  $CH_3$ ), 1.09-1.31 (m, 16H, 8( $CH_2$ )), 1.36-1.43 (m, 2H,  $CH_2$ ), 1.68-1.75 (m, 2H,  $CH_2$ ), 4.03 (t, 2H,  $CH_2$ ), 7.08 (d, 2H, Ar), 7.44 (t, 1H, Ar), 7.69-7.77 (m, 2H, Ar), 8.09 (d, 1H, Ar), 8.17 (d, 2H, Ar), 9.30 (bs, 1H, OH).

$^{13}C$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ , ppm: 13.9, 22.1, 25.4, 28.6, 28.7, 29.0, 29.1, 31.3, 67.6, 114.4, 118.3, 121.3, 123.4, 124.4, 124.7, 129.4, 133.5, 138.1, 145.6, 154.4, 159.9.

LCMS  $[M+H]^+$ , m/z (I rel, %): 423 (100), 424.4 (18)

## 2.4 Оптимізація методу синтезу та ідентифікація сполук

Оптимізація методу синтезу проводилась здебільшого через низьку розчинність та знижену реакційну здатність вихідних та проміжних сполук, обумовлену наявністю довгих гідрофобних алкільних радикалів (додецильних).

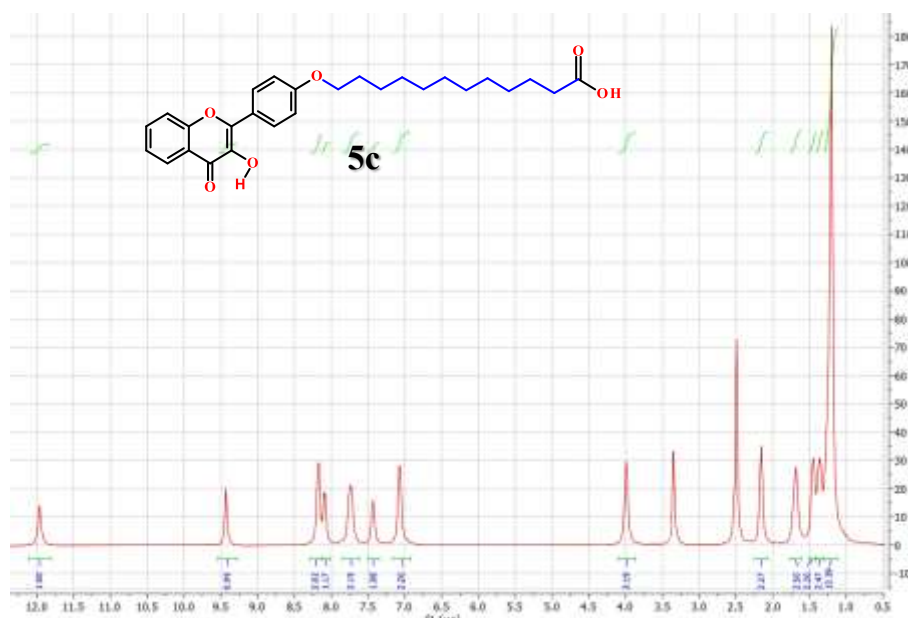
Під час синтезу сполуки **5e** спостерігались проблеми через низьку розчинність проміжних сполук, які випадали в осад, що призводило до низької конверсії та малого виходу. Проблеми вдалось вирішити використанням більшої кількості розчинника та додаванням N,N-диметилформаміду.

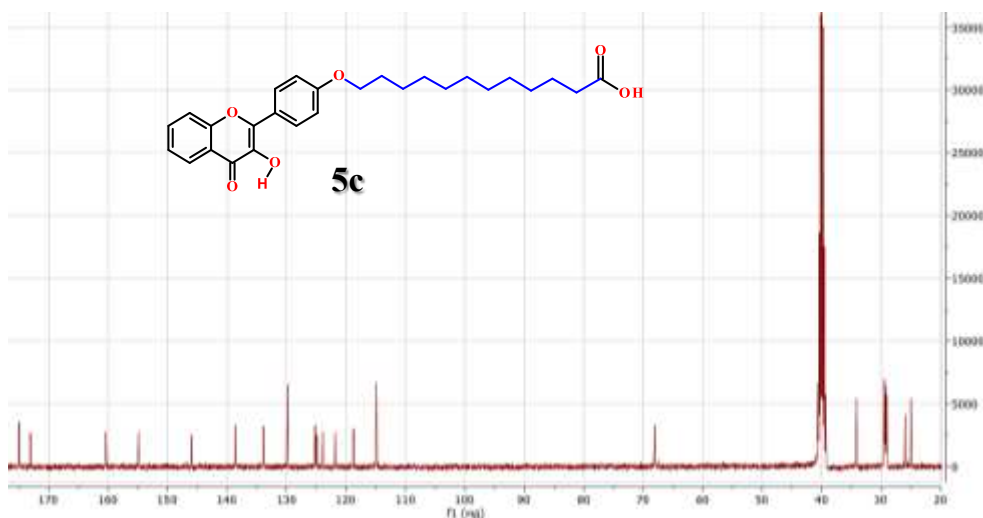
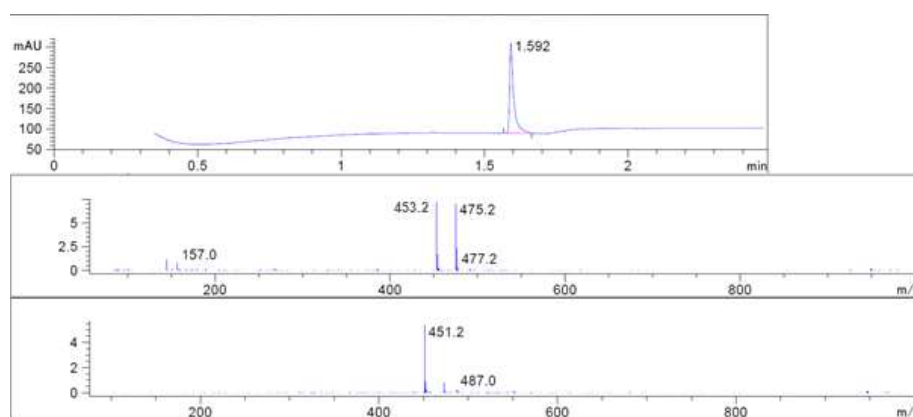
Під час синтезу сполуки **5c**, окрім низької розчинності важливим фактором також була мала реакційна здатність вихідного бензальдегіду **3c**. Ми випробували чимало умов для конденсації, але більшість з них не давали задовільного результату (Табл. 2.2). Найкращий підхід до синтезу сполуки **4c** включає використання гідриду натрію як основи в N,N-диметилформаміді при нагріванні, при чому нагрівання вище  $50^{\circ}C$  та збільшення часу реакції більше 3 годин не підвищує вихід [88].

Таблиця 2.2 - Оптимізація умов синтезу сполуки **4с**.

Розчинник	Каталізатор	Температура, °С	Час, год	Вихід, %
MeOH	KOH	20	24	-
MeOH	KOH	60	24	5
MeOH	KOH	60	48	6
MeOH	MeONa	60	24	10
EtOH	EtONa	75	24	12
HOAc	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20	24	-
HOAc	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	60	24	5
HOAc	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	120	24	-
DMF	NaH	20	3	39
DMF	NaH	50	3	53
DMF	NaH	50	6	54
DMF	NaH	80	3	54

Структура всіх сполук була підтверджена методами <sup>1</sup>H та <sup>13</sup>C ЯМР-спектроскопії та мас-спектрометрії.

Рисунок 2.4 - <sup>1</sup>H-ЯМР спектр сполуки **5с**.

Рисунок 2.5 -  $^{13}\text{C}$ -ЯМР спектр сполуки **5c**.Рисунок 2.6 - Хроматограма та мас-спектри сполуки **5c**.

Структура сполуки **5d** була додатково підтверджена методом рентгеноструктурного аналізу монокристалу (Рис. 2.7). На жаль, нам не вдалось отримати якісні монокристали сполук з більш довгими додецильними радикалами (**5c**, **5e**). А гексильний радикал виявився занадто малим щоб значно впливати на кристалічну структуру.

Сполука **5d** має типову для флавонолів кристалічну структуру з інверсійним центром, тобто спостерігається утворення димерів через міжмолекулярні водневі зв'язки між гідроксильною групою у 3 положенні та карбонільною групою у 4 положенні сусідньої молекули, просторова група симетрії  $P\bar{1}$  [89,90].

Торсійний кут між хромоновим фрагментом та фенільним кільцем у положенні 2 складає  $12,9^\circ$ , тобто система майже планарна.

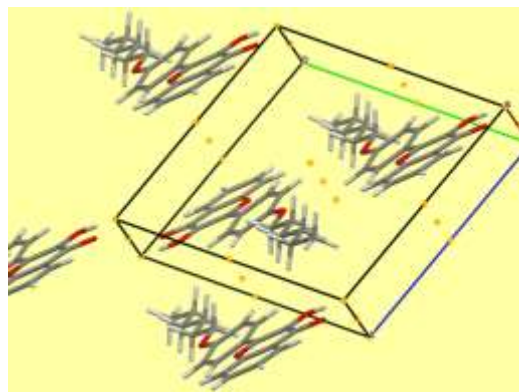


Рисунок 2.7 - Структура сполуки **5d** отримана методом рентгеноструктурного аналізу.

## 2.5 Спектрально-флуоресцентні властивості отриманих сполук

Флавоноли відомі своєю сольватофлуорохромією, тобто залежністю флуоресценції від полярності розчинника [91]. Тому ми отримали спектри флуоресценції досліджуваних речовин у розчинниках різної природи: циклогексані, толуені, ацетонітрилі, метанолі та воді (Рис. 2.8-2.11).

