

Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

mgr Agnieszka Stepasiuk-Stańko

**FLUORESCENCYJNE ANALOGI AMINOKWASÓW
NIEBIAŁKOWYCH Z FRAGMENTEM TYROZYNY -
SYNTEZA, CHARAKTERYSTYKA FOTOFIZYCZNA
I OCENA AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ**

Promotor:

prof. dr hab. Wiesław Wiczek

Promotor pomocniczy:

dr inż. Irena Bylińska

Praca doktorska wykonana w Katedrze Chemii Biomedycznej

Gdańsk 2026

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania wszystkim osobom, które wspierały mnie na drodze prowadzącej do powstania niniejszej rozprawy doktorskiej.

Wyrazy wdzięczności kieruję do prof. dr. hab. Wiesława Wiczka za objęcie promotorstwem niniejszej dysertacji, cenne wskazówki naukowe oraz zaufanie okazane podczas realizacji pracy doktorskiej.

Serdecznie dziękuję dr inż. Irenie Bylińskiej za nieocenioną pomoc merytoryczną, ogromne wsparcie na każdym etapie realizacji badań oraz cenne wskazówki, które miały istotny wpływ na kształt niniejszej pracy. Szczególnie wdzięczna jestem za poświęcony czas, wiele inspirujących rozmów, konstruktywnych uwag oraz owocnych godzin wspólnej pracy.

Wyrazy wdzięczności składam również dr Aleksandrze Hać za pomoc w realizacji badań komórkowych, przekazaną wiedzę oraz wszystkie miłe chwile towarzyszące pracy naukowej.

Z wdzięcznością wspominam świętej pamięci dr Katarzynę Guzow, której życzliwość oraz motywacja do działania pozostaną dla mnie niezwykle ważne.

Dziękuję mgr Weronice Zausze oraz mgr Julii Wtulich za pomoc w syntezie i badaniach wybranych acetylenowych pochodnych tyrozyny.

Szczególne podziękowania kieruję do mojego Męża Artura - za wieloletnie wsparcie, cierpliwość, wiarę we mnie oraz w sens realizacji mojego doktoratu, nawet w najtrudniejszych momentach.

Serdeczne podziękowania składam mojej Rodzinie oraz wszystkim Bliskim za wsparcie i obecność okazywane mi podczas realizacji pracy doktorskiej.

„W życiu niczego nie należy się bać, należy to tylko zrozumieć.”

- Maria Skłodowska-Curie

Spis treści

Streszczenie.....	6
Abstract.....	7
I. Część teoretyczna	8
1. Wprowadzenie.....	8
2. Spektroskopia fluorescencyjna	9
2.1. Spektroskopia rozdzielcza w czasie.....	13
2.1.1. Czasy życia fluorescencji.....	13
2.1.2. Mikroskopia fluorescencyjna z wykorzystaniem techniki FLIM	15
3. Wpływ środowiska na właściwości spektralne i fotofizyczne	17
3.1. Efekty solwatochromowe	18
3.2. Wpływ temperatury i lepkości otoczenia.....	21
4. Wygaszanie fluorescencji.....	22
5. Znaczniki fluorescencyjne zewnętrzne	26
6. Znaczniki fluorescencyjne bazujące na strukturze aminokwasów białkowych..	32
6.1. Znaczniki fluorescencyjne wewnętrzne - Fluorescencyjne aminokwasy białkowe	32
6.2. Fluorescencyjne aminokwasy niebiałkowe - synteza i właściwości spektroskopowe	33
6.3. Zastosowanie fluorescencyjnych aminokwasów niebiałkowych w badaniach biologicznych.....	41
7. Reakcja Sonogashiry-Hagihary jako potencjalna metoda syntezy nowych znaczników fluorescencyjnych.....	45
II. Cel pracy.....	52
III. Część doświadczalna	55
1. Uwagi ogólne	55
1.1. Wykaz stosowanych skrótów i symboli	55
1.2. Metody oczyszczania związków.....	57
1.3. Metody sprawdzania czystości związków	57
1.4. Metody identyfikacji związków.....	58
1.5. Aparatura stosowana do badań spektroskopowych	58
1.6. Aparatura stosowana do wizualizacji modeli komórkowych i żywych komórek...	60
2. Opis syntez.....	61
2.1. Synteza BocTyrOMeI oraz BocTyrOMeI ₂	61
2.2. Synteza acetylenowych substratów	62
2.2.1. Synteza 2-metylo-4-(naftalen-2-yl)but-3-yn-2-olu.....	63
2.2.2. Synteza 4-(4-nitrofenylo)but-3-yn-2-olu	63
2.2.3. Synteza 4-((4-(trimetylosililoetynylo)fenylo)etynylo)-N,N-dimetyloaniliny	63

