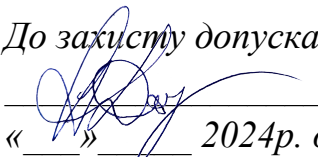


МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В. Н. Каразіна

Кафедра органічної хімії

УДК

До захисту допускаю

 Завідувач кафедри
«___» _____ 2024р. д.х.н., проф. Дорошенко А.О

**ФЛУОРЕСЦЕНТНІ ЗОНДИ НА ОСНОВІ 3-ГІДРОКСИФЛАВОНУ ДЛЯ
ВИВЧЕННЯ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ
ОРГАНІЗОВАНИХ РОЗЧИНІВ**

Кваліфікаційна робота магістра
студентки II курсу
хімічного факультету
**ЛАЗУРЕНКО АЛІНИ
ОЛЕКСАНДРІВНИ**



Науковий керівник
к.х.н., доцент



Л. В. Чепелева

ХАРКІВ 2024

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота містить: 36 ст., 11 рис., 2 табл., 53 використаних джерела.

Мета роботи: провести літературний огляд на тему флуоресцентні зонди на основі 3-гідроксифлавону та їх застосування для дослідження фізико-хімічних властивостей організованих розчинів.

Об'єкт дослідження: флуоресцентні зонди.

Предмет дослідження: вивчення фізико-хімічних властивостей організованих розчинів.

Методи дослідження: бібліографічний метод, контент-аналіз, метод порівняння, метод узагальнення.

Результати та їх новизна: проаналізована та структуровано матеріал згідно теми з метою надання всебічного літературного огляду для подальшого опрацювання та вивчення властивостей флуоресцентних зондів на основі 3-гідроксифлавону.

Ключові слова: ФЛУОРЕСЦЕНТНІ ЗОНДИ, ОРГАНІЗОВАНІ РОЗЧИНИ, 3-ГІДРОКСИФЛАВОН, ПОЛІВІНІЛПІРОЛІДОН, ГЕТЕРОЦИКЛІЧНІ СПОЛУКИ, ОРГАНІЧНИЙ СИНТЕЗ, МОЛЕКУЛЯРНИЙ ДОКІНГ.

ABSTRACT

The qualification paper includes: 36 pages, 11 figures, 2 tables, and 53 references.

Objective: to conduct a literature review on fluorescent probes based on 3-hydroxyflavone's derivatives and their application for the study of physical and chemical properties of organized solutions.

Object of the research: fluorescent probes.

Subject of the research: the study of the physicochemical properties of organized solutions.

Research methods: bibliographic method, content analysis, comparison method, generalization method.

Results and novelty: the material was analyzed and structured according to the topic to provide a comprehensive literature review for further exploration and investigation of the properties of fluorescent probes based on 3-hydroxyflavone.

Keywords: FLUORESCENT PROBES, ORGANIZED SOLUTIONS, 3-HYDROXYFLAVONE, POLYVINYLPYRROLIDONE, HETEROCYCLIC COMPOUNDS, ORGANIC SYNTHESIS, MOLECULAR DOCKING.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП	6
1 ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	8
1.1 Флуоресценція. Загальна характеристика	8
1.2 Флуоресцентні мітки та зонди	9
1.3 Флуоресцентні зонди та їх застосування в фізико-хімічних дослідженнях	13
1.4 Гідрофобно-модифіковані флуоресцентні зонди на основі 3-гідроксифлавонів та їх спектрально-флуоресцентні властивості.....	15
1.5 Дослідження взаємодії флуоресцентних зондів на основі 3-гідроксифлавону з організованим розчином полівінілпіролідону	21
1.6 Молекулярний докінг комплексів флуоресцентний зонд- полівінілпіролідон.....	26
ВИСНОВКИ.....	29
Література	30

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

GFP – зеленого флуоресцентного білка;

ESIPT – перенесення протона в збудженому стані;

ПВП – полівінілпіролідон;

FRET – ферстерівський резонансний перенос енергії;

TOE – гідрофобно модифікований триптофан;

T*– смуга флуоресценції фототаутомерної форми;

N*– смуга флуоресценції збудженої вихідної форми;

ФЗ – флуоресцентні зонди;

ЗГХ – 3-гідроксихромон.

ВСТУП

Організовані розчини, до яких належать мікроемульсії, міцели та інші самозбираючі системи, є важливими в різних галузях науки та техніки, включаючи фармацевтичну технологію, біохімію, хімію матеріалів та нанотехнології.

Флуоресцентні зонди на основі 3-гідроксихромонів є потужними інструментами для дослідження таких систем, оскільки вони мають високу чутливість до змін в середовищі завдяки явищу переносу протону в збудженому стані, що дозволяє реєструвати навіть найменші зміни в структурі та взаємодії молекул.

Вивчення взаємодій між флуоресцентними зондами і організованими розчинами відкриває нові можливості для розуміння молекулярних механізмів, що лежать в основі поведінки таких систем, та їх застосування в різних технологіях, зокрема для розробки нових лікарських засобів або матеріалів.

Дослідження флуоресцентних зондів на основі 3-гідроксихромонів є актуальним, оскільки ці методи дозволяють отримати важливі дані про фізико-хімічні властивості організованих розчинів, що сприяє розвитку нових технологій і розширенню наукових знань у різних галузях.

Мета роботи: провести літературний огляд на тему флуоресцентні зонди на основі 3-гідроксифлавоу та їх застосування для дослідження фізико-хімічних властивостей організованих розчинів.

Завдання роботи:

1. Провести аналіз літературних джерел щодо основних фізико-хімічних та спектрально-люмінесцентних властивостей 3-гідроксифлавоу та його похідних.
2. Описати застосування флуоресцентних зондів для вивчення властивостей організованих розчинів.

3. Проаналізувати поведінку гідрофобно-модифікованих флуоресцентних зондів на основі 3-гідроксифлавону в організованих розчинах.

4. Оцінити перспективи можливого використання гідрофобно-модифікованих флуоресцентних зондів на основі 3-гідроксифлавону в медико-біологічних дослідженнях.

1 ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1 Флуоресценція. Загальна характеристика

Флуоресценція — це явище, при якому речовина поглинає світло або інше електромагнітне випромінювання певної довжини хвилі і випромінює світло довшої хвилі. Випромінювання світла відбувається майже миттєво після поглинання, зазвичай у межах наносекунд після збудження, отже є досить короткотривалим [1].

Флуоресценція широко використовується у прикладних дослідженнях у сферах біології та біомедицини [2-5]. Це явище характеризується тим, що флуорофор (речовина, здатна до флуоресценції) поглинає квант світла, а згодом випромінює інший квант із відмінними властивостями.

Застосування методів, що базуються на флуоресценції, стало важливим стимулом для розвитку багатьох галузей, таких як біофізика, молекулярна та клітинна біологія.

Особливо для біофізиків флуоресценція є ефективним інструментом для чутливого та швидкого аналізу їх функцій, структури, а також можливих динамічних змін макромолекул, зокрема нуклеїнових кислот і білків.

Флуоресценція стала потужним стимулом для розвитку клітинної біології. Використання конфокальної флуоресцентної мікроскопії та створення нових флуоресцентних міток на основі зеленого флуоресцентного білка (GFP) і його аналогів дозволили отримувати висококонтрастні зображення та фотографії з високою роздільною здатністю, що відображають внутрішньоклітинні білкові структури.

Флуорофори, тобто речовини, які можуть світитися під впливом світла, змінюють свою електронну структуру в залежності від оточення. Наприклад, їхні властивості змінюються через взаємодію з розчинником (водневі зв'язки), утворення комплексів із іонами металів або іншими аналітами, а також при асоціації чи іонізації. Ці зміни впливають на характеристики

флуоресценції, зокрема на зміщення спектральних смуг (зміна кольору світіння) та зміну інтенсивності випромінювання – підвищення або зниження яскравості.

Такі явища, які називають сольватофлуорохромними, металофлуорохромними чи галофлуорохромними ефектами, використовують для створення флуоресцентних індикаторів. Вони чутливі до іонів металів, змін рівня рН, полярності або ступеня зволоженості середовища.

Флуоресцентні методи аналізу мають високу чутливість (до 10^{-10} моль/л), а обладнання для вимірювання флуоресценції є відносно доступним за ціною. Це пояснює, чому розробка нових флуоресцентних барвників, індикаторів і сенсорів (зондів), а також методик їх використання, привертає все більшу увагу.

