

УДК 547.8 + 577.336

<https://doi.org/10.37827/ntsh.chem.2024.75.059>

*Арсеній СНИЖКО, Людмила ЧЕПЕЛЄВА, Євгеній ГЛАДКОВ,
Олександр РОШАЛЬ, Олександр КИРИЧЕНКО*

ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДУ 4'-ДОДЕЦИЛКАРБОКСИ-3-ГІДРОКСИФЛАВОНУ З ПОЛІВІНІЛПІРОЛІДОНОМ

*Науково-дослідний інститут хімії,
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,
майдан Свободи 4, Харків, 61022, Україна
e-mail: eugenegladkov@karazin.ua*

Вивчено взаємодію нового флуоресцентного зонда на основі додецилкарбокси-заміщеного 3-гідроксифлавонолу з полівінілпіролідоном (ПВП) за різної концентрації полімеру. З використанням флуориметричного титрування з'ясовано, що спорідненість зонда до полімеру залежить від концентрації та морфології ПВП у розчині. За низької концентрації ПВП спостерігаються незначні зміни у флуоресцентному сингалі зонда, що свідчить про слабку взаємодію зонд-полімер. Значне підсилення сигналу зонда спостерігається у розчині ПВП з високою концентрацією, що свідчить про проникнення зонда у гідрофобне середовище полімерної матриці. З використанням методу молекулярного докінгу досліджено молекулярні аспекти взаємодії зонд-полімер і підтверджено, що просторова будова полімеру має вирішальний вплив на енергію зв'язування зонда.

Ключові слова: гетероциклічні сполуки, органічний синтез, 3-гідроксифлавонол, флуоресцентний зонд, молекулярний докінг.

Вступ

Полівінілпіролідон (ПВП) є розчинним у воді полімером, ланцюг якого складається з елементарних ланок N-вінілпіролідонолу (схема 1). ПВП – гідрофільний полімер, що зумовлює його високу розчинність у органічних розчинниках різної полярності, значні абсорбційні властивості та стабілізуючу дію [1]. Також ПВП є біосумісним і нетоксичним, що дає змогу використовувати його у харчовій промисловості, в медицині та косметичці, для фармацевтичного та біомедичного застосування [2–3]. Він хімічно інертний, безбарвний, термостійкий і стійкий у широкому інтервалі рН. На додаток, ПВП використовується як потенційний солюбілізуєчий і транспортний засіб для біологічно активних молекул, підвищуючи їхню стабільність та запобігаючи самоасоціації [4–7]. ПВП здатний утворювати стабільну аморфну матрицю з водонерозчинними органічними сполуками, що допомагає запобігти їх кристалізації [4]. Завдяки цьому ПВП використовують як адсорбент для видалення органічних барвників з водного середовища [8].

Флуоресцентні зонди з переносом протону на основі 3-гідроксифлавоу є перспективними для вивчення фізико-хімічних властивостей організованих розчинів [9] і визначення структурно-динамічних характеристик полімерів [10] та біомакромолекул [11–13]. Мета нашої праці – дослідити взаємодії ПВП і нового флуоресцентного зонда 2-(4-(11-карбоксі)-ундецилокси)феніл-3-гідрокси-4Н-хромен-4-она (ФЛ-С₁₁СООН) – похідного 3-гідроксифлавоу, що містить у 4'-положенні якірну групу –O-(CH₂)₁₁-COOH (схема 1), за різних концентрацій полімеру у розчині. Дослідження проведено з використанням методів флуоресцентної спектроскопії та молекулярного докінгу.

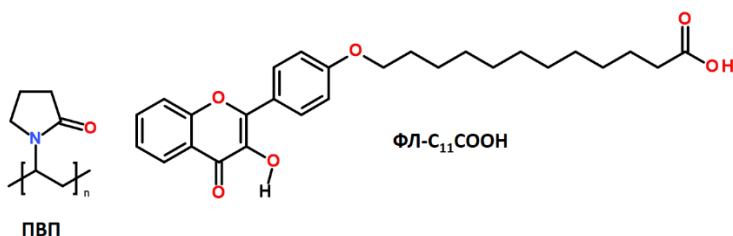


Схема 1. Формула ПВП та зонда ФЛ-С₁₁СООН.

Scheme 1. Formula of PVP and probe ФЛ-С₁₁СООН.

Результати та обговорення

Взаємодія зонда ФЛ-С₁₁СООН з ПВП за низької концентрації полімеру.