2.2.4. Usuwanie osłony z 2-metylo-4-(naftalen-2-ylo)but-3-yn-2-olu oraz 4-(4-nitrofenylo)but-3-yn-2-olu	64
2.2.5. Usuwanie osłony trimetylosililowej z 4-((4-(trimetylosililoetynylo)fenylo)etynylo)-N,N-dimetyloaniliny oraz 4-((trimetylosililo)etynylo)benzaldehydu	65
2.3. Synteza asymetrycznych i symetrycznych acetylenowych pochodnych tyrozyny..	66
2.3.1. Synteza Tyr(acPh)	67
2.3.2. Synteza Tyr(acPh-4-OMe)	68
2.3.3. Synteza Tyr(acDMA)	69
2.3.4. Synteza Tyr(acPir)	70
2.3.5. Synteza Tyr(acPh-4-CHO)	71
2.3.6. Synteza Tyr(acPh-4-NO ₂)	72
2.3.7. Synteza Tyr(acPh-O-Ph)	73
2.3.8. Tyr(ac-2-Naft)	74
2.3.9. Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)	75
2.3.10. Tyr(acPhacDMA)	76
2.3.11. Tyr(acPh) ₂	77
2.3.12. Tyr(acPh-4-OMe) ₂	78
2.3.13. Tyr(acDMA) ₂	79
2.3.14. Tyr(acPir) ₂	80
2.3.15. Tyr(acPh-4-CHO) ₂	81
2.3.16. Tyr(acPh-4-NO ₂) ₂	82
2.3.17. Tyr(acPh-O-Ph) ₂	83
2.3.18. Tyr(ac-2-Naft) ₂	84
2.3.19. Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) ₂	85
3. Właściwości spektroskopowe	86
3.1. Właściwości spektralne pochodnych asymetrycznych	87
3.2. Właściwości spektralne pochodnych symetrycznych	91
3.3. Właściwości fotofizyczne pochodnych asymetrycznych	95
3.4. Właściwości fotofizyczne pochodnych symetrycznych	112
3.5. Wpływ zmian pH na widma absorpcji i emisji wybranych pochodnych asymetrycznych i symetrycznych	127
3.6. Wpływ obecności reduktora i utleniacza na widma absorpcji i emisji wybranych pochodnych asymetrycznych i symetrycznych	130
4. Fotostabilność	136
5. Badanie żywotności wybranych linii komórkowych	156
6. Badanie zdolności do przenikania przez modelowe błony komórkowe oraz błony komórkowe komórek nowotworowych	164
6.1. Badania z wykorzystaniem LUV	165

6.2. Badania z wykorzystaniem GUV	167
6.3. Badanie zdolności do przenikania przez błony komórkowe komórek nowotworowych.....	169
IV. Podsumowanie i wnioski.....	173
V. Dorobek naukowy.....	178
VI. Wykaz rysunków	182
VII. Wykaz tabel	196
VIII. Literatura.....	197

Streszczenie

Spektroskopia fluorescencyjna jest wszechstronną metodą badawczą szeroko stosowaną w naukach przyrodniczych (chemicznych, biologicznych i medycznych), a jej znaczenie stale rośnie wraz z rozwojem spektroskopowych metod badawczych. Warunkiem jej zastosowania jest obecność odpowiedniego barwnika o adekwatnych właściwościach spektroskopowych, takich jak długofalowa charakterystyka widmowa, wysoka wydajność kwantowa fluorescencji oraz odporność na fotodegradację. Inspiracją w projektowaniu nowych znaczników mogą być aminokwasy białkowe, które w formie niemodyfikowanej wykazują ograniczone właściwości spektralne i fotofizyczne, limitując ich zastosowanie w wielu badaniach fluorescencyjnych.

Niniejsza dysertacja skupia się na syntezie nowych znaczników fluorescencyjnych, których struktura opiera się na szkielecie tyrozyny.