Створення флуоресцентних зондів — сполук, які змінюють свою флуоресценцію під час взаємодії з конкретними молекулами, стало однією з важливих наукових розробок. Це відкриття не лише дозволило детально аналізувати хімічний склад живих клітин і організмів, а й відстежувати його динамічні зміни у просторі й часі. Завдяки таким зондам стало можливим вивчення ключових біохімічних процесів, включаючи передачу сигналів, метаболічні реакції та функціонування органел.

Флуоресцентні зонди також стали важливим інструментом для діагностики захворювань і моніторингу терапевтичного впливу в реальному часі. Їхнє застосування у молекулярній візуалізації (*molecular imaging*) сприяло значному прогресу в клітинній біології, медичних дослідженнях і біоінженерії, відкриваючи нові можливості для точного вивчення складних біологічних систем [6].

1.2 Флуоресцентні мітки та зонди

Флуоресцентні білки виступають як найбільш поширені флуоресцентні мітки у молекулярній та клітинній біології. Застосування GFP (зелений

флуоресцентний білок) для мічення білків (*GFP-tagging*) стало стандартною процедурою у дослідженнях функцій та структури білків у різноманітних за своєю природою модельних організмах [7].

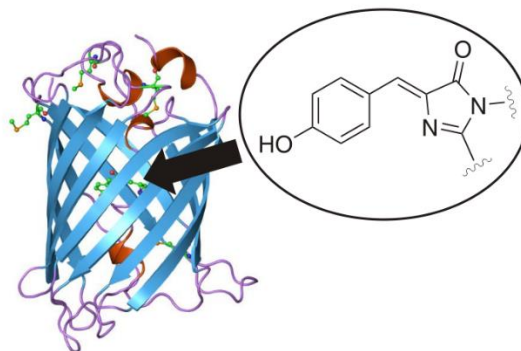


Рисунок 1.1 Тривимірна модель зеленого флуоресцентного білка та хімічна формула його флуорофору

Сьогодні поєднання технологій селективного мічення білків GFP, автоматизованої високопродуктивної мікроскопії та комп'ютерного аналізу зображень дозволяє паралельно вивчати локалізацію та функціонування одразу декількох сотень молекул білків.

Білки, які мають свою власну флуоресценцію, не можуть бути безпосередньо використані в якості флуоресцентних міток для дослідження нуклеїнових кислот. Щоб зробити «помітними» ДНК і РНК із застосуванням таких білкових міток, використовують специфічну стратегію [8]. У послідовність нуклеїнової кислоти вводять ділянку, здатну селективно зв'язуватися з певним білком (наприклад, репресором чи фактором транскрипції), який заздалегідь мітять флуоресцентним білком. Такий маркований білок зв'язується зі своєю мішенню, визначаючи її розташування у просторі.

Одним із практичних застосувань даного підходу є використання GFP-зв'язаного λ -репресора для візуалізації ДНК в еукаріотичних клітинах [9] або візуалізація РНК за допомогою системи λ N [10].

Флуоресцентні зонди активно використовуються для вивчення біологічних процесів на молекулярному рівні. Згідно з назвою, флуоресцентний зонд має на меті надавати досліднику інформацію про умови середовища, в якому він перебуває.

Флуоресцентні зонди — це спеціальні молекули або наночастинки, які використовуються для виявлення та вивчення біологічних, хімічних чи фізичних процесів за допомогою флуоресцентного сигналу. Ці зонди здатні вибірково реагувати з певними молекулами чи структурами, змінюючи інтенсивність або спектр свого світіння, під час зв'язування зі своєю мішенню.

Флуоресцентні зонди слугують ефективним засобом з метою візуалізації та кількісного оцінювання розподілу речовин, таких як сигнальні молекули, у клітинах [11].

Флуоресцентний зонд формується з двох ключових елементів [12]:

- 1) рецептора, який взаємодіє з молекулою, що підлягає визначенню (аналіт);
- 2) флуорофору, який реагує на зміни навколишнього середовища, викликаючи при цьому зміни у флуоресценції.

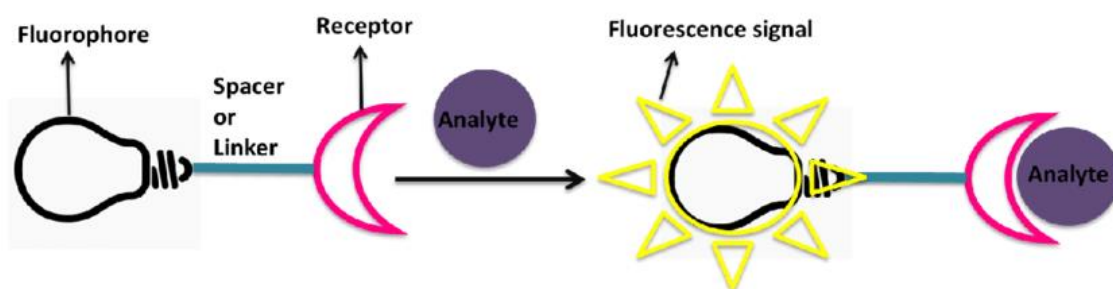


Рисунок 1.2 Схематичне зображення типового флуоресцентного зонда [12]

Даний зонд може змінювати свою флуоресценцію різними способами при взаємодії з аналітом. На рисунку 1.3 показано, що інтенсивність

флуоресценції – збільшується (A), зменшується (B), чи змінюватися один із параметрів, в даному випадку змінює забарвлення (C).

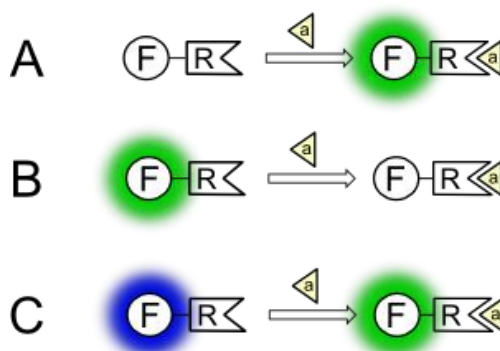


Рисунок 1.3 Варіанти флуоресцентної відповіді взаємодії зонду з аналітом

У певних випадках флуоресцентні зонди реагують не на присутність певної хімічної речовини, а на зміни саме фізичних параметрів самого середовища, в якому вони перебувають (наприклад: температура, полярність, в'язкість).

Один із важливих прикладів — це сольватохромні флуоресцентні барвники, які змінюють колір своєї флуоресценції в залежності від полярності навколишнього середовища [13]. Вони стали ключовим інструментом для вивчення ліпідного складу та процесу фазових переходів у мембранах клітин.

Сольватохромні барвники становлять великий клас чутливих до середовища зондів, які змінюють свій колір у відповідь на полярність. Загалом, це барвники типу push-pull із внутрішньомолекулярним переносом заряду. Випромінювання їх високополяризованого збудженого стану зміщується в червоний колір у більш полярних розчинниках.

Внутрішньомолекулярний перенос протонів у збудженому стані є другою ключовою концепцією розробки ефективних сольватохромних барвників, які реагують на мікрооточення зміною відносної інтенсивності

двох емісійних таутомерних форм. Завдяки своїй чутливості до полярності та гідратації сольватохромні барвники успішно застосовуються до біологічних мембран для вивчення ліпідних доменів (рафтів), апоптозу та ендоцитозу. Як флуоресцентні мітки, сольватохромні барвники можуть виявляти практично будь-який тип біомолекулярних взаємодій, за участю білків, нуклеїнових кислот і біомембран, оскільки подія зв'язування виключає локальні молекули води з місця взаємодії [13].

З іншого боку, флуорогенні зонди зазвичай використовують внутрішньомолекулярне обертання (зміну конформації) як концепцію дизайну, головними представниками яких є молекулярні ротори. Ці зонди були особливо ефективними для візуалізації в'язкості та порядку ліпідів у біомембранах, а також для освітлення біомолекулярних мішеней, таких як антитіла, аптамери та рецептори. Нові концепції досягнення флуорогенної відповіді на мікрооточення включають ізомеризацію в основному стані, гасіння, спричинене агрегацією, та емісію, спричинену агрегацією.