Вихідний водний розчин $2 \cdot 10^{-5}$ М зонда ФЛ-С₁₁СООН готували розчиненням його аликвоти 10 мкл у ДМСО. Для приготування вихідного водного розчину зонда ФЛ-С₁₁СООН (концентрація $2 \cdot 10^{-5}$ М) використовували його розчин в ДМСО: аликвоту об'ємом 10 мкл помістили в 2 мл буферного розчину з рН 6,86. На рис. 1,а показано результати спектрофлуориметричного титрування зонда ФЛ-С₁₁СООН розчином ПВП. З наведених спектрів видно, що введення ПВП у розчин приводить до незначного зростання інтенсивності смуги флуоресценції та аутомерної форми при 530 нм. Збільшення інтенсивності флуоресценції супроводжувалося гіпсохромним зсувом максимуму полоси з 530 нм до 513 нм, відповідно.

Взаємодія зонда ФЛ-С₁₁СООН з концентрованим розчином ПВП.

За високих концентрацій ПВП утворює у розчині ліпофільні агрегати з нижчою локальною полярністю ніж у водній фазі, що зумовлює здатність до екстракції органічних барвників і низькомолекулярних лігандів з технологічних розчинів [3, 14]. З цієї метою було вивчено взаємодію зонда ФЛ-С₁₁СООН з концентрованим розчином ПВП (M_w 10 кДа, $S_{PVP} = 2,3 \cdot 10^{-3}$ М). На рис. 1,б зображено результати флуориметричного титрування, які свідчать про суттєве зростання сигналу зонда у присутності ПВП. Зростання флуоресценції флуоресцентних зондів на основі 3-гідроксифлавоу також спостерігається при взаємодії з білками, що пов'язано з перерозподілом зонда з полярного водного розчину до неполярного гідрофобного середовища біополімеру [11–13, 15].

Результати докінгу допомогли виявити кілька ділянок зв'язування зонда ФЛ-С₁₁СООН з розгорнутим ланцюгом ПВП₁₀₀. Структура комплексів зонд-ПВП₁₀₀, у яких зонд пов'язаний з двома найбільш енергетично вигіднішими ділянками

зв'язування 1 та 2 показано на рис. 2,а. Результати докінгу зонда з макромолекулою ПВП₁₄₄₀ підтвердили, що щільна полімерна матриця містить кілька енергетично різномірних ділянок та гідрофобних кишень здатних вмістити молекулу зонда. На рис. 2,б зображено дві типові ділянки зв'язування 1 та 2, відповідно. Ділянка 1 глибоко занурена у полімерну матрицю, тоді як ділянка 2 представляє комплекс зв'язування зонда з зовнішньою поверхнею полімерної глобули. Аналіз молекулярних контактів зонд-полімер підтверджує, що взаємодія має головню гідрофобний характер за рахунок сил ван-дер-Ваальса. Молекулу зонда утримуються у порожнині полімерної матриці внаслідок численних коротких контактів ($< 4\text{Å}$) з аліфатичними атомами вуглецю полімерного ланцюга.

Енергетичні параметри та спорідненість зонда $\Phi\text{L-C}_{11}\text{COOH}$ до зв'язування з різними ділянками макромолекули ПВП різної просторової будови подано у табл. 1. Результати докінгу підтверджують, що утворення комплексу з ПВП₁₀₀ є на 2,8 ккал/моль менш енергетично вигіднішим, ніж зв'язування з гідрофобною кишенею у ПВП₁₄₄₀. Ці дані добре узгоджуються з результатами флуориметричного титрування зображеного на рис. 1.