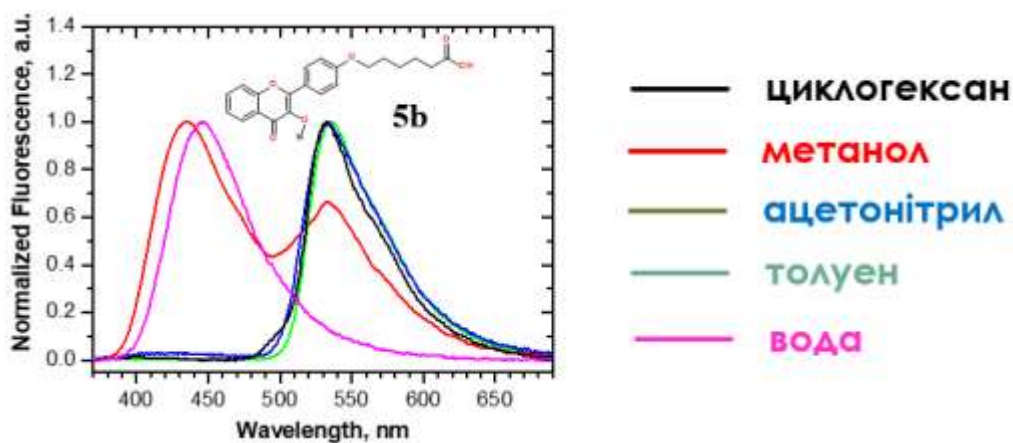


Рисунок 2.8 - Спектри флуоресценції сполуки **5b**.

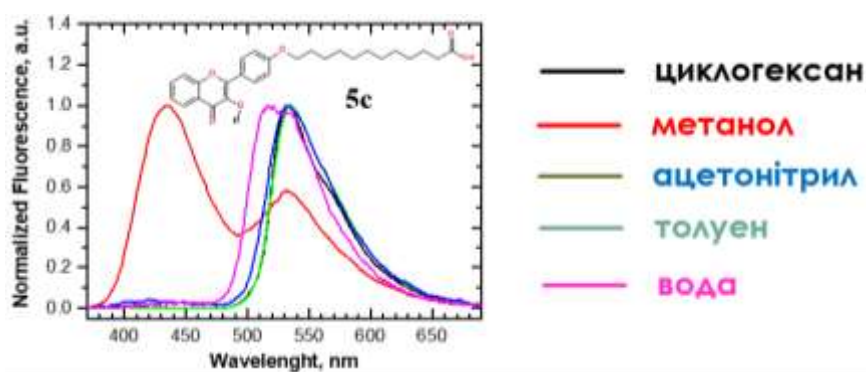


Рисунок 2.9 - Спектри флуоресценції сполуки 5c.

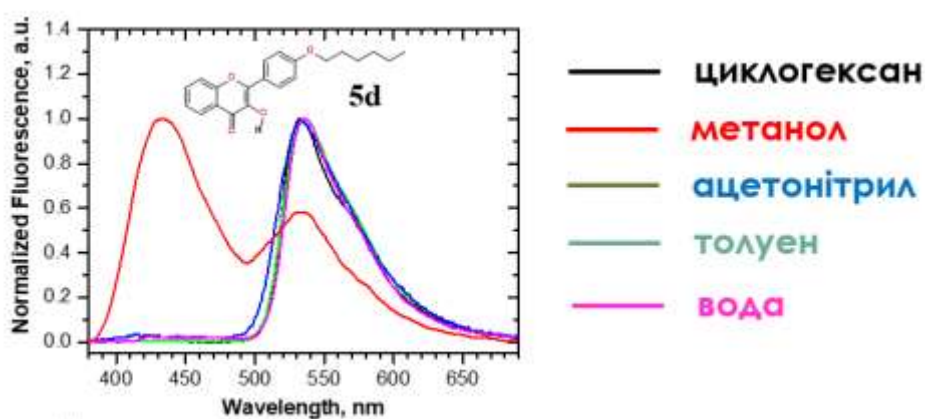


Рисунок 2.10 - Спектри флуоресценції сполуки 5d.

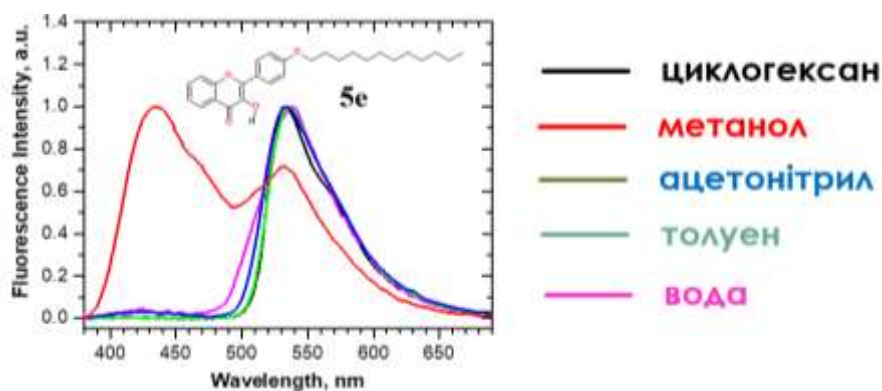


Рисунок 2.11 - Спектри флуоресценції сполуки 5e.

Як і очікувалось, спектри флуоресценції отриманих сполук є схожими між собою та аналогічними до спектрів флуоресценції 4'-метоксифлавонолу, оскільки алкільний радикал не повинен значним чином впливати на флуоресцентні властивості [92].

У слабополярних НДВЗ розчинниках (циклогексан, толуен, ацетонітрил) присутня значно більш інтенсивна смуга флуоресценції таутомерної форми через дуже швидко таутомеризацію у збудженому стані. У полярних протонних розчинниках (метанол, вода), квантовий вихід флуоресценції значно нижчий ніж у слабополярних розчинниках. У метанолі спостерігаються обидві смуги флуоресценції, тоді як у воді смуга флуоресценції нормальної форми погашена. Єдиним виключенням стала сполука **5b**, для якої у воді спостерігається лише смуга флуоресценції нормальної форми.

## 2.6 Експериментальне дослідження взаємодії зондів з ферментом

Експериментальне дослідження взаємодії зондів з  $\beta$ -глюкозидазою було проведено шляхом флуориметричного титрування у нейтральному водному розчині. Через малу розчинність флавонолів у воді, вихідні розчини для титрування були приготовані шляхом додавання до робочого розчину концентрованого розчину у диметилсульфоксиді. В ході цього експерименту концентрація зонду залишалась постійною, на рівні  $2 \cdot 10^{-5}$  М, а концентрація ферменту поступово збільшувалась від 0 до  $7 \cdot 10^{-4}$  М.

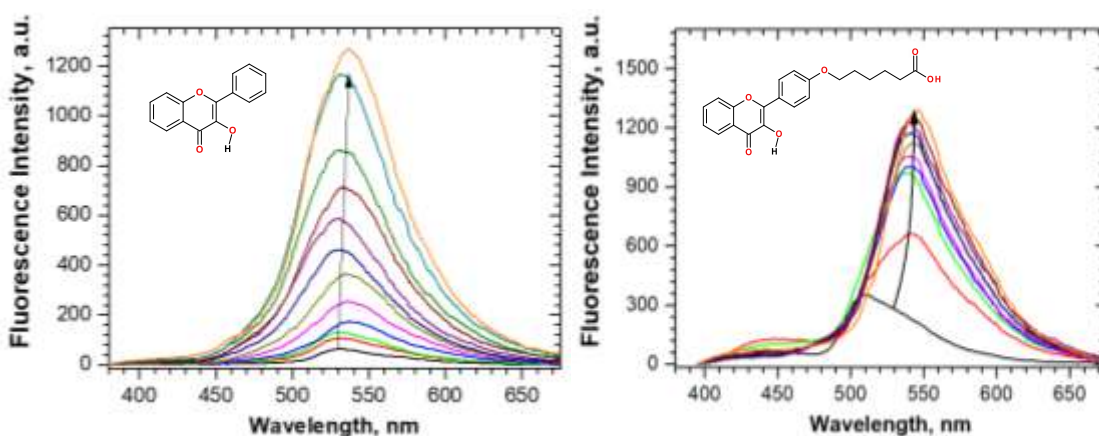


Рисунок 2.12 - Зміна спектру флуоресценції незаміщеного флавонолу та сполуки **5b** під час титрування.

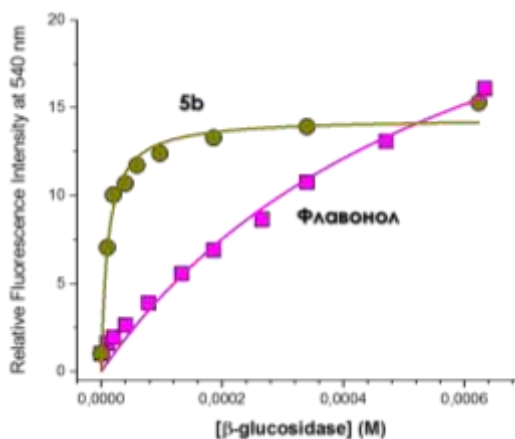


Рисунок 2.13 - Криві титрування незаміщеного флавонолу та сполуки **5b** побудовані за інтенсивністю флуоресценції при 540 нм.

Враховуючи, що зв'язування відбувається здебільшого завдяки гідрофобним та ван-дер-Ваальсовим взаємодіям, були розраховані термодинамічні параметри рівноваги утворення комплексу ліганд-фермент за формулами 2.1 та 2.2, використовуючи криві титрування побудовані за інтенсивністю флуоресценції при 540 нм [93]. Результати розрахунків представлені в таблиці 2.3.

$$I_i = I_0 + \frac{I_{max} \cdot C_g}{[W] + K_p \cdot C_g} \quad (2.1)$$

$$\Delta G = -RT \ln K_p \quad (2.2)$$

де

$I_i$  –інтенсивність флуоресценції,

$I_0$  – інтенсивність флуоресценції за відсутності ферменту,

$I_{max}$  – максимальна інтенсивність флуоресценції,

$C_g$  – концентрація ферменту,

$W$  – концентрація води (55,56 моль/л),

$K_p$  – константа зв'язування,

$\Delta G$  – енергія зв'язування ,

$R$  – газова стала,

$T$  - температура.