Випромінювання, викликане агрегацією, поєднує розпізнавання мішеней з утворенням високофлуоресцентних агрегатів барвників. Загалом, сольватохромні та флуорогенні зонди дають змогу створювати біозображення без фону в умовах без змивання, а також кількісний аналіз у поєднанні з передовою мікроскопією, такою як флуоресцентне життя (FLIM) і раціометричне зображення [13].

Таким чином, можна сказати, що останніми роками флуоресцентні зонди набули статусу незамінного інструменту для дослідження живих клітин, надаючи клітинній біології нові швидкі й точні методи кількісного аналізу [14-15].

1.3 Флуоресцентні зонди і їх застосування в фізико-хімічних дослідженнях

Флуоресцентні зонди (ФЗ) є важливими інструментами для дослідження біологічних систем, оскільки вони дозволяють отримувати цінну інформацію

про різноманітні фізико-хімічні властивості середовища, молекулярні структури та метаболічні процеси. Вони чутливі до змін полярності, в'язкості, гідратації, а також здатні виявляти зміни у структурах молекул і молекулярних комплексів при взаємодії з біологічними молекулами. Окрім того, зонди використовуються для вивчення реакційної здатності сполук у метаболізмі, що дозволяє аналізувати біохімічні процеси та оцінювати ферментативну активність. Завдяки своїй високій чутливості та універсальності, флуоресцентні зонди є незамінними у молекулярній біології, біохімії та біофізиці.

Розробка флуоресцентних сенсорів для вивчення механізмів роботи біологічних систем на клітинному та субклітинному рівнях стала окремим напрямком у хімії флуорофорів. Цій темі присвячено багато наукових статей, оглядів та монографій [16-18].

Методи застосування флуоресцентних зондів у таких галузях, як молекулярна біологія, біохімія та біофізика, надзвичайно широкі. Проте варто виділити кілька ключових напрямків їх використання, які заслуговують на особливу увагу.

Флуоресцентні зонди найчастіше застосовують для визначення фізико-хімічних характеристик середовища, таких як полярність, в'язкість чи ступінь гідратації. Вони дозволяють досліджувати стан клітинних мембран і органел, зокрема мітохондрій, під впливом різних факторів, які впливають на роботу клітини як цілісної системи [19-20]. Крім того, ці зонди використовують для аналізу чистоти органічних розчинників та ефективності кріопротекторів [21-23].

Флуоресцентні зонди також широко використовуються для дослідження будови окремих молекул і молекулярних комплексів. Їхні флуоресцентні характеристики змінюються при взаємодії з біологічними молекулами, такими як ДНК, білки чи аденозин-фосфорні кислоти [24-25]. Завдяки цьому зонди дозволяють виявляти зміни конформації досліджуваних біологічних

структур, що допомагає пояснити їхню реакційну здатність, включаючи каталітичну активність.

Особливо ефективним є застосування зондів у методі ферстерівського резонансного переносу енергії (FRET). Цей метод дає змогу оцінювати зміни конформації макромолекул при переміщенні їхніх частин у просторі на відстані лише кількох ангстрем. Такі вимірювання недосяжні навіть для найсучасніших електронних мікроскопів, що мають досить високу роздільну здатність [26].

Ще один цінний напрямок використання ФЗ – дослідження реакційних здатностей речовин, які беруть участь у метаболізмі біологічних об'єктів. У таких дослідженнях можуть аналізувати як сукупність біохімічних процесів в організмі, так і окремі хімічні реакції. Так, для прикладу, зметою загального аналізу біохімічної активності часто використовують 3,6-діацетоксифлуоран. Ця сполука сама по собі не флуоресцентна, при введенні в тканинні структури, метаболічна активність не відбувається, тому зразок – невидимий. Але у живих тканинах, під впливом гідролазних ферментів, відбувається процес деацетилювання і молекула набуває світіння під дією ультрафіолетового випромінювання [27-28].

Реакції зондів із певними ферментами дозволяють досліджувати кількісні характеристики їхньої активності, зокрема кінетичні й термодинамічні параметри біохімічних процесів [29].

1.4 Гідрофобно-модифіковані флуоресцентні зонди на основі 3-гідроксифлавонів та їх спектрально-флуоресцентні властивості

Гідрофобно-модифіковані флуоресцентні зонди відіграють важливу роль в сучасній біомедицині та хімії саме через свою специфічність, високочутливість та завдяки здатності вибірково ідентифікувати біомолекули. Вони застосовуються для дослідження молекулярних

механізмів біологічних процесів, надаючи можливість точно візуалізувати та кількісно аналізувати різні біологічні мішені.

Гідрофобна модифікація сприяє проникненню зондів у клітинні мембрани та допомагає взаємодіяти з гідрофобними частинами біомолекул, тим самим підвищуючи їх ефективність та покращуючи точність під час визначення цільових молекул. Окрім цього, такі зонди знижують рівень фонового сигналу та покращують співставлення сигнал/шум, яке критично важливим для точного аналізу та візуалізації.

У медичній діагностиці ці зонди використовуються для відстеження онкологічних захворювань на ранньому етапі саме через можливість взаємодіяти з конкретними біомаркерами, забезпечуючи високу точність і чіткість зображення ракових клітин. Останні дослідження також вивчають їх застосування у терапії, наприклад, з метою цільової доставки лікарських засобів та моніторингу їх фармакодинаміки та фармакокінетики в реальному часі.

Тому можна сказати, що саме гідрофобно-модифіковані флуоресцентні зонди є багатогранними інструментами, що надають нові можливості для біомедичних досліджень і клінічного використання.

Гідрофобна модифікація ФЗ часто застосовується біофізиками для дослідження клітинних мембран [31]. Так, для прикладу, Prodan та Laurdan – зонди були застосовані для спостереження за змінами розподілу зарядів в ліпідних бішарах, для кількісного визначення вмісту холестерину низької щільності в клітинах [32-35]. Ще один приклад – застосування гідрофобно-модифікованого триптофану (ТОЕ) з метою дослідження взаємодії на рівні білків з мембранами [36-37].

Жирні алкільні радикали є ефективною альтернативою ароматичним флуорофорам, таким як пірен, 1,6-дифеніл-1,3,5-гексатриєн, нафталін (рис. 1.4), для гідрофобної модифікації у дослідженні білків. Їх здатність до зв'язування з біомолекулами в значній мірі визначається довжиною карбонового ланцюга і ступенем його розгалуженості [38-39].

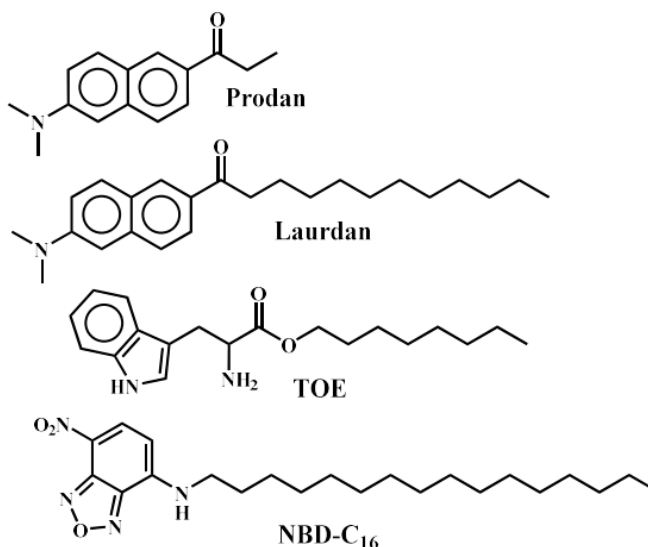


Рисунок 1.4 Гідрофобно-модифіковані флуоресцентні зонди [30]

Гідрофобно-модифіковані зонди на основі флавонолів описані в літературі, відзначається, що вони демонструють хорошу селективність і чутливість при дослідженні біологічних об'єктів. Взагалі, похідні флавонолу мають цікаві фотохімічні і фотофізичні властивості: в електронно-збудженому стані цих сполук відбувається внутрішньомолекулярний перенос протона (ESIPT – excited state intramolecular proton transfer), тобто, фототаутомеризація. В наслідок перебігу цього процесу для сполук даного класу характерна двохсмугова флуоресценція, що є досить рідкісним явищем.