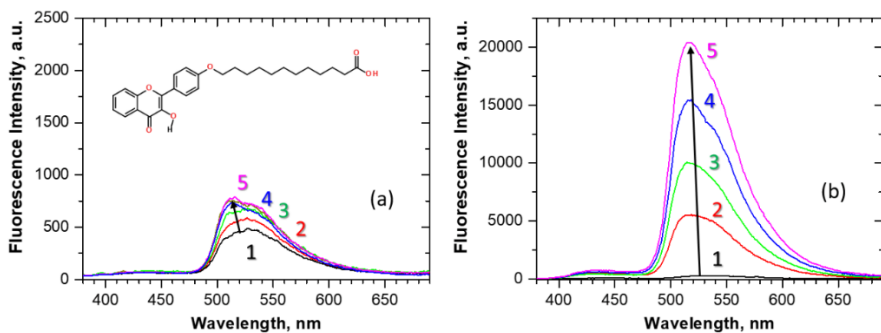


Рис. 1. Флуоресцентне титрування з використанням зонда $\Phi\text{L-C}_{11}\text{COOH}$ у буферному водному розчині рН 6,86 в присутності ПВП: а) титрування водного розчину зонда додаванням ПВП: 1 – за відсутності ПВП, $C_{\Phi\text{L-C}_{11}\text{COOH}} = 2,1 \cdot 10^{-5}$ моль/л. У присутності ПВП, 2 – $C_{\text{ПВП}} = 1,1 \cdot 10^{-7}$ моль/л, 3 – $C_{\text{ПВП}} = 4,5 \cdot 10^{-7}$ моль/л, 4 – $C_{\text{ПВП}} = 4,2 \cdot 10^{-6}$ моль/л, 5 – $C_{\text{ПВП}} = 2,2 \cdot 10^{-5}$ моль/л; б) титрування концентрованого розчину ПВП додаванням мікро аліквот зонда у ДМСО. 1 – за відсутності ПВП, $C_{\Phi\text{L-C}_{11}\text{COOH}} = 1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л. В присутності ПВП ($C_{\text{ПВП}} = 2,3 \cdot 10^{-3}$ моль/л): 2 – $C_{\Phi\text{L-C}_{11}\text{COOH}} = 1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л, 3 – $C_{\Phi\text{L-C}_{11}\text{COOH}} = 2,1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, 4 – $C_{\Phi\text{L-C}_{11}\text{COOH}} = 3,1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, 5 – $C_{\Phi\text{L-C}_{11}\text{COOH}} = 4,1 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

Fig. 1. Fluorescence titration using the probe $\Phi\text{L-C}_{11}\text{COOH}$ in a buffer solution at pH 6.86 in the presence of PVP: а) Titration of an aqueous solution of the probe by adding PVP: 1 – in the absence of PVP, $C_{\Phi\text{L-C}_{11}\text{COOH}} = 2.1 \cdot 10^{-5}$ mol/L. In the presence of PVP, 2 – $C_{\text{PVP}} = 1.1 \cdot 10^{-7}$ mol/L, 3 – $C_{\text{PVP}} = 4.5 \cdot 10^{-7}$ mol/L, 4 – $C_{\text{PVP}} = 4.2 \cdot 10^{-6}$ mol/L, 5 – $C_{\text{PVP}} = 2.2 \cdot 10^{-5}$ mol/L; б) Titration of a concentrated PVP solution by addition of micro aliquots of the probe in DMSO. 1 – in the absence of PVP, $C_{\Phi\text{L-C}_{11}\text{COOH}} = 1.0 \cdot 10^{-5}$ mol/L. In the presence of PVP ($C_{\text{PVP}} = 2.3 \cdot 10^{-3}$ mol/L): 2 – $C_{\Phi\text{L-C}_{11}\text{COOH}} = 1.0 \cdot 10^{-5}$ mol/L, 3 – $C_{\Phi\text{L-C}_{11}\text{COOH}} = 2.1 \cdot 10^{-5}$ mol/L, 4 – $C_{\Phi\text{L-C}_{11}\text{COOH}} = 3.1 \cdot 10^{-5}$ mol/L, 5 – $C_{\Phi\text{L-C}_{11}\text{COOH}} = 4.1 \cdot 10^{-5}$ mol/L.

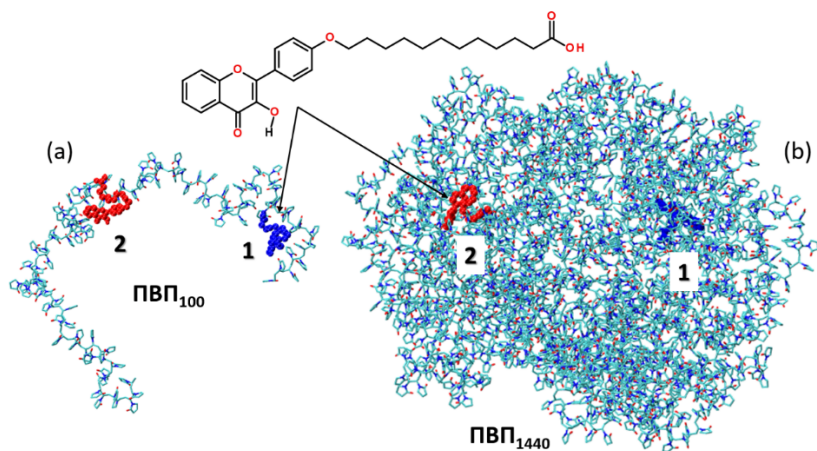


Рис. 2. Результати молекулярного докінгу зонда $\Phi\text{L-C}_{11}\text{COOH}$ з ПВП різної просторової будови: а) ПВП₁₀₀ у розгорнутій конформації; б) ПВП₁₄₄₀ у формі компактної глобули.