Таблиця 2.3 - Експериментально виміряні енергії зв'язування.

Сполука	$I_{\max}$	Константа зв'язування, $K_p$	$\Delta G$ , Ккал/моль
Флавонол	40.6	$5.07 \cdot 10^4$	-6.4
5b	13.5	$4.39 \cdot 10^6$	-9.1

## 2.7 Моделювання взаємодії зондів з ферментом

Термодинамічні параметри, на жаль, не дають уявлення про характер взаємодії та орієнтацію ліганду у порожнині ферменту. Тому було проведено моделювання методом молекулярного докінгу. Для моделювання було обрано  $\beta$ -Глюкозидазу, виділену з бактерії *Paenibacillus polymyxa* (Рис. 2.15) [94].

Налаштування молекулярного докінгу, додавання атомів гідрогену, розрахунок зарядів Гаштайгера рецептора та лігандів проводили за допомогою програмного забезпечення AutoDock Tools (ADT), версії 1.5.7.44 [95]. Розрахунки молекулярного докінгу проводили за допомогою програмного забезпечення AutoDock Vina 1.1.2 [96]. Тривимірну рентгенівську структуру  $\beta$ -глюкозидази *Paenibacillus polymyxa* (BglB, PDB ID: 2O9R), було завантажено з бази даних RCSB.

Взаємодії ліганд-білок вивчали за допомогою напівгнучкого молекулярного докінгу, рецептор залишався жорстким, а молекули ліганду були конформаційно гнучкими. Розмір комірки становив  $45 \times 45 \times 45$ , а відстань між точками сітки становила  $0,375 \text{ \AA}$  відповідно. Для всіх прогонів кількість режимів зв'язування було встановлено на 9, а вичерпність – на 256. Для кожного ліганду було виконано три незалежні прогони з використанням різних випадкових сідів. Найкращий режим стикування відповідає найбільшій енергії зв'язування ліганду.

Для порівняння результатів, моделювання було також проведено для відомих інгібіторів  $\beta$ -Глюкозидаз (Рис. 2.14) [63,64,97]. Результати моделювання зібрані у таблиці 2.4.



Рисунок 2.14 - Структурні формули відомих інгібіторів β-глюкозидаз.

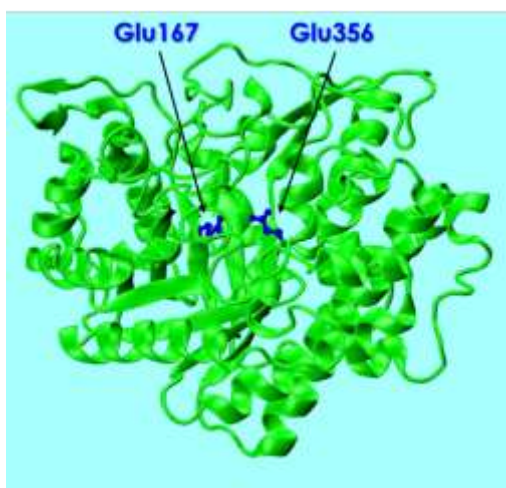


Рисунок 2.15 - Структура β-глюкозидази *Paenibacillus polymyxa* (PDB ID: 2O9R).

Таблиця 2.4 - Результати моделювання методом молекулярного докінгу.

Сполука	Енергія зв'язування, ккал/моль
Флавонол	-8.2
<b>5a</b>	-8.8
<b>5b</b>	-9.1
<b>5c</b>	-8.4
4'-етоксифлавонол	-8.3
<b>5d</b>	-8.6
<b>5e</b>	-7.9
Isofagomine	-6.0
Noeuromycin	-6.8
Imd1	-6.8

Хоча молекулярний докінг надає цінну інформацію про енергію зв'язування та сприятливу позицію ліганду всередині порожнини ферменту, його основним недоліком є відсутність ефектів сольватації, які відіграють важливу роль у розчині. Тому стабільність флавонол-ферментних комплексів, отриманих за допомогою молекулярного докінгу, була додатково досліджена у водному розчині за допомогою молекулярно динамічного моделювання.

Силове поле OPLS-AA використовувалося для молекул білку і флавонолів [98]. Модель TIP3P53 використовувалася для молекул води [99]. Початкова структура комплексу зонд-білок була взята з відповідної найбільш сприятливої структури, отриманої за допомогою розрахунків молекулярного докінгу. Комплекс сольватували в кубічній комірці розміром 9 нм. Система спочатку була попередньо врівноважена в ансамблі NVT протягом 2 нс, протягом яких зонд і структура білка були позиційно обмежені. Далі вільне необмежене врівноваження комплексу зонд-білок проводилося протягом 0,1 нс в ансамблі NPT, під час якого проходила релаксація розміру комірки. Остаточна врівноважена конфігурація системи була використана для продуктивного моделювання протягом 200 нс.

Усі результативні моделювання MD були проведені для ансамблю NPT. Температура 298,15 К підтримувалася постійною за допомогою схеми слабкого зв'язку  $v\text{-rescale}$  з константою  $\tau_T = 0,1$  пс. Постійний тиск 1 атм підтримували за допомогою баростата Паррінелло-Рахмана з константою  $\tau_P = 1$  пс. Початкові атомні швидкості були згенеровані з розподілом Максвелла при заданій абсолютній температурі. Періодичні граничні умови були застосовані до всіх трьох напрямків змодельованої комірки. Електростатичні взаємодії були змодельовані за допомогою підходу сітки Евальда (PME) з використанням далекого відсікання 1,1 нм [100]. Гранична відстань взаємодії Леннарда-Джонса також дорівнювала 1,1 нм. Крок моделювання MD становив 2 фс з оновленням списку сусідів кожні 10 фс. Усі довжини зв'язків підтримувалися постійними за допомогою процедури LINCS [101,102]. Моделювання MD проводилося за допомогою набору програм GROMACS, версія 2019.4.

Структурну стабільність комплексу з ферментом оцінювали шляхом розрахунку середньоквадратичного зміщення атомів ліганду [103]. Результати представлені на рисунку 2.16.

$$RMSD(\tau_1, \tau_2) = \left[ \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \|r_i(\tau_1) - r_i(\tau_2)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2.3)$$

де

RMSD - середньоквадратичне зміщення атомів,

$\tau_1$  і  $\tau_2$  - час,

$r_i$  – вектор положення атома.

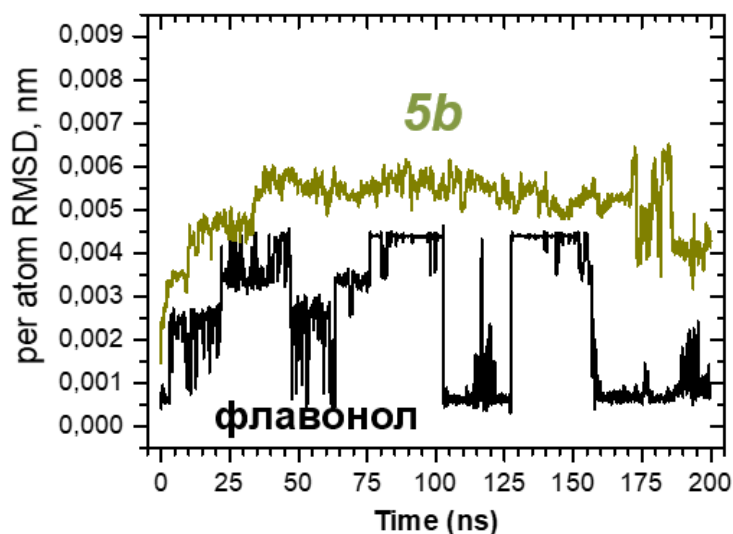


Рисунок 2.16 - Середньоквадратичне зміщення атомів ліганду у комплексі ліганд-фермент за результатами МД моделювання.

## 2.8 Дослідження взаємодії зондів з полівінілпіролідом

В літературі також зазначалось, що флуоресцентні зонди на основі флавонолів є перспективними для дослідження фізико-хімічних властивостей організованих розчинів та визначення структурно-динамічних характеристик полімерів [104,105]. Тому в даній роботі ми вирішили провести дослідження взаємодії отриманих зондів з полівінілпіролідом у розчині, використовуючи методи флуоресцентної спектроскопії та молекулярного докінгу.

Полівінілпіролідон (ПВП) є розчинним у воді, гідрофільним полімером, ланцюг якого складається з елементарних ланок N-вінілпіролідону [106]. ПВП є

хімічно інертним, безбарвним, термостійким і стійким в широкому інтервалі рН, а також біосумісним і нетоксичним, що дозволяє використовувати його у харчовій промисловості, в медицині та косметиці, для фармацевтичного та біомедичного застосування [107,108]. Завдяки своїм сольобілізуючим властивостям ПВП здатний значно підвищувати розчинність гідрофобних органічних речовин у воді та запобігати їх кристалізації з розчину [109–112].

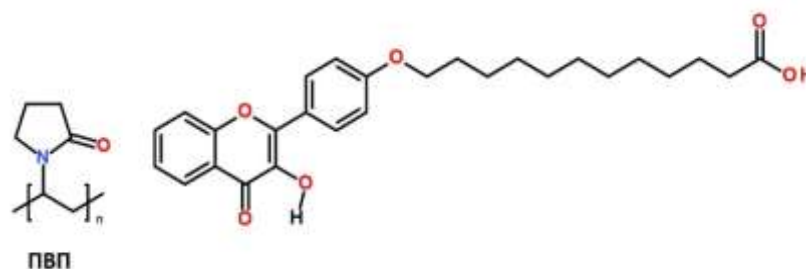


Рисунок 2.17 - Формула ПВП та зонду **5c**.