Zachowując aminokwasowe grupy funkcyjne umożliwiające przyłączanie do różnych struktur molekularnych, modyfikowano łańcuch boczny aromatycznego aminokwasu proteinogennego za pomocą reakcji Sonogashiry-Hagihary, dążąc do zwiększenia jego wydajności chromoforowej i fluoroforowej. Poprzez wiązanie potrójne do pierścienia aromatycznego tyrozyny wprowadzono asymetrycznie i symetrycznie: fenyl, anizol, dimetyloanilinę, benzaldehyd, nitrobenzen, fenoksybenzen, pirydynę, naftalen, metoksynaftalen oraz fenyl sprzężony poprzez wiązanie potrójne z dimetyloaniliną. Wykazano, że zastosowane zmiany strukturalne w obrębie łańcucha bocznego tyrozyny wpłynęły pozytywnie na właściwości spektroskopowe w porównaniu z naturalnie występującą tyrozyną. Dodatkowo wybrane związki nie są wrażliwe na zmiany pH, czy obecność utleniacza i reduktora w środowisku. Wszystkie przebadane pochodne były fotostabilne.

Związki nie wykazywały znaczącego działania cytotoksycznego względem wybranych linii komórkowych (HaCaT, MCF-7 oraz PC-3). Badania przy użyciu fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego z techniką FLIM potwierdziły zdolność wytypowanych pochodnych do przenikania przez błonę komórkową komórek MCF-7.

Otrzymane fluorescencyjne pochodne oferują szeroki potencjał aplikacyjny w grupie nauk *life science*.

Słowa klucz: *fluorescencyjne aminokwasy niebiałkowe, acetylenowe pochodne tyrozyny, badania spektroskopowe, aktywność biologiczna pochodnych tyrozyny.*

Abstract

Fluorescence spectroscopy is a versatile research method widely used in the natural sciences (chemical, biological, and medical), and its importance continues to grow with the development of spectroscopic research techniques. A prerequisite for its application is the presence of an appropriate dye with favorable spectroscopic properties, such as long-wavelength spectral characteristics, high fluorescence quantum yield, and resistance to photodegradation. An inspiration for designing new probes may be proteinogenic amino acids, which in their unmodified form exhibit limited spectral and photophysical properties, restricting their use in many fluorescence studies.

This dissertation focuses on the synthesis of new fluorescent labels whose structures are based on the scaffold of a proteinogenic amino acid - tyrosine.

While preserving the amino acid functional groups that enable its conjugation to various molecular structures, the side chain of the aromatic proteinogenic amino acid was modified via the Sonogashira-Hagihara reaction to enhance its chromophoric and fluorophoric properties. Through the introduction of a triple bond into the tyrosine side chain, the following substituents were incorporated in asymmetric and symmetric fashions: phenyl, anisole, dimethylaniline, benzaldehyde, nitrobenzene, diphenyl ether, pyridine, naphthalene, methoxynaphthalene, as well as a phenyl group conjugated to dimethylaniline via a triple bond. It was demonstrated that the applied structural modifications within the tyrosine side chain positively affected the spectroscopic properties compared to naturally occurring tyrosine. Moreover, selected compounds were insensitive to changes in pH and to the presence of oxidizing and reducing agents in the environment. All of the investigated derivatives were photostable.

The compounds did not exhibit significant cytotoxic effects toward the selected cell lines (HaCaT, MCF-7, and PC-3). Confocal fluorescence microscopy studies combined with the FLIM technique confirmed the ability of the selected derivatives to penetrate the cell membrane of MCF-7 cells.

The obtained fluorescent derivatives offer broad application potential in the life sciences.

Keywords: *fluorescent non-proteinogenic amino acids, acetylenic tyrosine derivatives, spectroscopic studies, biological activity of tyrosine derivatives.*

I. Część teoretyczna

1. Wprowadzenie

Spektroskopia fluorescencyjna jest uniwersalną techniką o wielu zaletach. Zjawisko fluorescencji umożliwia wizualizację obiektów w skali makro (tkanki, czy nawet całe organizmy) oraz mikro (komórki czy pojedyncze cząsteczki). W ostatnich latach widoczne jest niezwykle szerokie i stale rosnące zastosowanie fluorescencji w badaniach naukowych. Wynika to z unikatowych możliwości spektroskopii fluorescencyjnej, która jest w stanie sprostać potrzebom coraz bardziej złożonych i skomplikowanych zagadnień i wyzwań badawczych. Podstawowym ograniczeniem do stosowania całej gamy technik fluorescencyjnych jest obecność fluoroforu w analizowanym obiekcie, który będzie charakteryzował się odpowiednimi właściwościami spektralnymi i fotofizycznymi, jak np. długofalową charakterystyką widmową, wysoką wydajnością kwantową fluorescencji i fotostabilnością.¹