Fig. 2. Molecular docking results of the probe $\Phi\text{L-C}_{11}\text{COOH}$ with PVP of different spatial structures: а) PVP₁₀₀ in an unfolded conformation; б) PVP₁₄₄₀ in the form of a compact globule.

Таблиця 1

Спорідненість зв'язування зонда $\Phi\text{L-C}_{11}\text{COOH}$ з різними ділянками ПВП за результатами молекулярного докінгу

Table 1

The binding affinity of the $\Phi\text{L-C}_{11}\text{COOH}$ probe with different regions of PVP according to the results of molecular docking

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

Експериментальна та розрахункова частини

Синтез 2-(4-(11-карбокси)-ундецилокси)феніл-3-гідрокси-4Н-хромен-4-она ($\Phi\text{L-C}_{11}\text{COOH}$) виконували за модифікованою методикою [11].

Комерційний ПВП (Thermo Scientific, 10 кДа) використовували без додаткового очищення.

Електронні спектри поглинання вимірювали за допомогою спектрофотометра Agilent Cary 3500 UV-Vis. Спектри флуоресценції були записані на спектрофлуориметрі Hitachi 850, обладнаному подвійним монохроматором. Вимірювання флуоресценції виконувалося при збудженні 350–360 нм у буферному водному розчині (рН 6,86) у кюветі 10×10 мм за 20 °С.

Налаштування молекулярного докінгу, підготовка полімеру та зонда виконували за допомогою програмного забезпечення AutoDock Tools 1.5.7 [18]. Розрахунки

молекулярного докінгу були проведені за допомогою програмного забезпечення AutoDock Vina 1.1.2 [19]. Геометрію макромолекул ПВП₁₀₀ та ПВП₁₄₄₀ попередньо отримали за результатами молекулярно-динамічного моделювання цих систем у водному розчині [20]. Взаємодії зонд-полімер вивчали методом молекулярного докінгу у режимі «blind docking» без задання явного активного центру зв'язування. З цією метою комірку стикування з розмірами 125×125×125 Å вибирали на різних фрагментах макромолекули ПВП, після цього виконували докінг і відбирали найбільш енергетично вигідніші ділянки зв'язування (рис. 2).

Висновки

Розглянуто взаємодію нового флуоресцентного зонда на основі 3-гідроксифлавону *ФЛ-С₁₁COOH*, який містить додецилкарбоксылну якірну групу, з полівінілпіролідонем (ПВП). Шляхом флуориметричного титрування з'ясовано, що спорідненість зонда до полімеру залежить від концентрації ПВП у розчині. За низької концентрації полімеру спостерігається незначне збільшення інтенсивності флуоресценції та незначний гіпсохромний зсув, що свідчить про слабку взаємодію зонд-полімер. За високої концентрації ПВП утворює щільну просторову будову, що збільшує спорідненість зонда *ФЛ-С₁₁COOH* до полімеру. Методом молекулярного докінгу досліджено молекулярні аспекти взаємодії зонд-полімер і підтверджено, що зв'язування зонда відбувається з гідрофобними кишнями у полімерній матриці.

Подяка

Роботу виконано за підтримки МОН України (НДР 0122U001388). Автори висловлюють подяку за фінансову підтримку фонду Simons Foundation (U.S.A.) грант № 1030282.

ЛІТЕРАТУРА

1. 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>.
2. 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/polym12051114>).
3. 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>.
4. 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>.
5. 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>.