Експеримент проводився шляхом титрування водного розчину зонда **5c** розчином ПВП. Для приготування вихідного водного розчину зонда **5c** ( $2 \cdot 10^{-5}$  М) використовували його розчин в ДМСО: аліквоту об'ємом 10 мкл помістили в 2 мл буферного розчину з рН 6.86. Комерційний ПВП (Thermo Scientific, 10 кДа) використовувався без додаткової очистки. На рис. 2.18(а) показано результати спектрофлуориметричного титрування.

У розчинах з високою концентрацією ПВП утворюються ліпофільні агрегати, які мають меншу локальну полярність, ніж у водній фазі [108,113]. Тому нами було також вивчено взаємодію зонда **5c** з концентрованим розчином ПВП ( $M_w$  10 кДа,  $C_{\text{ПВП}} = 2,3 \cdot 10^{-3}$  М). На рис. 2.18(б) показано результати флуориметричного титрування концентрованого розчину ПВП розчином зонда **5c** у ДМСО.

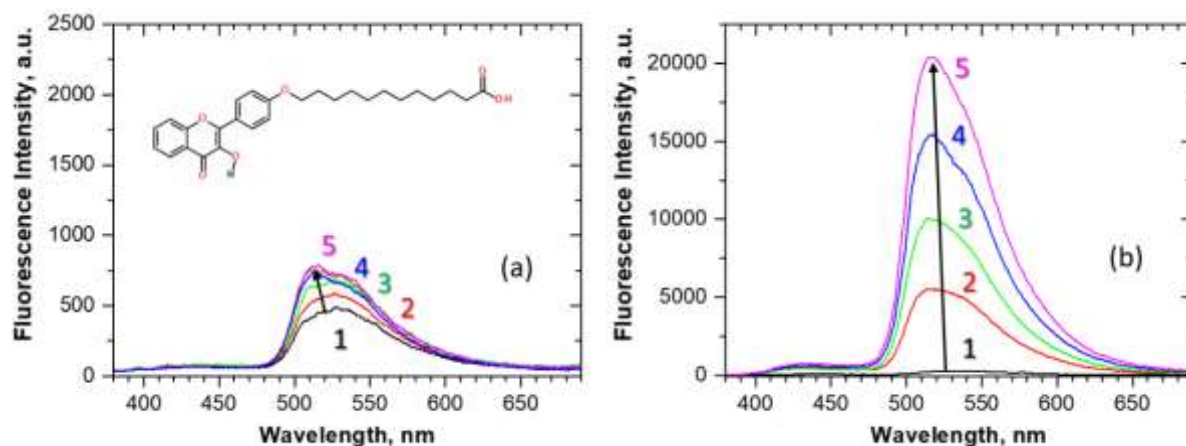


Рисунок 2.18 - (а) Титрування водного розчину зонда додаванням ПВП: 1 – за відсутності ПВП,  $C_{5c} = 2.1 \cdot 10^{-5}$  М. У присутності ПВП, 2 –  $C_{5c} = 1.1 \cdot 10^{-7}$  М, 3 –  $C_{5c} = 4.5 \cdot 10^{-7}$  М, 4 –  $C_{5c} = 4.2 \cdot 10^{-6}$  М, 5 –  $C_{5c} = 2.2 \cdot 10^{-5}$  М. (б) Титрування концентрованого розчину ПВП додаванням мікро аліквот зонда у ДМСО. 1 – за відсутності ПВП,  $C_{5c} = 2.1 \cdot 10^{-5}$  М.  $C_{\text{ПВП}} = 2.3 \cdot 10^{-3}$  М, 2 –  $C_{5c} = 2.1 \cdot 10^{-5}$  М, 3 –  $C_{5c} = 4.2 \cdot 10^{-5}$  М, 4 –  $C_{5c} = 6.3 \cdot 10^{-5}$  М, 5 –  $C_{5c} = 8.4 \cdot 10^{-5}$  М.

У літературі, для дослідження утворення стійких комплексів барвників з полімерами, використовували комбінацію спектральних методів та молекулярного моделювання, що виявилось досить інформативним [114,115]. Тому ми виконали комп'ютерні розрахунки з використанням методу молекулярного докінгу для встановлення структурно-енергетичних характеристик утворення адуктів між зондами і ПВП.

Для моделювання було обрано дві конформації ПВП зі ступенем полімеризації 100 та 1440, що апроксимують взаємодію у розведеному (ПВП<sub>100</sub>) та концентрованому розчинах (ПВП<sub>1440</sub>), як зображено на рис. 2.19. Геометрія макромолекул ПВП<sub>100</sub> та ПВП<sub>1440</sub> була отримана за результатами молекулярно-динамічного моделювання цих систем у водному розчині [116]. Результати молекулярного докінгу та енергії зв'язування зазначені на рис. 2.19 та у таблицях 2.5 і 2.6.

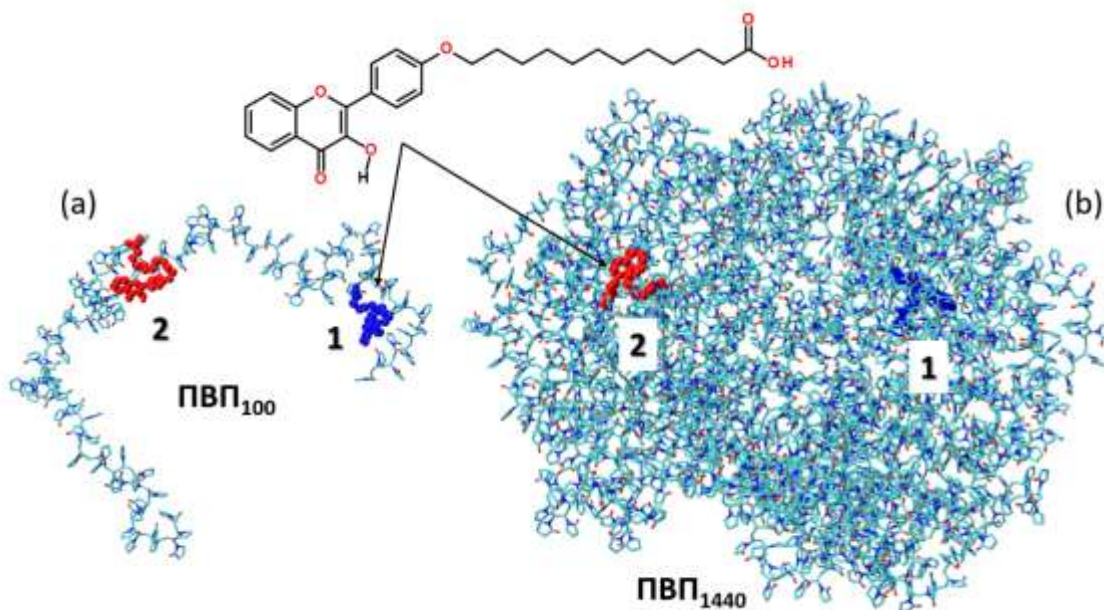


Рисунок 2.19 - Результати молекулярного докінгу зонда **5c** з ПВП різної просторової будови: (a) ПВП<sub>100</sub> у розгорнутій конформації та (b) ПВП<sub>1440</sub> у формі компактної глобули.

Таблиця 2.5 - Спорідненість зв'язування зондів з ПВП за результатами молекулярного докінгу.

Зонд	Спорідненість зв'язування, ккал/моль	
	ПВП <sub>100</sub>	ПВП <sub>1440</sub>
Флавонол	-5,7	-7,9
<b>5a</b>	-5,1	-8,0
<b>5b</b>	-4,8	-7,9
<b>5c</b>	-4,5	-8,5
4'-етокси-флавонол	-5,3	-8,2
<b>5d</b>	-5,2	-7,9
<b>5e</b>	-4,6	-8,3

Таблиця 2.6 - Спорідненість зв'язування зонда **5c** з різними ділянками ПВП за результатами молекулярного докінгу.

ПВП	Спорідненість зв'язування зонда <b>5c</b> з ПВП, ккал/моль	
	ділянка зв'язування 1	ділянка зв'язування 2
ПВП <sub>100</sub>	-4,5	-4,2
ПВП <sub>1440</sub>	-8,5	-7,3

## 2.9 Обговорення результатів

Як видно з результатів (рис. 2.12), в процесі титрування розчином ферменту відбуваються значні зміни спектру флуоресценції, такі як посилення інтенсивності флуоресценції та поява нових смуг випромінювання. Збільшення інтенсивності флуоресценції зонда, чутливого до навколишнього середовища, відоме як індукований білком «turn-on» ефект. Спостережувані спектральні зміни вказують на зміни в локальному середовищі навколо зонда. Під час зв'язування з білком молекула зонду переходить з полярного водного розчину в неполярне гідрофобне середовище всередині білкової кишені. Збільшення інтенсивності флуоресценції пов'язане з втратою індукованого водою гасіння флуоресценції, що може бути пов'язано з глибоким проникненням флавонолів у гідрофобну, вільну від води, область кишені ферменту  $\beta$ -глюкозидази.

З результатів розрахунків (табл. 2.3) видно, що введення алкільного радикалу значно підвищило енергію зв'язування у порівнянні з незаміщеним флавонолом.

Моделювання методом молекулярного докінгу підтвердило, що досліджувані об'єкти проникають глибоко у порожнину ферменту  $\beta$ -глюкозидази і зв'язуються біля каталітичного центру, тим самим блокуючи його (рис. 2.20 та рис. 2.21).

За результатами молекулярного докінгу (табл. 2.4) видно, що введення гідрофобних алкільних радикалів дійсно підвищує енергію зв'язування, але

залежність не така тривіальна. Для зондів з більш довгими радикалами, наприклад додецильними, енергія зв'язування навпаки зменшується.