У молекулах похідних 3-гідроксифлавонолу спектр флуоресценції завдяки процесу внутрішньомолекулярного переносу протону в збудженому стані (ESIPT) демонструє дві чітко розділені полоси випромінювання. Ці полоси відповідають нормальній і фототаутомерній формам молекули. Їхнє положення і співвідношення інтенсивностей можуть змінюватися під впливом різних факторів, таких як зміни в будові 3-гідроксифлавонового хромофору (ЗНС) або зміни в природі та полярності середовища [40].

Полоса випромінювання збудженої основної форми флавонолів N* розташована в короткохвильовій (блакитній) області спектру. Полоса

флуоресценції фототаутомеру T^* знаходиться в більш довгохвильовій області (зеленій, жовтій або помаранчевій) [36].

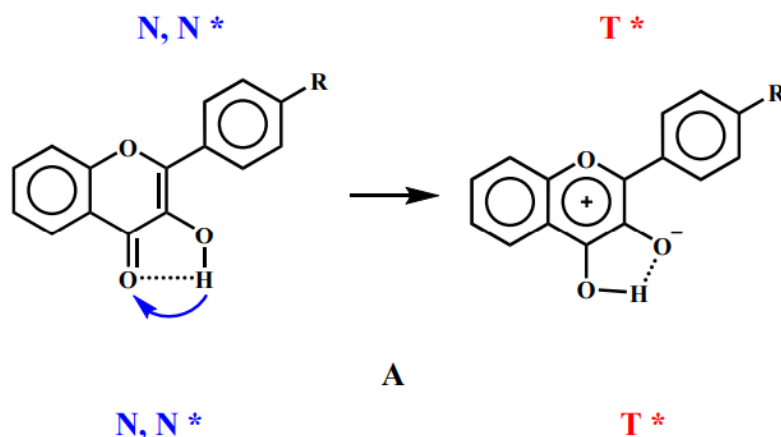


Рисунок 1.5 Процес внутрішньомолекулярного переносу протону (ESIPT) в флавонолах: N – нормальна форма в основному стані, N^* – нормальна форма в електронно-збудженому стані, фототаутомерна форма (T^*) [30].

Ефективність процесу ESIPT залежить від замісників в фенільному радикалі в положенні 2 молекули флавонола. За наявності електродонорних груп у положенні 4' (рис.1.5) фотоперенос протону значно сповільнюється і обидві форми – нормальна і фототаутомер - випромінюють флуоресценцію. Ці дві полоси випромінювання є дуже чутливими до природи середовища, що їх оточує, а також до різного роду взаємодій з іншими молекулами або частинками. Завдяки таким властивостям флавоноли використовують в якості флуоресцентних зондів в медико-біологічних дослідженнях [41].

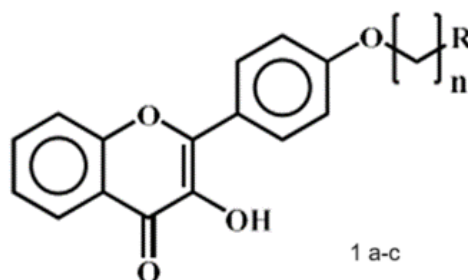


Рисунок 1.6 Загальна структурна формула об'єктів дослідження: **1a-c** ($n = 1,5,11$, $R = \text{COOH}$); **1d, e** ($n = 5,11$, $R = \text{CH}_3$).

Для оцінки впливу алкільної або алкілкарбоксильної групи на спектральні характеристики сполук **1(a–e)** було проведено спектральні дослідження в розчинниках різної природи (протонних, апротонних) та різної полярності.

Таблиця 1.1

Спектрально-флуоресцентні властивості досліджуваних сполук в розчинниках різної природи [30]

Сполука	Розчинник	$\lambda_{\text{UV}}^{\text{max}}$, нм	$\lambda_{\text{fl}}^{\text{max}}$, нм*	ν_{st} , cm^{-1} *	Φ_f
4'-метокси-флавонол	вода	354	438/540	5420/9730	0.052
	метанол	355	432/539	5020/9620	0.054
	ацетонітрил	348	426/541	5300/10280	0.059
1a	вода	353	451/541	6155/9845	0.14
	метанол	359	435/533	4865/9160	0.13
	ацетонітрил	347	422/533	5120/10055	0.16
	толуен	352	421/534	5120/10055	0.64
	циклогексан	347	418/530	4895/9950	0.71
1b	вода	355	445/542	5700/9720	0.19
	метанол	358	453/533	4945/9170	0.12
	ацетонітрил	350	442/534	4875/9845	0.09
	толуен	354	421/534	4495/9520	0.52
	циклогексан	351	420/533	4680/9730	0.61
1c	вода	349	439/532	5875/9855	0.11
	метанол	357	436/532	5075/9215	0.10
	ацетонітрил	350	421/534	4875/9845	0.09
	толуен	352	419/534	4495/9520	0.43
	циклогексан	352	419/532	4540/9610	0.49
1d	вода	365	444/534	4670/8670	0.04
	метанол	355	440/532	4670/8670	0.10
	ацетонітрил	350	422/532	4875/9775	0.08
	толуен	352	419/533	4875/9775	0.46
	циклогексан	351	419/532	4655/9610	0.62
1e	вода	364	439/532	4695/8675	0.05
	метанол	355	434/531	5050/9260	0.11
	ацетонітрил	350	422/532	4875/9810	0.09
	толуен	355	421/533	4415/9410	0.50
	циклогексан	351	421/532	4740/9690	0.69

Також спектральні характеристики порівнювались з давно відомими і добре дослідженими сполуками, які мають аналогічну будову хромофору -

незаміщеним 3-гідроксифлавоном та 4'-метоксифлавонолом (таблиця 1.1) [30, 42, 43].

При порівнянні з 4'-метоксифлавонолом стає очевидним, що поява оксигексильного (сполука **1d**) і оксидодецильного (сполука **1e**) радикалів, або алкілкарбоксильних замісників (сполуки **1a**, **1b**, **1c**), не впливає на будову 3-гідроксихромонового хромофора. Це пояснюється відсутністю електронного супряження у цих замісниках. Як результат, спектри поглинання та флуоресценції цих сполук (**1a–1e**) залишаються подібними до спектрів 4'-метоксифлавонолу (рисунок 1.7, таблиця 1.1) [30].

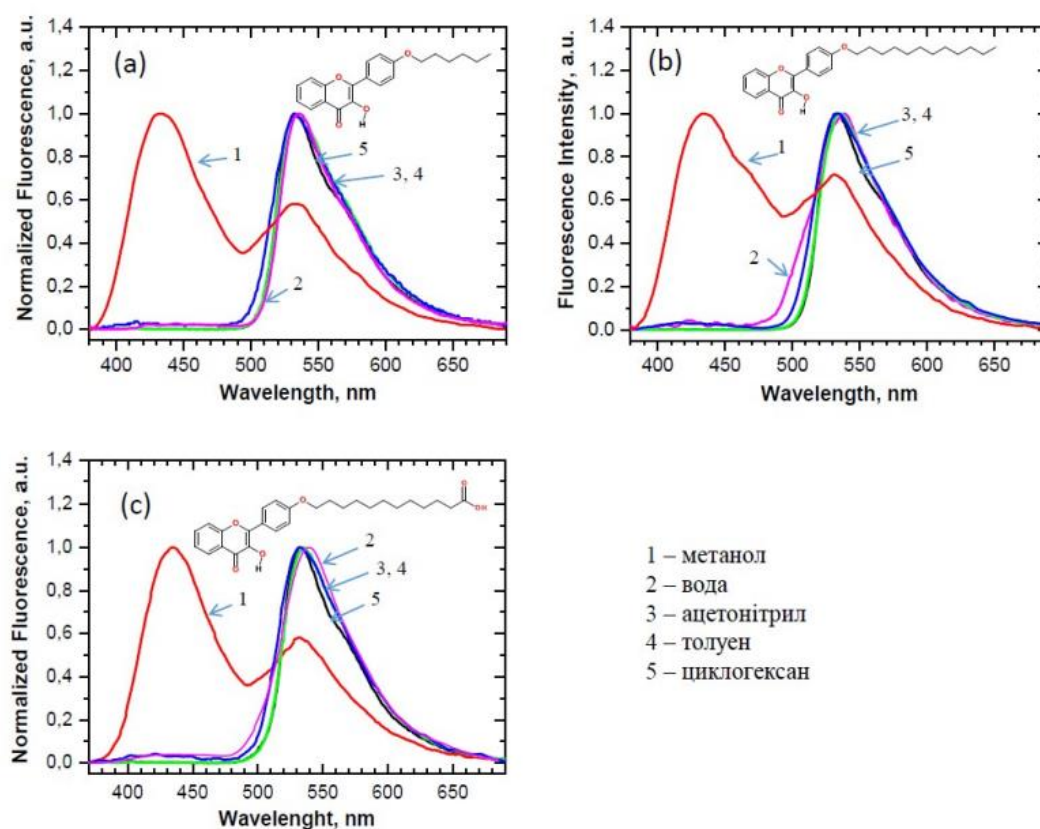


Рисунок 1.7 Спектри флуоресценції сполук **1d** (a), **1e** (b) та **1c** (c) у розчинниках різної природи [30]