Rynek komercyjny oferuje szeroką gamę znaczników fluorescencyjnych o zróżnicowanych właściwościach. Jednak często otrzymanie efektywnego znacznika fluorescencyjnego wiąże się z zastosowaniem skomplikowanych metod syntezy oraz aparatury, co przekłada się bezpośrednio na finalną cenę fluoroforów i ich dostępność. Innym problemem jest zawada steryczna generowana dużymi rozmiarami znacznika (co w przypadku np. białek może prowadzić do niepożądanych zmian konformacyjnych). Dodatkowo znaczne rozbudowywanie struktury o pierścienie aromatyczne w celu poprawienia właściwości chromoforowych i fluoroforowych może zwiększać hydrofobowość i ograniczać użyteczność w układach biologicznych.¹

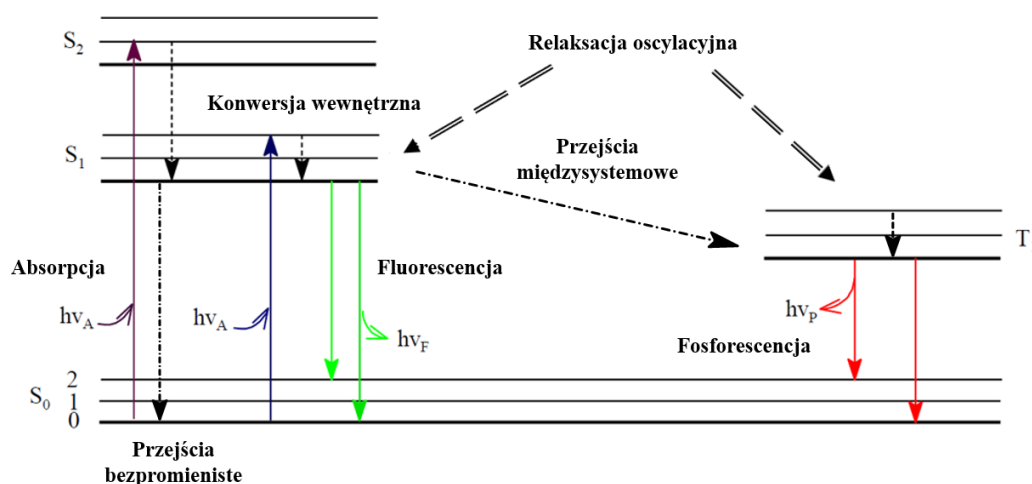
Szybki rozwój technik fluorescencyjnych, jak i wzrost wykorzystania zjawiska fluorescencji w różnych badaniach generuje stałą konieczność poszukiwania coraz to lepszych i wydajniejszych sond fluorescencyjnych o bardziej wysublimowanych właściwościach i możliwościach zastosowania. Dynamiczny rozwój współczesnej chemii organicznej, chemii materiałowej oraz nauk biologicznych umożliwił projektowanie i syntezę coraz bardziej złożonych związków chemicznych o precyzyjnie kontrolowanych właściwościach fotofizycznych oraz aktywności biologicznej. Otrzymywanie nowych fluorescencyjnych pochodnych może odbywać się poprzez modyfikowanie już znanych fluoroforów lub syntezę nowych inspirowanych związkami zdolnymi do fluorescencji. Pierwsza metoda ma na celu polepszenie właściwości

spektroskopowych związków opisanych w literaturze, zaś druga opiera się na otrzymaniu nowych struktur o potencjalnie pożądanых właściwościach. Pochodne tego typu znajdują szerokie zastosowanie zarówno w badaniach podstawowych, jak i w obszarach aplikacyjnych, obejmujących m.in. medycynę, bioanalitikę czy materiałoznawstwo.

Przedstawione zagadnienia we wstępie teoretycznym rozprawy doktorskiej pod tytułem „Fluorescencyjne analogi aminokwasów niebiałkowych z fragmentem tyrozyny - synteza, charakterystyka fotofizyczna i ocena aktywności biologicznej” pozwalają stworzyć spójne tło dla problemów i celów podjętych w części eksperymentalnej.