Енергії зв'язування досліджуваних речовин перевищують енергії зв'язування відомих інгібіторів  $\beta$ -глюкозидаз (табл. 2.4). У поєднанні з низькою токсичністю досліджувані речовини є перспективними для розробки нових інгібіторів  $\beta$ -глюкозидаз.

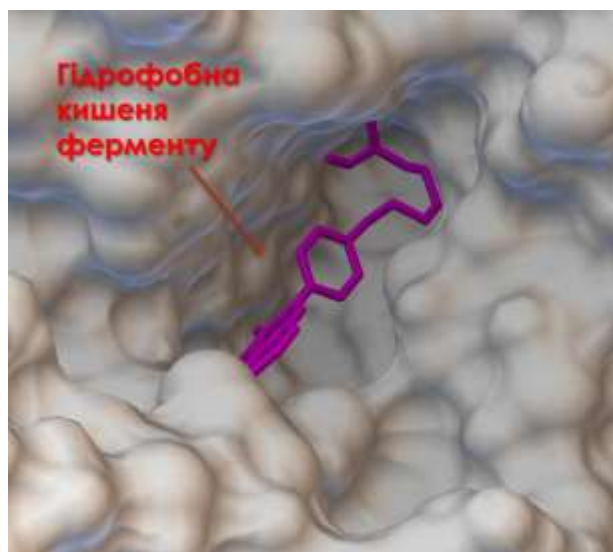


Рисунок 2.20 - Розташування ліганду **5b** у кишені ферменту.

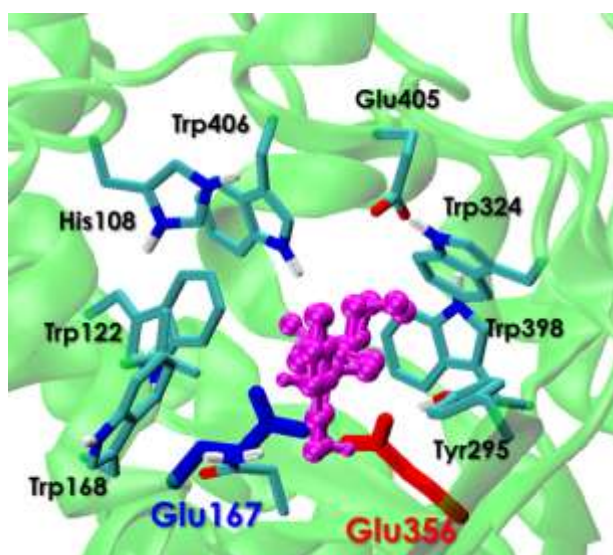


Рисунок 2.21 - Розташування ліганду **5b** відносно найближчих залишків амінокислот.

Результати молекулярно динамічного моделювання показали незначну мобільність зонду в порожнині ферменту, але в цілому ліганд залишається в межах початкової позиції і не виходить у водний розчин з порожнини ферменту (рис. 2.16).

Результати дослідження взаємодії зонда з полівінілпіролідом показали, що характер взаємодії залежить від концентрації полімеру. Так при низькій концентрації полімеру відбувається незначне зростання інтенсивності смуги флуоресценції таутомерної форми та гіпсохромний зсув максимуму з 530 нм до 513 нм, що свідчить про слабку взаємодію (рис. 2.18а). При високій концентрації ПВП спостерігалось значне зростання інтенсивності флуоресценції, тобто такий самий «turn-on» ефект як і при взаємодії з  $\beta$ -глюкозидазою (рис. 2.18б).

Результати докінгу дозволили виявити декілька ділянок зв'язування зонда **5c** з розгорнутим ланцюгом ПВП<sub>100</sub> та макромолекулою ПВП<sub>1440</sub>. Щільна полімерна матриця ПВП<sub>1440</sub> містить декілька гідрофобних кишень здатних вмістити молекулу зонду (рис. 2.19б). Ділянка 1 є глибоко зануреною у полімерну матрицю, тоді як ділянка 2 представляє комплекс зв'язування зонда з зовнішньою поверхнею полімерної глобули.

Результати докінгу показують, що зв'язування зонда **5c** з гідрофобною кишенею ПВП<sub>1440</sub> є на 4,0 ккал/моль більш енергетично вигідним, ніж утворення комплексу з ПВП<sub>100</sub> (табл. 2.6). Така сама тенденція спостерігається і для інших зондів (табл. 2.5). Ці данні добре узгоджуються з результатами флуориметричного титрування представленого на рис. 2.11.

Залежність енергії зв'язування зондів з ПВП від довжини алкільного радикалу виявилась не такою тривіальною, так спорідненість до ПВП<sub>100</sub> зі збільшенням довжини радикалу зменшується, при чому для зондів з якірною карбоксильною групою енергія зв'язування менша ніж у зондів без неї (табл. 2.5).

А залежність енергії зв'язування зондів з ПВП<sub>1440</sub> від довжини алкільного радикалу виявилась нелінійною, як і випадку зв'язування з  $\beta$ -глюкозидазою. Для зондів з малими замісниками ( $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{COOH}$ ) спостерігається зростання енергії зв'язування з ПВП<sub>1440</sub> у порівнянні з незаміщеним флавонолом, з замісниками середнього розміру ( $-(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ,  $-(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$ ) – зниження енергії зв'язування до рівня незаміщеного флавонолу, для зондів з великими замісниками ( $-(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$ ,  $-(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$ ) – значне підвищення енергії зв'язування з ПВП<sub>1440</sub>. При

чому наявність карбоксильної групи для зондів з малими замісниками знижує енергію зв'язування з ПВП<sub>1440</sub>, а для зондів з великими замісниками – підвищує енергію зв'язування (табл. 2.5).

Також треба відмітити, що розрахунки за методом молекулярного докінгу проводяться в вакуумі, а у розчині сольватаційні ефекти відіграватимуть не менш важливу роль. Ймовірніше за все у водному розчині до описаних залежностей додаватиметься очікуване значне підвищення енергії зв'язування зі збільшенням довжини алкільного замісника через гідрофобні взаємодії.

## ВИСНОВКИ

1. Синтезовано цільові похідні 3-гідрокси-4Н-хромен-4-ону лінійним та одностадійним методами, виходячи з відповідних заміщених ароматичних альдегідів та 2-гідроксиацетофенонів. При використанні лінійного методу синтезу, проміжні похідні 1-(2-гідроксифеніл)-3-(4-алкоксифеніл)проп-2-єн-1-он-карбонових кислот було виділено та ідентифіковано окремо. Вивчено спектрально-флуоресцентні властивості отриманих сполук у розчинниках різної природи.
2. З використанням флуоресцентної спектроскопії, молекулярного докінгу та молекулярно-динамічного моделювання досліджено взаємодію синтезованих флавонолів з ферментом  $\beta$ -глюкозидазою. Показано, що введення гідрофобних алкільних радикалів певної довжини забезпечує більш ефективне зв'язування з молекулою білка, що є перспективним для розробки нових інгібіторів  $\beta$ -глюкозидази.
3. Встановлено, що спорідненість зонда до полімеру залежить від концентрації ПВП у розчині. При високій концентрації ПВП утворює щільну просторову структуру, що збільшує спорідненість зонда до полімеру. Методом молекулярного докінгу досліджено молекулярні аспекти взаємодії зонд-полімер та показано, що зв'язування зондів відбувається з гідрофобними кишнями у полімерній матриці.



А.Д. Сніжко

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- [1] Engin, A.B.; Tsatsakis, A.M.; Tsoukalas, D.; Engin, A. Do Flavanols-Rich Natural Products Relieve Obesity-Related Insulin Resistance? *Food and Chemical Toxicology*, **2018**, *112*, 157–167.
- [2] Hackman, R.M.; Polagruto, J.A.; Zhu, Q.Y.; Sun, B.; Fujii, H.; Keen, C.L. Flavanols: Digestion, Absorption and Bioactivity. *Phytochemistry Reviews*, **2007**, *7*, 195–208.
- [3] Sharma, A.; Sharma, P.; Singh Tuli, H.; Sharma, A.K. Phytochemical and Pharmacological Properties of Flavonols. In *Encyclopedia of Life Sciences*; Wiley, **2018**; pp. 1–12.
- [4] Smith, D.F. Benefits of Flavanol-Rich Cocoa-Derived Products for Mental Well-Being: A Review. *J Funct Foods*, **2013**, *5*, 10–15.
- [5] Kashyap, D.; Sharma, A.; Sak, K.; Tuli, H.S.; Buttar, H.S.; Bishayee, A. Fisetin: A Bioactive Phytochemical with Potential for Cancer Prevention and Pharmacotherapy. *Life Sci*, **2018**, *194*, 75–87.
- [6] Oyamada, T. A New General Method for the Synthesis of the Derivatives of Flavonol. *Bull Chem Soc Jpn*, **1935**, *10*, 182–186.
- [7] Algar, J.; Flynn, J. A New Method for the Synthesis of Flavonols. *Proc R Ir Acad B*, **1934**, *42*, 1–8.
- [8] Kishore, N.R.; Ashok, D.; Sarasija, M.; Murthy, N.Y.S. One-Pot Synthesis of Spirochromanone-Based 3-Hydroxy-4H-Chromen-4-Ones by a Modified Algar–Flynn–Oyamada Reaction and Evaluation of Their Antimicrobial Activity. *Chem Heterocycl Compd (N Y)*, **2017**, *53*, 1187–1191.
- [9] Ashok, D.; Kifah, M.A.; Lakshmi, B.V.; Sarasija, M.; Adam, S. Microwave-Assisted One-Pot Synthesis of Some New Flavonols by Modified Algar–Flynn–Oyamada Reaction and Their Antimicrobial Activity. *Chem Heterocycl Compd (N Y)*, **2016**, *52*, 172–176.
- [10] Serdiuk, I.E.; Roshal, A.D.; Błażejowski, J. Quantum-Chemical Analysis of the Algar–Flynn–Oyamada Reaction Mechanism. *Chem Heterocycl Compd (N Y)*, **2014**, *50*, 396–403.