Спектр флуоресценції флавонолів сильно змінюється залежно від полярності розчинника, тобто, флавоноли демонструють виражений сольватофлуорохромний ефект [44]. Для сполук **1c**, **1d** і **1e** спектри флуоресценції вимірю-

валися у розчинниках різної природи (протонних, апротонних) та різної полярності (рисунок 1.7) [30].

У метанолі виявлено дві смуги флуоресценції – нормальної та таутомерної форм. У воді та ацетонітрилі інтенсивність смуги флуоресценції нормальної форми є низькою. У слабополярних розчинниках, таких як циклогексан і толуен, наявна тільки смуга випромінювання фототаутомеру, оскільки смуга нормальної форми зникає через швидке утворення таутомеру в збудженому стані.

Для розрахунку Стоксових зсувів флуоресценції обчислювали різницю в положенні максимумів довгохвильової смуги поглинання та смуги випромінювання (в хвильових числах, см^{-1}). Значення Стоксових зсувів фототаутомерів є високими, порядку 9000 см^{-1} (табл. 1.1). Це характерно для флавонолів, оскільки фототаутомер не існує у основному стані, і тому для розрахунку Стоксового зсуву використовується положення смуги нормальної форми.

Квантові виходи флуоресценції зондових сполук (**1b–1e**) значно нижчі в полярних розчинниках, таких як вода, метанол і ацетонітрил, порівняно зі слабо полярними середовищами, такими як циклогексан і толуол (таблиця 1.1) [30]. Результати дослідження показали, що довгі алкільні замісники у сполуках (**1b–1e**), які не входять до складу хромофорної системи молекул, не змінюють їх спектральні параметри порівняно з 4'-метоксифлавонолом (таблиця 1.1, рисунок 1.7) [30]. Таким чином, можна припустити, що спектральні властивості цих сполук у гетерогенному середовищі, а також під час зв'язування з біополімерами, ферментами, ліпідними бішарами будуть прогнозованими [45].

1.5 Дослідження взаємодії флуоресцентних зондів на основі 3-гідроксифлавону з організованим розчином полівінілпіролідону

Флуоресцентні зонди з переносом протону, що базуються на 3-гідроксифлавонолі, мають великий потенціал для дослідження фізико-хімічних власти-

востей організованих розчинів і для визначення структурно-динамічних характеристик полімерів та біомакромолекул.

Оскільки флавоноли та їх похідні застосовують у якості зондів для дослідження активності ферментів, то експерименти проводяться в водних розчинах, де інтенсивність флуоресценції флавонолів понижена. Вода утворює міжмолекулярні водневі зв'язки з гідроксильною групою в положенні 3 та карбонільною групою молекули флавонолу, які створюють конкуренцію утворенню внутрішньомолекулярних водневих зв'язків, необхідних для перебігу процесу ESIPT. Крім того, підвищення полярності середовища збільшує енергетичний бар'єр для ESIPT, що зменшує концентрацію фототаутомеру. У сукупності ці фактори суттєво знижують загальну інтенсивність флуоресценції індикаторних сполук.

Одним із способів покращення спектральних характеристик флавонолів є застосування гетерогенних середовищ, таких як двофазні системи вода/органічний розчинник або мікрогетерогенні системи, наприклад, колоїдні розчини, ліпосоми чи полімерні розчини. У таких середовищах флавоноли переміщуються в менш гідратовану та менш полярну органічну фазу, що значно підвищує ефективність процесу ESIPT.

Для дослідження взаємодії флуоресцентних зондів із гетерогенними системами було використано водний розчин полівінілпіролідону (ПВП). Полівінілпіролідон (ПВП) – розчинний у воді полімер, ланцюг якого складається із простих ланок N-вінілпіролідону (рис. 1.8).

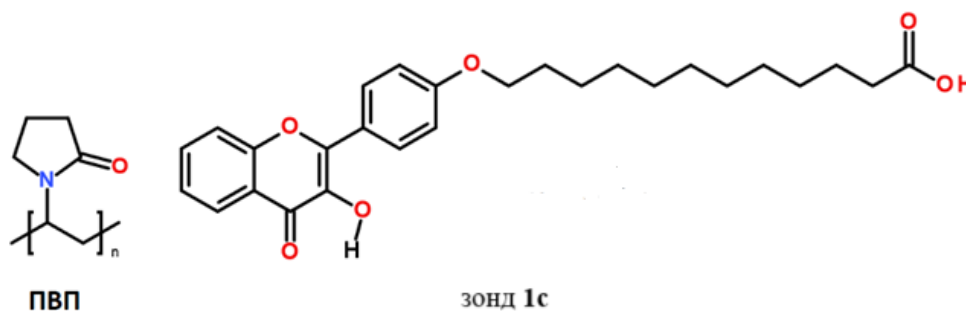


Рисунок 1.8 Структурні формули полівінілпіролідону й зонду 1с

Полівінілпіролідон (ПВП) — це синтетичний полімер, який отримують шляхом полімеризації вінілпіролідону. Завдяки своїм гідрофільним властивостям, ПВП має високу розчинність у воді та органічних розчинниках різної полярності [34]. Ці характеристики зумовлюють його значні абсорбційні властивості та стабілізуючий ефект, що робить його популярним у фармацевтиці, косметології та інших галузях [46-47].

ПВП також застосовується як солюбілізатор та транспортний засіб для біологічно активних молекул, який значно підвищує їх стабільність і запобігає утворенню агрегатів. Завдяки своїй здатності утворювати стабільні аморфні матриці з водонерозчинними органічними сполуками, він допомагає уникати їх кристалізації. Ці властивості ПВП дозволяють використовувати його як адсорбент для видалення органічних барвників з води [48-52].

Цей біосумісний і нетоксичний полімер широко застосовується в медицині та біології завдяки своїй здатності у високих концентраціях утворювати у воді ліпофільні агрегати з нижчою локальною полярністю порівняно з водною фазою, що дозволяє ефективно адсорбувати водонерозчинні органічні молекули, наприклад, органічні барвники і низькомолекулярні ліганди з технологічних розчинів.

В роботах [30, 45] було проведено дослідження взаємодії флуоресцентних зондів 2-(4-(11-карбокси)-пентилоксі)феніл-3-гідроки-4Н-хромен-4-она (сполука **1b**) та 2-(4-(11-карбокси)-ундецилоксі)феніл-3-гідроки-4Н-хромен-4-она (сполука **1c**) з полівінілпіролідонем при різних концентраціях полімеру.

Дослідження проводили за допомогою флуоресцентної спектроскопії та молекулярного докінгу.

Взаємодія зонда 1c з ПВП

При низькій концентрації полімеру:

Для приготування водного розчину зонда аліквоту (20 мкл) його розчину в ДМСО розчинили в 2 мл фосфатного буферного розчину (рН 6.86). Конце-

нтрація отриманого розчину флавонола становила $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л. До досліджуваного розчину додавали аліквоти розчину ПВП в буферному розчині, після додавання кожної аліквоти записували спектри поглинання і флуоресценції (рис. 1.9) [30, 45].