2. Spektroskopia fluorescencyjna

Spektroskopia fluorescencyjna przez ostatnie kilkanaście lat zyskała na popularności, a poziom jej zaawansowania diametralnie wzrósł. Opisując zjawisko fluorescencji, warto zacząć od pojęcia luminescencji, która jest zjawiskiem emisji światła niewynikającym z ogrzania danej substancji. Uwzględniając źródło energii wzbudzającej luminescencję, wyróżnia się m.in. elektroluminescencję, chemiluminescencję, bioluminescencję, termoluminescencję, sonoluminescencję, radioluminescencję, katodoluminescencję, tryboluminescencję oraz fotoluminescencję, do której należy wspomniana wcześniej fluorescencja i fosforescencja.² Te dwa zjawiska należące do fotoluminescencji różnią się stanem wzbudzonym, z którego następuje emisja fotonów. Fakt ten idealnie obrazuje diagram Jabłońskiego (Rysunek 1).



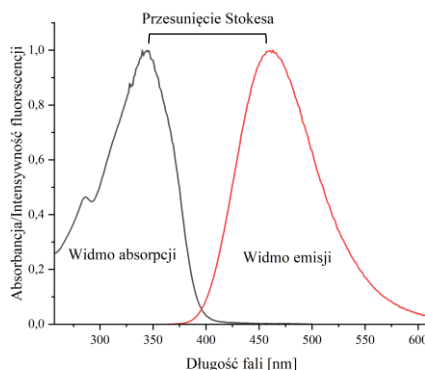
Rysunek 1. Diagram Jabłońskiego obrazujący stan podstawowy S_0 , stany wzbudzone S_1 , S_2 i T_1 oraz możliwe przejścia elektronowe; $h\nu_A$ - absorpcja światła, $h\nu_F$ - emisja promieniowania w postaci fluorescencji, $h\nu_P$ - emisja promieniowania w postaci fosforescencji.¹

Diagram Jabłońskiego przedstawia singletowy stan podstawowy S_0 oraz singletowe stany wzbudzone S_1 oraz S_2 . W każdym z tych stanów wyróżnia się poziomy oscylacyjne, zwane także wibracyjnymi, kolejno 0, 1, 2 itd. Ponadto diagram obrazuje także stany trypletowe, z których najniższy wzbudzony oznaczony jest jako T_1 . Częstka absorbuje energię w postaci światła w czasie krótszym niż 10^{-15} sekundy w wyniku czego następuje jej wzbudzenie i przejście z singletowego stanu podstawowego do jednego ze stanów oscylacyjnych singletowych stanów wzbudzonych (np. S_1 lub S_2). Podczas tego bardzo szybkiego procesu nie następuje zmiana prędkości oraz położenia jąder atomowych (zasada Francka-Condon). Po wzbudzeniu większość cząstek w wyniku relaksacji oscylacyjnej (przejście cząsteczki z wyższych poziomów oscylacyjnych danego stanu wzbudzonego do jego najniższego poziomu oscylacyjnego) oraz konwersji wewnętrznej (bezpromienne przejście cząsteczki z poziomu wzbudzonego o wyższej energii do poziomu o niższej energii bez emisji światła trwające 10^{-12} s lub krócej) przechodzi do najniższego poziomu wibracyjnego singletowego stanu wzbudzonego S_1 . Następnie cząstka powraca do poziomu podstawowego stanu singletowego, czemu może towarzyszyć emisja fluorescencji. Rzadszym przypadkiem jest emisja z drugiego singletowego stanu wzbudzonego S_2 .³⁻⁵ Cząsteczki w stanie S_1 mogą ulegać także konwersji spinu i w wyniku przejścia międzysystemowego (oznaczonego czarną strzałką przerywaną) znaleźć się w pierwszym wzbudzonym stanie trypletowym, który charakteryzuje się niższą energią w porównaniu do S_1 . Promieniste przejście ze stanu T_1 do S_0 nazywane jest fosforescencją. Jednak stałe szybkości emisji ze stanu trypletowego są o kilka rzędów wielkości mniejsze (przejście wzbronione). Alternatywą dla emisji fotonu na drodze fluorescencji czy fosforescencji są przejścia bezpromienne. Przejście bezpromienne polega na relaksacji stanów wzbudzonych atomów lub cząsteczek, w których energia jest przekazywana do środowiska bez emisji promieniowania elektromagnetycznego. Zamiast emisji fotonu, energia jest oddawana najczęściej w wyniku zderzeń międzycząsteczkowych lub poprzez drgania i ruch wewnętrzny. Do przejść bezpromienistych zalicza się już wcześniej wspomnianą konwersję wewnętrzną czy przejścia międzysystemowe. Prawdopodobieństwo przejść promienistych czy bezpromienistych zależy m.in. od struktury cząsteczki oraz jej otoczenia i wpływa na trwałość stanów wzbudzonych, co bezpośrednio przekłada się na wydajność procesów fotoluminescencyjnych.¹