- [11] Shen, X.; Zhou, Q.; Xiong, W.; Pu, W.; Zhang, W.; Zhang, G.; Wang, C. Synthesis of 5-Substituted Flavonols via the Algar-Flynn-Oyamada (AFO) Reaction: The Mechanistic Implication. *Tetrahedron*, **2017**, *73*, 4822–4829.
- [12] Gormley, T.R.; O’Sullivan, W.I. Flavanoid Epoxides—XIII. *Tetrahedron*, **1973**, *29*, 369–373.
- [13] Allan, J.; Robinson, R. CCXC.—An Accessible Derivative of Chromonol. *J. Chem. Soc., Trans.*, **1924**, *125*, 2192–2195.
- [14] Auwers, K.; Müller, K. Umwandlung von Benzal-cumaranonen in Flavonole. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **1908**, *41*, 4233–4241.
- [15] Auwers, K. V.; Pohl, P. Über Die Umwandlung von Benzalcumaranonen in Flavonole. *Justus Liebigs Ann Chem*, **1914**, *405*, 243–294.
- [16] v. Auwers, K.; Pohl, P. Eine Synthese Des Fisetins. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **1915**, *48*, 85–90.
- [17] v. Auwers, K. Zur Bildung von Flavonolen Aus Benzal-cumaranonen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **1916**, *49*, 809–819.
- [18] v. Auwers, K.; Auffenberg, E. Über Cumaranone Und Hydrindone. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, **1919**, *52*, 92–113.
- [19] Dean, H.F.; Nierenstein, M. Attempts to Synthesize Myricetin. *J Am Chem Soc*, **1925**, *47*, 1676–1684.
- [20] Weitz, E.; Scheffer, A. Über Die Einwirkung von Alkalischem Wasserstoffsperoxyd Auf Ungesättigte Verbindungen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, **1921**, *54*, 2327–2344.
- [21] Adam, W.; Golsch, D.; Hadjiarapoglou, L.; Patonay, T. Dimethyldioxirane Epoxidation of Flavones. *Tetrahedron Lett*, **1991**, *32*, 1041–1044.
- [22] Serdiuk, I.E.; Roshal, A.D. Exploring Double Proton Transfer: A Review on Photochemical Features of Compounds with Two Proton-Transfer Sites. *Dyes and Pigments*, **2017**, *138*, 223–244.
- [23] Chumak, A.Yu.; Mudrak, V.O.; Kotlyar, V.M.; Doroshenko, A.O. 4'-Nitroflavonol Fluorescence: Excited State Intramolecular Proton Transfer Reaction from the Non-Emissive Excited State. *J Photochem Photobiol A Chem*, **2021**, *406*, 112978.

- [24] Höfener, S.; Kooijman, P.C.; Groen, J.; Ariese, F.; Visscher, L. Fluorescence Behavior of (Selected) Flavonols: A Combined Experimental and Computational Study. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2013**, *15*, 12572–12581.
- [25] Xu, Z.; Zhao, X.; Zhou, M.; Zhang, Z.; Qin, T.; Wang, D.; Wang, L.; Peng, X.; Liu, B. Donor Engineering on Flavonoid-Based Probes to Enhance the Fluorescence Brightness in Water: Design, Characterization, Photophysical Properties, and Application for Cysteine Detection. *Sens Actuators B Chem*, **2021**, *345*, 130367.
- [26] Klymchenko A. S. Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications. *Acc Chem Res*, **2017**, *50*, 366–375.
- [27] Roshal, A.D.; Organero, J.A.; Douhal, A. Tuning the Mechanism of Proton-Transfer in a Hydroxyflavone Derivative. *Chem Phys Lett*, **2003**, *379*, 53–59.
- [28] Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer US: Boston, MA, **1999**.
- [29] Forster, Th. Energiewanderung Und Fluoreszenz. *Naturwissenschaften*, **1946**, *33*, 166–175.
- [30] Dexter, D.L. A Theory of Sensitized Luminescence in Solids. *J Chem Phys*, **1953**, *21*, 836–850.
- [31] May, V.; Kühn, O. *Charge and Energy Transfer Dynamics in Molecular Systems*; Wiley, **2011**.
- [32] Kumar, N.; Bhalla, V.; Kumar, M. Resonance Energy Transfer-Based Fluorescent Probes for Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> Ions. *Analyst*, **2014**, *139*, 543–558.
- [33] Kyrychenko, A.; Albinsson, B. Conformer-Dependent Electronic Coupling for Long-Range Triplet Energy Transfer in Donor-Bridge-Acceptor Porphyrin Dimers. *Chem Phys Lett*, **2002**, *366*, 291–299.
- [34] Andréasson, J.; Kyrychenko, A.; Mårtensson, J.; Albinsson, B. Temperature and Viscosity Dependence of the Triplet Energy Transfer Process in Porphyrin Dimers. *Photochemical & Photobiological Sciences*, **2002**, *1*, 111–119.
- [35] Nosenko, Y.; Kyrychenko, A.; Thummel, R.P.; Waluk, J.; Brutschy, B.; Herbich, J. Fluorescence Quenching in Cyclic Hydrogen-Bonded Complexes of 1H-Pyrrolo[3,2-h]Quinoline with Methanol: Cluster Size Effect. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2007**, *9*, 3276.

- [36] Waluk, J. Hydrogen-Bonding-Induced Phenomena in Bifunctional Heteroazaaromatics. *Acc Chem Res*, **2003**, *36*, 832–838.
- [37] Kyrychenko, A.; Herbich, J.; Izydorzak, M.; Wu, F.; Thummel, R.P.; Waluk, J. Role of Ground State Structure in Photoinduced Tautomerization in Bifunctional Proton Donor–Acceptor Molecules: 1H-Pyrrolo[3,2-h]Quinoline and Related Compounds. *J Am Chem Soc*, **1999**, *121*, 11179–11188.
- [38] Carlos del Valle, J.; Domínguez, E.; Kasha, M. Competition between Dipolar Relaxation and Double Proton Transfer in the Electronic Spectroscopy of Pyrroloquinolines. *J Phys Chem A*, **1999**, *103*, 2467–2475.
- [39] Pivovarenko V. G. Multi-Parametric Sensing by Multi-Channel Molecular Fluorescent Probes Based on Excited State Intramolecular Proton Transfer and Charge Transfer Processes. *BBA advances*, **2023**, *3*, 100094.
- [40] Roshal, A.D.; Grigorovich, A. V; Doroshenko, A.O.; Pivovarenko, V.G.; Demchenko, A.P. Flavonols as Metal-Ion Chelators: Complex Formation with Mg<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> Cations in the Excited State. *J Photochem Photobiol A Chem*, **1999**, *127*, 89–100.
- [41] Saad, E.A.; Khalil, L.H.; Zaki, M.T.M.; El-Ella, A.A.A. Determination of Zirconium (IV) and Aluminium (III) in Waste Water. *Microchimica Acta*, **2002**, *140*, 87–91.
- [42] Qin, T.; Liu, B.; Xu, Z.; Yao, G.; Xu, H.; Zhao, C. Flavonol-Based Small-Molecule Fluorescent Probes. *Sens Actuators B Chem*, **2021**, *336*, 129718.
- [43] Liu, W.; Wang, Y.; Jin, W.; Shen, G.; Yu, R. Solvatochromogenic Flavone Dyes for the Detection of Water in Acetone. *Anal Chim Acta*, **1999**, *383*, 299–307.
- [44] Demchenko, A.P.; Ercelen, S.; Roshal, A.D.; Klymchenko, A.S. Excited-State Proton Transfer Reaction in a New Benzofuryl 3-Hydroxychromone Derivative: The Influence of Low-Polar Solvents. *Pol J Chem*, **2002**, *76*, 1287–1300.
- [45] Doroshenko, A.O.; Kyrychenko, A. V; Valyashko, O.M.; Kotlyar, V.M.; Svechkarev, D.A. 4'-Methoxy-3-Hydroxyflavone Excited State Intramolecular Proton Transfer Reaction in Alcoholic Solutions: Intermolecular versus Intramolecular Hydrogen Bonding Effect. *J Photochem Photobiol A Chem*, **2019**, *383*, 111964.

- [46] Valuk, V.F.; Duportail, G.; Pivovarenko, V.G. A Wide-Range Fluorescent PH-Indicator Based on 3-Hydroxyflavone Structure. *J Photochem Photobiol A Chem*, **2005**, *175*, 226–231.
- [47] Liu, B.; Pang, Y.; Bouhenni, R.; Duah, E.; Paruchuri, S.; McDonald, L. A Step toward Simplified Detection of Serum Albumin on SDS-PAGE Using an Environment-Sensitive Flavone Sensor. *Chemical Communications*, **2015**, *51*, 11060–11063.
- [48] Jin, X.; Sun, X.; Di, X.; Zhang, X.; Huang, H.; Liu, J.; Ji, P.; Zhu, H. Novel Fluorescent ESIPT Probe Based on Flavone for Nitroxyl in Aqueous Solution and Serum. *Sens Actuators B Chem*, **2016**, *224*, 209–216.
- [49] Bertman, K.A.; Abeywickrama, C.S.; Baumann, H.J.; Alexander, N.; McDonald, L.; Shriver, L.P.; Konopka, M.; Pang, Y. A Fluorescent Flavonoid for Lysosome Detection in Live Cells under “Wash Free” Conditions. *J Mater Chem B*, **2018**, *6*, 5050–5058.
- [50] The Huy, B.; Thangadurai, D.T.; Sharipov, M.; Ngoc Nghia, N.; Van Cuong, N.; Lee, Y.-I. Recent Advances in Turn Off-on Fluorescence Sensing Strategies for Sensitive Biochemical Analysis - A Mechanistic Approach. *Microchemical Journal*, **2022**, *179*, 107511.
- [51] Klymchenko, A.S.; Mely, Yves. Fluorescent Environment-Sensitive Dyes as Reporters of Biomolecular Interactions. In; **2013**; pp. 35–58.
- [52] Liu, B.; McDonald, L.; Liu, Q.; Bi, X.; Zheng, J.; Wang, L.; Pang, Y. A Flavonoid-Based Light-up Bioprobe with Intramolecular Charge Transfer Characteristics for Wash-Free Fluorescence Imaging in Vivo. *Sens Actuators B Chem*, **2016**, *235*, 309–315.
- [53] McDonald, L.; Liu, B.; Taraboletti, A.; Whiddon, K.; Shriver, L.P.; Konopka, M.; Liu, Q.; Pang, Y. Fluorescent Flavonoids for Endoplasmic Reticulum Cell Imaging. *J Mater Chem B*, **2016**, *4*, 7902–7908.
- [54] Bertman, K.A.; Abeywickrama, C.S.; Ingle, A.; Shriver, L.P.; Konopka, M.; Pang, Y. A Fluorescent Flavonoid for Lysosome Imaging: The Effect of Substituents on Selectivity and Optical Properties. *J Fluoresc*, **2019**, *29*, 599–607.
- [55] Zamotaiev, O.M.; Postupalenko, V.Y.; Shvadchak, V. V.; Pivovarenko, V.G.; Klymchenko, A.S.; Mély, Y. Monitoring Penetratin Interactions with Lipid