6. *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>.
7. *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>.
8. *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>.
9. *Pivovarenko V. G., Klymchenko A. S.* Fluorescent probes based on charge and proton transfer for probing biomolecular environment. *Chem. Rec.* 2024. P. e202300321. <https://doi.org/10.1002/tcr.202300321>.
10. *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. Vol. 44. P. 7–17. <https://doi.org/10.26565/2705-3810-2020-44-01>.
11. *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. Vol. 13(48). P. 34107–34121. <https://doi.org/10.1039/D3RA06276G>.
12. *Demidov O. O., Gladkov E. S., Kyrychenko A. V., Roshal A. D.* Synthetic and natural flavonols as promising fluorescence probes for β -glucosidase activity screening. *Funct. Mater.* 2022. Vol. 29(2). P. 252–262. <https://doi.org/10.15407/fm29.02.252>.
13. *Serdiuk I. E., Reszka M., Myszka H., Krzyminiński K., Liberek B., Roshal A. D.* Flavonol-based fluorescent indicator for determination of β -glucosidase activity. *RSC Adv.* 2016. Vol. 6(48). P. 42532–42536. <https://doi.org/10.1039/C6RA06062E>.
14. *Senkal B. F., Erkal D., Yavuz E.* Removal of dyes from water by poly(vinyl pyrrolidone) hydrogel. *Polym. Adv. Technol.* 2006. Vol. 17(11–12). P. 924–927. <https://doi.org/10.1002/pat.836>.
15. *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. Vol. 30(4). P. 494–505. <https://doi.org/10.15407/fm30.04.494>.
16. *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. Vol. 23(5). P. 1065–1076. <https://doi.org/10.1007/s10895-013-1236-4>.
17. *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. Vol. 8(47). P. 44820–44830. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c06006>.
18. *Goodsell D. S., Morris G. M., Olson A. J.* Automated docking of flexible ligands: Applications of AutoDock. *J. Mol. Recognit.* 1996. Vol. 9(1). P. 1–5. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1352\(199601\)9:1%3C1::aid-jmr241%3E3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1352(199601)9:1%3C1::aid-jmr241%3E3.0.co;2-6).

19. *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. Vol. 31(2). P. 455–461. <https://doi.org/10.1002%2Fjcc.21334>.
20. *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. Vol. 119(14). P. 7888–7899. <https://doi.org/10.1021/jp510369a>.

SUMMARY

*Arsenii SNIZHKO, Liudmyla CHEPELEVA,
Eugene GLADKOV, Alexander ROSHAL, Alexander KYRYCHENKO*

STUDY OF THE INTERACTION OF FLUORESCENT 4'-DODECYLCARBOXY-3-HYDROXYFLAVONE PROBE WITH POLYVINYLPIRROLIDONE

*Research Institute of Chemistry, V.N.Karazin Kharkiv National University,
4 Svobody Sq., 61022 Kharkiv, Ukraine
e-mail: eugenegladkov@karazin.ua*

The study examined the interaction of a new ESIPT fluorescent probe, which is based on 4'-dodecyl-carboxy-substituted 3-hydroxyflavone, with polyvinylpyrrolidone (PVP) at varying polymer concentrations. Through fluorimetric titration, it was determined that the probe's affinity to the polymer relies on the concentration and morphology of PVP in the solution. At low polymer concentrations, a slight increase in fluorescence intensity and a slight hypsochromic shift were observed, indicating a weak probe-polymer interaction. A significant amplification of the probe signal was noticed in high concentration PVP solutions, suggesting the probe's penetration into the hydrophobic environment of the polymer matrix. It was observed that at high concentrations, PVP forms a dense spatial structure, increasing the probe's affinity to the polymer.

Molecular docking calculations were utilized to investigate the molecular aspects of the probe-polymer interaction. The binding interactions of the probe ФЛ-C₁₁COOH with PVP macromolecules of different sizes and spatial structures were studied. It was found that the spatial structure of the polymer plays a crucial role in the probe binding. The molecular docking calculations indicated that the probe exhibited weak binding (-4.5 kcal/mol) to an unfolded conformation of PVP₁₀₀. Conversely, certain hydrophobic sites in a compact, globular matrix of PVP₁₄₀ were able to accommodate the probe ФЛ-C₁₁COOH with a high binding affinity of -7.3 kcal/mol. The long-alkyl chain of the probe anchor within at PVP matrix.

In summary, it was demonstrated that long-chain fatty acid-functionalized 3-hydroxyflavone derivatives have great potential as environment-sensitive fluorescent probes for studying the microscopic structure and morphology of synthetic polymers, macromolecules, and organized solutions.

Keywords: heterocyclic compounds, organic synthesis, 3-hydroxyflavone, fluorescence probe, molecular docking.

Стаття надійшла: 05.03.2024.
Після доопрацювання: 20.06.2024.
Прийнята до друку: 04.10.2024.