Poza niemal natychmiastową fluorescencją może występować także fluorescencja opóźniona. Jest to emisja fotonu zachodząca z pewnym opóźnieniem po wzbudzeniu

cząsteczki, wynikającym z procesów bezpromienistych, które poprzedzają ponowne obsadzenie singletowego stanu wzbudzonego. Przykładem jest opóźniona fluorescencja aktywowana termicznie (TADF, ang. *Thermally Activated Delayed Fluorescence*), w której energia cieplna umożliwia odwrócone przejście międzysystemowe (RISC, ang. *Reverse Intersystem Crossing*) ze stanu trypletowego do singletowego, co prowadzi do opóźnionej emisji fluorescencji. Samo zjawisko opóźnionej fluorescencji może trwać od mikrosekund do milisekund i jest wykorzystywane w otrzymywaniu wydajnych organicznych diod elektroluminescencyjnych (OLED, ang. *Organic Light-Emitting Diode*), gdzie odzyskana energia zgromadzona w stanach trypletowych pozwala na zwiększenie wydajności emisji. TADF stanowi alternatywę dla materiałów wykazujących fosforescencję zawierających metale ziem rzadkich.^{6,7}

Zjawisko fluorescencji można opisać kilkoma charakterystycznymi właściwościami, a odstępstwa od nich są wyjątkami. W XIX wieku George Stokes opisał zjawisko przesunięcia Stokesa, obrazującego różnicę między długością fali (lub energią) światła pochłoniętego przez daną próbkę a długością fali światła emitowanego przez ten obiekt w procesie fluorescencji (Rysunek 2).¹



Rysunek 2. Przesunięcie Stokesa. Widmo absorpcji oraz fluorescencji Tyr(acDMA)₂ zmierzone w MeCN. Badania własne.

Reguła Stokesa jest zachowana, gdy światło wzbudzające leży w obszarze absorpcji i jest przesunięte hipsokromowo względem widma fluorescencji. W momencie wzbudzania fluorescencji światłem o długości fali znajdującej się w miejscu nakładania widm absorpcji i emisji zasada Stokesa nie jest spełniona, a ten fragment widma absorpcji nazywa się antystokesowkim.¹

Wynikiem pomiarów fluorescencji są widma emisyjne, których zakres i kształt w większości przypadków nie zależą od długości fali wzbudzenia, o ile wzbudzenie

następuje w stokesowskim obszarze widma absorpcji cząsteczki. Niezależnie od tego, na jaki poziom wzbudzenia elektronowego cząsteczka zostanie wzbudzona, emisja światła (fluorescencja lub fosforescencja) zachodzi z najniższego wzbudzonego stanu singletowego (S_1) lub trypletowego (T_1), zgodnie z regułą Kashy.⁸ Z kolei fizyk Siergiej Wawiłow stwierdził, iż wydajność kwantowa fluorescencji jest praktycznie niezależna od długości fali wzbudzającego światła. W takim przypadku, stosunek liczby wyemitowanych fotonów do liczby pochłoniętych pozostaje stały, chociaż energia wyemitowanych fotonów jest mniejsza niż energia pochłoniętych. Zjawisko to wynika z utraty nadmiaru energii w procesach niepromienistych i jest konsekwencją reguły Kashy. Duże stężenie fluoroforu, temperatura, otaczające środowisko czy oddziaływania międzycząsteczkowe mogą powodować odstępstwa od reguły Wawiłowa, wpływając tym samym na wartość wydajności kwantowej fluorescencji.¹ Ważne jest także, że zasada ta nie obowiązuje przy wzbudzeniu w obszarze antystokesowskim, gdzie obserwuje się silny spadek wydajności kwantowej fluorescencji w miarę wzrostu wartości długości fali wzbudzenia. Zjawisko to zostało udokumentowane już w latach 50. XX wieku.^{1,9}