- Membranes and Cell Internalization Using a New Hydration-Sensitive Fluorescent Probe. *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 7036–7044.
- [56] Serdiuk, I.E.; Reszka, M.; Myszka, H.; Krzyminiński, K.; Liberek, B.; Roshal, A.D. Flavonol-Based Fluorescent Indicator for Determination of  $\beta$ -Glucosidase Activity. *RSC Adv*, **2016**, *6*, 42532–42536.
- [57] Reszka, M.; Serdiuk, I.E.; Kozakiewicz, K.; Nowacki, A.; Myszka, H.; Bojarski, P.; Liberek, B. Influence of a 4'-Substituent on the Efficiency of Flavonol-Based Fluorescent Indicators of  $\beta$ -Glycosidase Activity. *Org Biomol Chem*, **2020**, *18*, 7635–7648.
- [58] Adetunji, A.; Lewu, F.; Mulidzi, A.; Ncube, B. The Biological Activities of  $\beta$ -Glucosidase, Phosphatase and Urease as Soil Quality Indicators: A Review. *J Soil Sci Plant Nutr*, **2017**, *17*, 794–807.
- [59] Butters, T.D. Gaucher Disease. *Curr Opin Chem Biol*, **2007**, *11*, 412–418.
- [60] Zhou, X.; Huang, Z.; Yang, H.; Jiang, Y.; Wei, W.; Li, Q.; Mo, Q.; Liu, J.  $\beta$ -Glucosidase Inhibition Sensitizes Breast Cancer to Chemotherapy. *Biomedicine & pharmacotherapy*, **2017**, *91*, 504–509.
- [61] Lillelund, V.H.; Jensen, H.H.; Liang, X.; Bols, M. Recent Developments of Transition-State Analogue Glycosidase Inhibitors of Non-Natural Product Origin. *Chem Rev*, **2002**, *102*, 515–554.
- [62] Ghani, U.; Nur-e-Alam, M.; Yousaf, M.; Ul-Haq, Z.; Noman, O.M.; Al-Rehaily, A.J. Natural Flavonoid  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors from *Retama Raetam*: Enzyme Inhibition and Molecular Docking Reveal Important Interactions with the Enzyme Active Site. *Bioorg Chem*, **2019**, *87*, 736–742.
- [63] Liu, X.; Li, F.; Su, L.; Wang, M.; Jia, T.; Xu, X.; Li, X.; Wei, C.; Luo, C.; Chen, S.; Chen, H. Design and Synthesis of Novel Benzimidazole-Iminosugars Linked a Substituted Phenyl Group and Their Inhibitory Activities against  $\beta$ -Glucosidase. *Bioorg Chem*, **2022**, *127*, 106016.
- [64] Schröder, S.P.; Wu, L.; Artola, M.; Hansen, T.; Offen, W.A.; Ferraz, M.J.; Li, K.-Y.; Aerts, J.M.F.G.; van der Marel, G.A.; Codée, J.D.C.; Davies, G.J.; Overkleeft, H.S. Gluco-1H-Imidazole: A New Class of Azole-Type  $\beta$ -Glucosidase Inhibitor. *J Am Chem Soc*, **2018**, *140*, 5045–5048.

- [65] Heightman, T.D.; Vasella, A.T. Recent Insights into Inhibition, Structure, and Mechanism of Configuration-Retaining Glycosidases. *Angewandte Chemie International Edition*, **1999**, *38*, 750–770.
- [66] Maurya, A.K.; Mulpuru, V.; Mishra, N. Discovery of Novel Coumarin Analogs against the  $\alpha$ -Glucosidase Protein Target of Diabetes Mellitus: Pharmacophore-Based QSAR, Docking, and Molecular Dynamics Simulation Studies. *ACS Omega*, **2020**, *5*, 32234–32249.
- [67] Filipe, H.A.L.; Moreno, M.J.; Loura, L.M.S. The Secret Lives of Fluorescent Membrane Probes as Revealed by Molecular Dynamics Simulations. *Molecules*, **2020**, *25*, 3424.
- [68] Jurkiewicz, P.; Cwiklik, L.; Jungwirth, P.; Hof, M. Lipid Hydration and Mobility: An Interplay between Fluorescence Solvent Relaxation Experiments and Molecular Dynamics Simulations. *Biochimie*, **2012**, *94*, 26–32.
- [69] Bagatolli, L.A. LAURDAN Fluorescence Properties in Membranes: A Journey from the Fluorometer to the Microscope. In; **2012**; pp. 3–35.
- [70] Osella, S.; Smisdom, N.; Ameloot, M.; Knippenberg, S. Conformational Changes as Driving Force for Phase Recognition: The Case of Laurdan. *Langmuir*, **2019**, *35*, 11471–11481.
- [71] Watanabe, N.; Goto, Y.; Suga, K.; Nyholm, T.K.M.; Slotte, J.P.; Umakoshi, H. Solvatochromic Modeling of Laurdan for Multiple Polarity Analysis of Dihydrosphingomyelin Bilayer. *Biophys J*, **2019**, *116*, 874–883.
- [72] Wilson-Ashworth, H.A.; Bahm, Q.; Erickson, J.; Shinkle, A.; Vu, M.P.; Woodbury, D.; Bell, J.D. Differential Detection of Phospholipid Fluidity, Order, and Spacing by Fluorescence Spectroscopy of Bis-Pyrene, Prodan, Nystatin, and Merocyanine 540. *Biophys J*, **2006**, *91*, 4091–4101.
- [73] Jurkiewicz, P.; Olżyńska, A.; Langner, M.; Hof, M. Headgroup Hydration and Mobility of DOTAP/DOPC Bilayers: A Fluorescence Solvent Relaxation Study. *Langmuir*, **2006**, *22*, 8741–8749.
- [74] Golfetto, O.; Hinde, E.; Gratton, E. Laurdan Fluorescence Lifetime Discriminates Cholesterol Content from Changes in Fluidity in Living Cell Membranes. *Biophys J*, **2013**, *104*, 1238–1247.

- [75] Ladokhin, A.S.; Holloway, P.W. Fluorescence of Membrane-Bound Tryptophan Octyl Ester: A Model for Studying Intrinsic Fluorescence of Protein-Membrane Interactions. *Biophys J*, **1995**, *69*, 506–517.
- [76] Chattopadhyay, A.; Mukherjee, S.; Rukmini, R.; Rawat, S.S.; Sudha, S. Ionization, Partitioning, and Dynamics of Tryptophan Octyl Ester: Implications for Membrane-Bound Tryptophan Residues. *Biophys J*, **1997**, *73*, 839–849.
- [77] Kyrychenko, A.; Tobias, D.J.; Ladokhin, A.S. Validation of Depth-Dependent Fluorescence Quenching in Membranes by Molecular Dynamics Simulation of Tryptophan Octyl Ester in POPC Bilayer. *J Phys Chem B*, **2013**, *117*, 4770–4778.
- [78] Kyrychenko, A.; Wu, F.; Thummel, R.P.; Waluk, J.; Ladokhin, A.S. Partitioning and Localization of Environment-Sensitive 2-(2'-Pyridyl)- and 2-(2'-Pyrimidyl)-Indoles in Lipid Membranes: A Joint Refinement Using Fluorescence Measurements and Molecular Dynamics Simulations. *J Phys Chem B*, **2010**, *114*, 13574–13584.
- [79] Kyrychenko, A.; Sevriukov, I.Yu.; Syzova, Z.A.; Ladokhin, A.S.; Doroshenko, A.O. Partitioning of 2,6-Bis(1H-Benzimidazol-2-Yl)Pyridine Fluorophore into a Phospholipid Bilayer: Complementary Use of Fluorescence Quenching Studies and Molecular Dynamics Simulations. *Biophys Chem*, **2011**, *154*, 8–17.
- [80] Cardoso, R.M.S.; Filipe, H.A.L.; Gomes, F.; Moreira, N.D.; Vaz, W.L.C.; Moreno, M.J. Chain Length Effect on the Binding of Amphiphiles to Serum Albumin and to POPC Bilayers. *J Phys Chem B*, **2010**, *114*, 16337–16346.
- [81] Cardoso, R.M.S.; Martins, P.A.T.; Gomes, F.; Doktorovova, S.; Vaz, W.L.C.; Moreno, M.J. Chain-Length Dependence of Insertion, Desorption, and Translocation of a Homologous Series of 7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-Yl-Labeled Aliphatic Amines in Membranes. *J Phys Chem B*, **2011**, *115*, 10098–10108.
- [82] Coreta-Gomes, F.M.; Vaz, W.L.C.; Moreno, M.J. Effect of Acyl Chain Length on the Rate of Phospholipid Flip-Flop and Intermembrane Transfer. *J Membr Biol*, **2018**, *251*, 431–442.
- [83] Shynkar, V. V.; Klymchenko, A.S.; Duportail, G.; Demchenko, A.P.; Mély, Y. Two-Color Fluorescent Probes for Imaging the Dipole Potential of Cell Plasma Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **2005**, *1712*, 128–136.