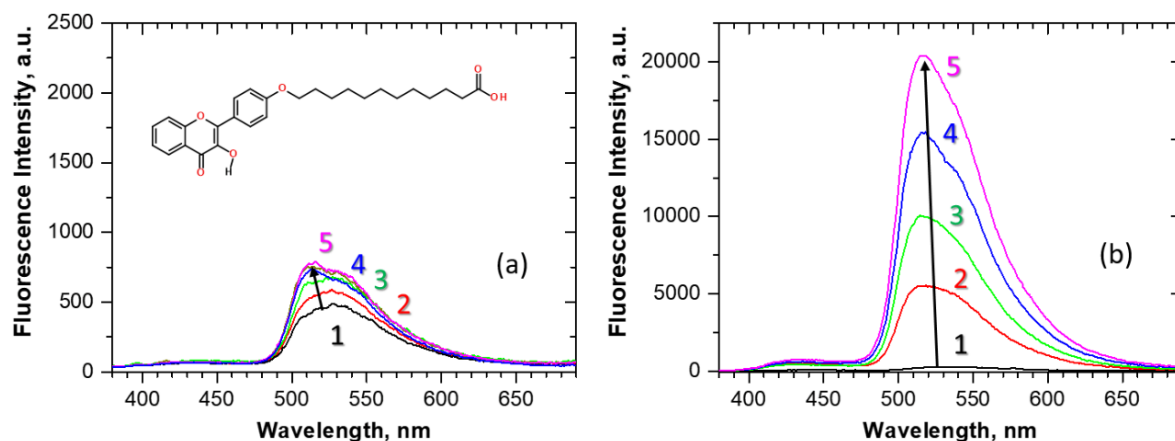


Рисунок 1.9 Флуоресцентне титрування з використанням зонда **1c** у буферному водному розчині (рН 6.86) в присутності ПВП: *a*) в розведеному розчині полівінілпіролідону: 1 – без полімеру, $C(1c) = 2.0E-5$ М. При додаванні полімеру, 2 – $C_{PVP} = 1.0E-5$ М, 3 – $C_{PVP} = 4.4E-7$ М, 4 – $C_{PVP} = 4.1E-6$ М, 5 – $C_{PVP} = 2.1E-5$ М; *b*) в концентрованому розчині полівінілпіролідону: 1 – без полімеру, $C(1c) = 1.1E-5$ М. При додаванні полімеру ($C_{PVP} = 2.1E-5$ М): 2 – $C(1c) = 1.1E-5$ М, 3 – $C(1c) = 2.2E-5$ М, 4 – $C(1c) = 3.2E-5$ М, 5 – $C(1c) = 4.2E-5$ М [30, 45].

З наведених спектрів (рис. 1.9, *a*) видно, що додавання ПВП до розчину призводить до незначного підвищення інтенсивності флуоресценції таутомерної форми при 530 нм. Збільшення інтенсивності супроводжується гіпсохромним зсувом максимуму смуги з 530 нм до 513 нм.

При високій концентрації полімеру:

Для приготування вихідного розчину зонда аліквоту (10 мкл) його розчину в ДМСО розчинили в 2 мл розчину ПВП (концентрація $2.3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) в фосфатному буфері (рН 6.86). Концентрація отриманого розчину флавонола становила $1 \cdot 10^{-5}$ М. Потім до вихідного розчину додавали аліквоти розчину

зонда (**1c**) в ДМСО, після додавання кожної аліквоти записували спектри поглинання і флуоресценції.

При поступовому додаванні розчину сполуки (**1c**) до розчину ПВП спостерігалось значне зростання флуоресценції зонда (рис. 1.9, *b*). Це явище можна пояснити переходом молекул зонда, що містять довгий гідрофобний алкільний замісник, з полярного водного розчину в неполярне гідрофобне середовище біополімеру, де відбувається підвищення флуоресценції. Результат корелює з даними сольватофлуорохромних досліджень, які показують зростання квантових виходів флуоресценції при зниженні полярності розчинника. Подібну поведінку демонструють також зонди на основі 3-гідроксифлавонолу у розчинах білків, таких як альбумін.

Взаємодія зонда **1b** з ПВП

Для приготування вихідного розчину зонда аліквоту (10 мкл) його розчину в ДМСО розчинили в 2 мл розчину ПВП (концентрація $2.3 \cdot 10^{-3}$ моль/л) в фосфатному буфері (рН 6.86). Концентрація отриманого розчину флавонолу становила $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Потім до вихідного розчину додавали аліквоти розчину зонда (**1c**) в ДМСО, після додавання кожної аліквоти записували спектри поглинання і флуоресценції. Для порівняння записували спектри розчинів сполуки (**1b**) в буферному розчині з аналогічними концентраціями зонду.

Як видно на рисунку 1.10, спектр сполуки (**1b**) в буферному розчині містить лише смугу випромінювання основної форми (крива **6**), оскільки в полярному водному середовищі утворення фототаутомеру не відбувається. При розчиненні зонду в розчині полімеру в спектрі з'являється смуга випромінювання фототаутомеру (рисунок 1.10). Це свідчить про те, що молекули флавонолу зв'язуються з полімерною матрицею, в гідрофобних кишнях якої відбувається утворення фототаутомеру. Але, на відміну від зонду (**1c**), в спектрі якого спостерігається лише випромінювання фототаутомеру, а смуга основної форми відсутня, зв'язування сполуки (**1b**) з полімерною матрицею є менш ефективним.

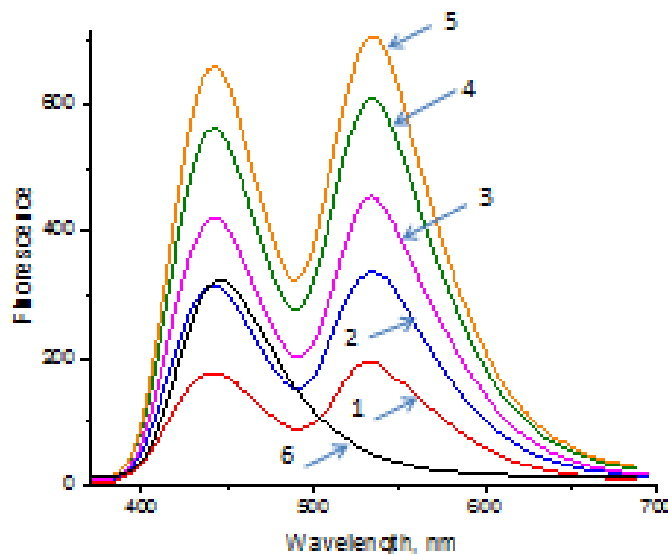


Рисунок 1.10 Флуоресцентне титрування водного розчину ПВП ($C_{\text{ПВП}} = 2.3 \cdot 10^{-3}$ моль/л, рН 6.86) додаванням мікроаліквот розчину зонда (**1b**) в ДМСО: 1 – $C(\mathbf{1b}) = 1.0 \cdot 10^{-5}$ М, 2 – $C(\mathbf{1b}) = 2.3 \cdot 10^{-5}$ М, 3 – $C(\mathbf{1b}) = 3.4 \cdot 10^{-5}$ М, 4 – $C(\mathbf{1b}) = 4.5 \cdot 10^{-5}$ М, 5 – $C(\mathbf{1b}) = 5.6 \cdot 10^{-5}$ М, 6 – за відсутності ПВП, $C(\mathbf{1b}) = 1.0 \cdot 10^{-5}$ М.

1.6 Молекулярний докінг комплексів флуоресцентний зонд-полівінілпіролідон

Вивчення молекулярних аспектів утворення стійких адуктів барвників з полімерами в літературі здійснювалося за допомогою спектральних методів і молекулярного моделювання. Саме тому, з метою дослідження структурно-енергетичних характеристик утворення адуктів зонда та ПВП були проведені комп'ютерні розрахунки за допомогою методу молекулярного докінгу.

Для моделювання були обрані дві конформації ПВП з різними ступенями полімеризації: 100 (один розгорнутий ланцюг полімеру, ПВП100) та 1440 (згорнута глобула, ПВП1440), що зображено на рисунку 1.11 [30, 45]:

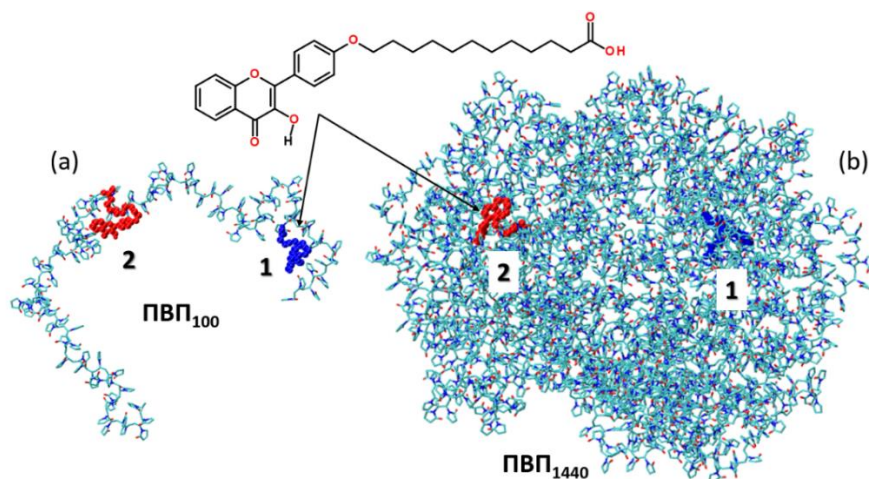


Рисунок 1.11 Візуалізація результатів молекулярного моделювання зв'язування зонда (**1c**) з полівінілпіролідом у різних конформаціях: а) розгорнутий ланцюг полімеру, ПВП₁₀₀; б) згорнута глобула, ПВП₁₄₄₀ [30, 45].

Структура комплексів зонд-ПВП100, де зонд зв'язується з двома найбільш енергетично вигідними ділянками 1 та 2, показана на рисунку 1.11, а. Докінг з макромолекулою ПВП₁₄₄₀ підтвердив, що щільна полімерна матриця містить кілька енергетично різних ділянок і гідрофобних кишень, які здатні вмістити молекулу зонда. На рисунку 1.11, б зображено дві основні ділянки зв'язування 1 та 2.

Ділянка 1 знаходиться глибоко в середині полімерної матриці, тоді як ділянка 2 розташована близько до зовнішньої поверхні полімерної глобули. Аналіз молекулярних контактів між зондом і полімером підтвердив, що основна взаємодія носить гідрофобний характер, що відбувається завдяки силам ван-дер-Ваальса. Молекула зонда потрапляє в порожнину полімерної матриці в результаті численних коротких контактів ($< 4\text{\AA}$) з аліфатичними атомами вуглецю полімерного ланцюга.

Результати докінгу підтверджують, що зв'язування молекули зонду з полімером ПВП₁₀₀ є менш енергетично вигіднішим, а ніж зв'язування з гідрофобною кишенею у ПВП₁₄₄₀. Відповідні енергії зв'язування наведені в таблиці 1.2 [30, 45].

Таблиця 1.2

Розрахункові значення ефективності зв'язування сполуки **1c** з
полівінілпіролідом [30, 45]

ПВП	Спорідненість зв'язування зонда з ПВП (ккал/моль)	
	ділянка зв'язування 1	ділянка зв'язування 2
ПВП ₁₀₀	-4,5	-4,2
ПВП ₁₄₄₀	-7,3	-6,6

Цілком вірогідно, що сполука (**1c**), спектри флуоресценції якої містять лише смугу випромінення фототаутомеру, зв'язується переважно з ділянкою зв'язування 1, тоді як сполука (**1b**), в спектрах якої наявні смуги випромінення обох форм, зв'язується з зовнішньою поверхнею полімерної глобули, одночасно перебуваючи під впливом полярного водного середовища і гідрофобного оточення полімеру. Причинами різної поведінки цих двох сполук може бути різниця в просторовій будові і розмірах їх молекул, яка впливає на процес зв'язування з полімером. Довший алкільний бічний ланцюг сполуки (**1c**), очевидно, має більшу спорідненість до гідрофобного оточення в полімерній глобулі.

ВИСНОВКИ

1. У гідрофобно-модифікованих похідних 3-гідроксифлавонів наявний виражений сольватофлуорохромний ефект, що свідчить про їх високу чутливість до природи середовища, що їх оточує.
2. Флуоресцентне титрування розчинів полівінілпіролідону (ПВП) з використанням зондів на основі гідрофобно-модифікованих похідних 3-гідроксифлавонів показало, що ефективність зв'язування зонда з полімером залежить від концентрації ПВП.
3. Показано, що довжина бічного алкільного ланцюга в молекулах зондів впливає на характер зв'язування з полімером полівінілпіролідонем.
4. Результати молекулярного моделювання свідчать, що зв'язування зонда відбувається через гідрофобні кишені в полімерній матриці.



Література

1. Joseph R. Lakowicz. Principles of Fluorescence Spectroscopy. — *Springer Science+Business Media*, 2006. — [ISBN 978-0387-31278-1](#).
2. Drummen, G. P. C. Fluorescent Probes and Fluorescence (Microscopy) Techniques — Illuminating Biological and Biomedical Research, *Molecules*. — 2012. — Т. 17. — С. 14067-14090. — [DOI:10.3390/molecules171214067](#)
3. Michalet, X., Weiss, S., & Jäger, M. Single-Molecule Fluorescence Studies of Protein Folding and Conformational Dynamics, *Chemical Reviews*. — 2006. — Т. 106, вип. 5. — С. 1785-1813. — [DOI:10.1021/cr0404343](#)
4. Haran, G. Single-molecule fluorescence spectroscopy of biomolecular folding, *Journal of Physics: Condensed Matter*. — 2003. — Т. 15. — С. 1292-1313. — [DOI:10.1088/0953-8984/15/32/201](#).
5. Ha, T. Single-molecule fluorescence methods for the study of nucleic acids, *Current Opinion in Structural Biology*. — 2001. — Т. 11. — С. 287–292. — [DOI:10.1016/S0959-440X\(00\)00204-9](#)
6. Schepartz, A.; Gonzalez, R. L. Molecular imaging: sine labore nihil // *Current Opinion in Chemical Biology*. — 2011. — Т. 15. — С. 749–751. — [DOI:10.1016/j.cbpa.2011.11.001](#). Drummen, G. P. C. Fluorescent Probes and Fluorescence (Microscopy) Techniques — Illuminating Biological and Biomedical Research, *Molecules*. — 2012. — Т. 17. — С. 14067-14090. — [DOI:10.3390/molecules171214067](#).
7. Ko, S.-K.; Chen, X.; Yoon, J.; Shin, I. Zebrafish as a good vertebrate model for molecular imaging using fluorescent probes, *Chemical Society Reviews*. — 2011. — Т. 40, вип. 5. — С. 2120-2130. — [DOI:10.1039/c0cs00118j](#)
8. J. C. Simpson, B. Joggerst, V. Laketa, F. Verissimo, C. Cetin, H. Erfle, M. G. Bexiga, V. R. Singan, J.-K. Hériché, B. Neumann, A. Mateos, J. Blake, S. Bechtel, V. Benes, S. Wiemann, J. Ellenberg, R. Pepperkok. Genome-wide RNAi screening identifies human proteins with a regulatory function in the

early secretory pathway, *Nature Cell Biology*. — 2012. — Т. 14 — С. 764–774. — [DOI:10.1038/ncb2510](https://doi.org/10.1038/ncb2510).

9. Susan M. Gasser. Visualizing Chromatin Dynamics in Interphase Nuclei // *Science*. — 2002. — Т. 2002, вып. 296 — С. 1412-1416. — [DOI:10.1126/science.1067703](https://doi.org/10.1126/science.1067703)

10. Nathalie Daigle, Jan Ellenberg. λN-GFP: an RNA reporter system for live-cell imaging // *Nature Methods*. — 2007. — Т. 4, вып. 8 — С. 633-636. — [DOI:10.1038/NMETH1065](https://doi.org/10.1038/NMETH1065)

11. Johnson, I. Fluorescent probes for living cells // *The Histochemical Journal*. — 1998. — Т. 30, вып. 3. — С. 123-140. — [DOI:10.1023/a:1003287101868](https://doi.org/10.1023/a:1003287101868)

12. Alexander P. Demchenko. Introduction to Fluorescence Sensing. — Springer Science + Business Media B.V, 2009. — [ISBN 978-1-4020-9002-8](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9002-8).

13. Klymchenko AS. Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications. *Acc Chem Res*. 2017 Feb 21;50(2):366-375. doi: 10.1021/acs.accounts.6b00517. Epub 2017 Jan 9. PMID: 28067047.