- [84] Klymchenko, A.S.; Stoeckel, H.; Takeda, K.; Mély, Y. Fluorescent Probe Based on Intramolecular Proton Transfer for Fast Ratiometric Measurement of Cellular Transmembrane Potential. *J Phys Chem B*, **2006**, *110*, 13624–13632.
- [85] Klymchenko, A.S.; Oncul, S.; Didier, P.; Schaub, E.; Bagatolli, L.; Duportail, G.; Mély, Y. Visualization of Lipid Domains in Giant Unilamellar Vesicles Using an Environment-Sensitive Membrane Probe Based on 3-Hydroxyflavone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **2009**, *1788*, 495–499.
- [86] Shynkar, V. V.; Klymchenko, A.S.; Kunzelmann, C.; Duportail, G.; Muller, C.D.; Demchenko, A.P.; Freyssinet, J.-M.; Mely, Y. Fluorescent Biomembrane Probe for Ratiometric Detection of Apoptosis. *J Am Chem Soc*, **2007**, *129*, 2187–2193.
- [87] Demidov, O.O.; Gladkov, E.S.; Kyrychenko, A.V.; Roshal, A.D. Synthetic and Natural Flavonols as Promising Fluorescence Probes for  $\beta$ -Glucosidase Activity Screening. *Functional Materials*, **2022**, *29*.
- [88] Sharma, P.K.; He, M.; Jurayj, J.; Gou, D.-M.; Lombardy, R.; Romanczy, L.J.; Schroeter, H. Enantioselective Syntheses of Sulfur Analogues of Flavan-3-Ols. *Molecules*, **2010**, *15*, 5595–5619.
- [89] Etter, M.C.; Urbańczyk-Lipkowska, Z.; Baer, S.; Barbara, P.F. The Crystal Structures and Hydrogen-Bond Properties of Three 3-Hydroxy-Flavone Derivatives. *J Mol Struct*, **1986**, *144*, 155–167.
- [90] Yoo, J.S.; Lim, Y.; Koh, D. Crystal Structure of 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-3-Hydroxy-4 H -Chromen-4-One. *Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online*, **2014**, *70*, o999–o1000.
- [91] Demchenko, A.P. *Introduction to Fluorescence Sensing*; Springer International Publishing: Cham, **2015**.
- [92] Skilitsi, A.I.; Agathangelou, D.; Shulov, I.; Conyard, J.; Haacke, S.; Mély, Y.; Klymchenko, A.; Léonard, J. Ultrafast Photophysics of the Environment-Sensitive 4'-Methoxy-3-Hydroxyflavone Fluorescent Dye. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2018**, *20*, 7885–7895.
- [93] White, S.H.; Wimley, W.C.; Ladokhin, A.S.; Hristova, K. Protein Folding in Membranes: Determining Energetics of Peptide-Bilayer Interactions. *Methods Enzymol*, **1998**, *295*, 62–87.

- [94] Isorna, P.; Polaina, J.; Latorre-García, L.; Cañada, F.J.; González, B.; Sanz-Aparicio, J. Crystal Structures of *Paenibacillus Polymyxa*  $\beta$ -Glucosidase B Complexes Reveal the Molecular Basis of Substrate Specificity and Give New Insights into the Catalytic Machinery of Family I Glycosidases. *J Mol Biol*, **2007**, *371*, 1204–1218.
- [95] Goodsell, D.S.; Morris, G.M.; Olson, A.J. Automated Docking of Flexible Ligands: Applications of AutoDock. *Journal of molecular recognition*, **1996**, *9*, 1–5.
- [96] Trott, O.; Olson, A.J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J Comput Chem*, **2010**, *31*, 455–461.
- [97] Lu, H.; Lu, T.; Zu, S.; Duan, Z.; Guang, Y.; Li, Q.; Ma, J.; Chen, D.; Li, B.; Lu, W.; Jiang, H.; Luo, C.; Ye, D.; Chen, K.; Lin, H. Discovery of a Highly Potent CECR2 Bromodomain Inhibitor with 7H-Pyrrolo[2,3-d] Pyrimidine Scaffold. *Bioorg Chem*, **2022**, *123*, 105768.
- [98] Jorgensen, W.L.; Maxwell, D.S.; Tirado-Rives, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J Am Chem Soc*, **1996**, *118*, 11225–11236.
- [99] Jorgensen, W.L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J.D.; Impey, R.W.; Klein, M.L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J Chem Phys*, **1983**, *79*, 926–935.
- [100] Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald: An  $N \cdot \log(N)$  Method for Ewald Sums in Large Systems. *J Chem Phys*, **1993**, *98*, 10089–10092.
- [101] Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H.J.C.; Fraaije, J.G.E.M. LINCS: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations. *J Comput Chem*, **1997**, *18*, 1463–1472.
- [102] Hess, B. P-LINCS: A Parallel Linear Constraint Solver for Molecular Simulation. *J Chem Theory Comput*, **2008**, *4*, 116–122.
- [103] Van Der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A.E.; Berendsen, H.J.C. GROMACS: Fast, Flexible, and Free. *J Comput Chem*, **2005**, *26*, 1701–1718.
- [104] Dyubko, T.S.; Pivovarenko, V.G.; Chekanova, V. V.; Hvozdiuk, Y. V.; Pakhomova, Y.S.; Kompaniets, A.M.; Tatarets, A.L. Study of Polyvinyl Alcohols (9 and 31 KDa) Aggregation in Aqueous Solutions by Fluorescent Probing. *Biophysical Bulletin*, **2020**.

- [105] Pivovarenko, V.G.; Klymchenko, A.S. Fluorescent Probes Based on Charge and Proton Transfer for Probing Biomolecular Environment. *The Chemical Record*, **2024**, *24*.
- [106] Pourmadadi, M.; Shamsabadipour, A.; Aslani, A.; Eshaghi, M.M.; Rahdar, A.; Pandey, S. Development of Polyvinylpyrrolidone-Based Nanomaterials for Biosensors Applications: A Review. *Inorg Chem Commun*, **2023**, *152*, 110714.
- [107] Franco, P.; De Marco, I. The Use of Poly(N-Vinyl Pyrrolidone) in the Delivery of Drugs: A Review. *Polymers (Basel)*, **2020**, *12*, 1114.
- [108] Kurakula, M.; Rao, G.S.N.K. Pharmaceutical Assessment of Polyvinylpyrrolidone (PVP): As Excipient from Conventional to Controlled Delivery Systems with a Spotlight on COVID-19 Inhibition. *J Drug Deliv Sci Technol*, **2020**, *60*, 102046.
- [109] Rusdin, A.; Mohd Gazzali, A.; Ain Thomas, N.; Megantara, S.; Aulifa, D.L.; Budiman, A.; Muchtaridi, M. Advancing Drug Delivery Paradigms: Polyvinyl Pyrrolidone (PVP)-Based Amorphous Solid Dispersion for Enhanced Physicochemical Properties and Therapeutic Efficacy. *Polymers (Basel)*, **2024**, *16*, 286.
- [110] Hädener, M.; Gjuroski, I.; Furrer, J.; Vermathen, M. Interactions of Polyvinylpyrrolidone with Chlorin E6-Based Photosensitizers Studied by NMR and Electronic Absorption Spectroscopy. *J Phys Chem B*, **2015**, *119*, 12117–12128.
- [111] Gjuroski, I.; Girousi, E.; Meyer, C.; Hertig, D.; Stojkov, D.; Fux, M.; Schnidrig, N.; Bucher, J.; Pfister, S.; Sauser, L.; Simon, H.-U.; Vermathen, P.; Furrer, J.; Vermathen, M. Evaluation of Polyvinylpyrrolidone and Block Copolymer Micelle Encapsulation of Serine Chlorin E6 and Chlorin E4 on Their Reactivity towards Albumin and Transferrin and Their Cell Uptake. *Journal of Controlled Release*, **2019**, *316*, 150–167.
- [112] Colombo, M.; Michels, L.R.; Teixeira, H.F.; Koester, L.S. Flavonoid Delivery by Solid Dispersion: A Systematic Review. *Phytochemistry Reviews*, **2022**, *21*, 783–808.
- [113] Senkal, B.F.; Erkal, D.; Yavuz, E. Removal of Dyes from Water by Poly(Vinyl Pyrrolidone) Hydrogel. *Polym Adv Technol*, **2006**, *17*, 924–927.
- [114] Paul, S.; Selvam, S.; Heng, P.W.S.; Chan, L.W. Elucidation of Monomerization Effect of PVP on Chlorin E6 Aggregates by Spectroscopic, Chemometric,

- Thermodynamic and Molecular Simulation Studies. *J Fluoresc*, **2013**, *23*, 1065–1076.
- [115] Fossum, C.J.; Johnson, B.O. V.; Golde, S.T.; Kielman, A.J.; Finke, B.; Smith, M.A.; Lowater, H.R.; Laatsch, B.F.; Bhattacharyya, S.; Hati, S. Insights into the Mechanism of Tryptophan Fluorescence Quenching Due to Synthetic Crowding Agents: A Combined Experimental and Computational Study. *ACS Omega*, **2023**, *8*, 44820–44830.
- [116] Kyrychenko, A.; Korsun, O.M.; Gubin, I.I.; Kovalenko, S.M.; Kalugin, O.N. Atomistic Simulations of Coating of Silver Nanoparticles with Poly(Vinylpyrrolidone) Oligomers: Effect of Oligomer Chain Length. *J. Phys. Chem. C*, **2015**, *119*, 7888–7899.