14. Klymchenko AS. Fluorescent Probes for Lipid Membranes: From the Cell Surface to Organelles. *Acc Chem Res*. 2023 Jan 3;56(1):1-12. doi: 10.1021/acs.accounts.2c00586. Epub 2022 Dec 19. PMID: 36533992.

15. Danylchuk DI, Jouard PH, Klymchenko AS. Targeted Solvatochromic Fluorescent Probes for Imaging Lipid Order in Organelles under Oxidative and Mechanical Stress. *J Am Chem Soc*. 2021 Jan 20;143(2):912-924. doi: 10.1021/jacs.0c10972. Epub 2021 Jan 8. PMID: 33417447.

16. Fluorescence Sensing. In: Lakowicz, J.R. (eds) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, Boston, MA (2006), P. 623-673.

17. Demchenko A.P. *Introduction to Fluorescence Sensing*. Springer Verlag, (2009), pp 612.

18. Advanced fluorescence reporters in chemistry and biology. Pt. I. Fundamentals and probe design (Demchenko A.P., ed.) Springer series on fluorescence v. 8, Springer 2010, pp 389.
19. Klymchenko A.S., Demchenko A.P. Multiparametric probing of microenvironment with solvatochromic fluorescent dyes, in: *Methods in Enzymology, Academic Press*. 2008. P. 37–58.
20. Klymchenko A.S. Solvatochromic and fluorogenic dyes as environmentsensitive probes: design and biological applications. *Acc. Chem. Res.* 2017. V.50. P.366–375.
21. Пивоваренко В.Г., Блажейовські Є., Вроблевська А., Павлов Д.О. Спосіб флуориметричного визначення концентрації протонного компонента в рідкій суміші. Патент UA № 74883 від 15.02.2006 р., Бюл. № 2.
22. Грищенко В.І., Дюбко Т.С., Пивоваренко В.Г., Ліннік Т.П. Спосіб визначення мембранотропної активності кріопротектора. Патент UA № 13838 від 17.04.2006 р. Бюл. № 4.
23. Посохов Є.О. Спосіб визначення мембранотропної активності кріопротектора. Патент UA № 71516 від 10.07.2012 р. Бюл. № 13.
24. Пивоваренко В.Г., Вадзюк О.Б., Костерін С.О. Спосіб 26 флуориметричного визначення концентрації аденозин-5'- трифосфату (АТФ) у розчині. Патент UA № 75448 від 17.04.2006 р., Бюл. № 4.
25. Sytnik A., Litvinyuk I. Energy transfer to a proton-transfer fluorescence probe: Tryptophan to a flavonol in human serum albumin. *Biophysics and Computational Biology*. 1996, V.93, № 23, P.12959-12963.
26. Schneckenburger H. Förster resonance energy transfer—what can we learn and how can we use it? *Methods Appl. Fluoresc.* 2019. V. 8, № 1, Art. num. 013001(1-17).
27. Babbey, C.M.; Ryan, J.C.; Gill, E.M.; Ghabril, M.S.; Burch, C.R.; Paulman, A.; Dunn, K.W. Quantitative intravital microscopy of hepatic transport. *IntraVital* 2012, V.1, 44–53.

28. Robertson Th.A., Bunel F., Roberts M.S. Fluorescein Derivatives in Intravital Fluorescence Imaging. *Cells*, 2013. V.2, № 3. P.591-606.
29. Bogomolov A., Grasser Th., Hessling M. In-line monitoring of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation with a fluorescence probe: new approaches to data collection and analysis. *J. Chemometrics*. 2011, V.25, № 7. P. 389-399.
30. Флуоресцентні зонди та індикатори на основі похідних 3-гідроксихромону для дослідження будови та визначення активності ферментів класу β -глюкозидаз / О.В. Кириченко, Л.В. Чепелева, Д.О. Тарасенко, А.Д. Сніжко, О.О. Демидов, О.О. Коломієцев, А.Ю. Чумак, В.М. Котляр, Е.С. Гладков, А.О. Дорошенко, О.Д. Рошаль: за редакцією д.х.н., с.н.с. Кириченка О.В. та д.х.н., проф. Рошалья О.Д. – Харків: Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, 2024. – 222 с.
31. 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. V. 25, № 15. P. art. no. 3424.
32. 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. V. 94, № 1. P. 26-32.
33. Osella S., Smisdom N., Ameloot M., Knippenberg S. Conformational changes as driving force for phase recognition: The case of laurdan // *Langmuir*. 2019. V. 35, № 35. P. 11471-11481.
34. 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. V. 91, № 11. P. 4091-4101.
35. Golfetto O., Hinde E., Gratton E. Laurdan fluorescence lifetime discriminates cholesterol content from changes in fluidity in living cell membranes // *Biophys. J*. 2013. V. 104, № 6. P. 1238-1247

36. 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. V. 73, № 2. P. 839-849.
37. 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. V. 69, № 2. P. 506-517.
38. 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. V. 114, № 42. P. 13574-13584.
39. Kyrychenko A., Sevriukov I. Y., 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. V. 154, № 1. P. 8-17.
40. Sengupta P. K., Kasha M. Excited state proton-transfer spectroscopy of 3-hydroxyflavone and quercetin, *Chem. Phys. Lett.* 1979. V. 68, № 2. P. 382-385.
41. Chepeleva L. V., Demidov O. O., Snizhko A. D., Tarasenko D. O., Chumak A. Y., Kolomoitsev O. O., Kotliar V. M., Gladkov E. S., Kyrychenko A., Roshal A. D. Binding interactions of hydrophobically modified flavonols with β -glucosidase: Fluorescence spectroscopy and molecular modelling study // *RSC Adv.* 2023. V. 13, № 48. P. 34107- 34121.
42. Chepeleva L. V., Tarasenko D. O., Chumak A. Y., Demidov O. O., Snizhko A. D., Kolomoitsev O. O., Kotliar V. M., Gladkov E. S., Tatarets A. L., Kyrychenko A. V., Roshal A. D. 4'-benzyloxyflavonol glucoside as fluorescent indicator for β -glucosidase activity // *Funct. Mater.* 2023. V. 30, № 4. P. 494-505.

43. Demchenko A. P., Tang K.-C., Chou P.-T. Excited-state proton coupled charge transfer modulated by molecular structure and media polarization, *Chem. Soc. Rev.* 2013. V. 42, № 3. P. 1379-1408.
44. Introduction to fluorescence sensing: Volume 1: Materials and devices / Demchenko A. P. – *Cham: Springer International Publishing*, 2020. – 657 p.
45. Арсеній Сніжко, Людмила Чепелєва, Євгеній Гладков, Олександр Рошаль, Олександр Кириченко. Дослідження взаємодії флуоресцентного зонду 4'-додецилкарбокси-3-гідроксифлавону з полівінілпіролідом. *Праці наукового товариства ім. Шевченка. Хімічні науки*, 2024, LXXV, . 59-65.
46. 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. Vol. 152. P. 110714. (<https://doi.org/10.1016/j.inoche.2023.110714>).
47. Franco P., De Marco I. The use of poly(n-vinyl pyrrolidone) in the delivery of drugs: A review. *Polymers.* 2020. Vol. 12 (5). 1114. (<https://doi.org/10.3390%2Fpolym12051114>).
48. 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 Delivery Sci. Technol.* 2020. Vol. 60. P. 102046. (<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102046>).
49. 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.* 2024. Vol. 16 (2). P. 286. (<https://doi.org/10.3390/polym16020286>).
50. 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. Vol. 119 (36). P. 12117-12128. (<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b05761>).

51. 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. *J. Controlled Release*. 2019. Vol. 316. P. 150-167. (<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.10.010>).
52. Colombo M., Michels L. R., Teixeira H. F., Koester L. S. Flavonoid delivery by solid dispersion: A systematic review. *Phytochem. Rev.* 2022. Vol. 21 (3). P. 783-808. (<https://doi.org/10.1007/s11101-021-09763-3>).
53. Stejskal J. Recent advances in the removal of organic dyes from aqueous media with conducting polymers, polyaniline and polypyrrole, and their composites. *Polymers*. 2022. Vol. 14 (19). P. 4243. (<https://doi.org/10.3390/polym14194243>).