Widma absorpcyjne i emisyjne zazwyczaj są względem siebie lustrzanymi odbiciami (zasada zwierciadła). Wynika to z podobieństwa elektronowego i wibracyjnego stanu podstawowego i wzbudzonego, dzięki czemu widma odzwierciedlają te same różnice energii między poziomami wibracyjnymi. Czynniki mogące zaburzać tę właściwość są np. zmiana polarność otoczenia czy procesy niepromieniste.^{1,10}

Użyteczność znacznika fluorescencyjnego ocenia się na podstawie charakterystyki zjawiska fluorescencji z jego udziałem, zarówno w ujęciu jakościowym, jak i ilościowym. Do najważniejszych parametrów ilościowych zalicza się wydajność kwantową fluorescencji (QY) oraz czasy zaniku fluorescencji (τ). Mimo, że czas życia stanu wzbudzonego jest niezależny od liczby cząsteczek fluoroforu, opisuje dynamikę procesu i pozwala ocenić efektywność emisji.

Wydajność kwantowa fluorescencji, która określa jak wydajnym fluoroforem jest związek, to stosunek fotonów wyemitowanych do fotonów zaabsorbowanych:

$$QY = \frac{\text{ilość fotonów emitowanych}}{\text{ilość fotonów pochłoniętych}}$$

gdzie: QY - wydajność kwantowa fluorescencji.¹

Wydajność kwantowa fluorescencji jest determinowana przez wiele czynników, a zrozumienie ich wpływu na wartość tego parametru pozwala na świadomy dobór

odpowiedniego znacznika fluorescencyjnego, poprawne zaplanowanie eksperymentu oraz właściwą interpretację jego wyników. Na zmniejszenie wartości QY wpływa relaksacja bezpromienista - im więcej energii ulega rozproszeniu przez konwersję wewnętrzną oraz przejścia międzysystemowe tym mniejsza wartość QY. Kolejnym ważnym czynnikiem jest środowisko w tym np. zmiany polarności, obecność wygaszaczy, temperatura próbki.¹¹⁻¹³

Innym istotnym parametrem opisującym zjawisko fotoluminescencji jest czas zaniku fluorescencji, który określa jak długo cząstka przebywa w stanie wzbudzonym przed powrotem do stanu podstawowego.

2.1. Spektroskopia rozdzielcza w czasie

Spektroskopia rozdzielcza w czasie stanowi jedno z najważniejszych narzędzi nowoczesnej spektroskopii fluorescencyjnej, umożliwiając badanie dynamiki procesów fotofizycznych i fotochemicznych zachodzących w bardzo krótkich przedziałach czasowych - od pikosekund do nanosekund. W przeciwieństwie do klasycznych metod opartych wyłącznie na pomiarze zakresu i intensywności fluorescencji, techniki czasowo-rozdzielcze pozwalają na analizę czasu życia fluorescencji, który stanowi parametr opisujący, jak długo cząsteczka pozostaje w stanie wzbudzonym. Czas życia fluorescencji jest niezwykle czuły na zmiany w lokalnym środowisku cząsteczki, takie jak lepkość, polarność, obecność jonów metali, zmiany konformacyjne białek czy oddziaływania molekularne, jednakże nie zależy od intensywności światła wzbudzającego. Dzięki temu spektroskopia rozdzielcza w czasie znajduje szerokie zastosowanie w chemii, biologii, biofizyce oraz diagnostyce medycznej, oferując możliwość monitorowania procesów molekularnych z wysoką precyzją czasową i przestrzenną. Jedną z wysublimowanych metod wykorzystujących pomiary czasów zaniku fluorescencji jest mikroskopia fluorescencyjna, w tym technika FLIM (ang. *Fluorescence-lifetime Imaging Microscopy*), która znajduje szerokie zastosowanie w badaniach obrazowania struktur komórkowych.

2.1.1. Czasy życia fluorescencji

Czas życia fluorescencji jest określany jako średni czas, jaki upływa między wzbudzeniem cząsteczki światłem a emisją fotonu. Alternatywnie można go określić jako czas, po którym intensywność emisji po bardzo krótkim impulsie wzbudzającym (typu δ)

spada do $1/e$ wartości początkowej. Przewagą pomiarów czasu zaniku fluorescencji jest ich uniezależnienie od stężenia fluoroforu, intensywności źródła światła i geometrii układu pomiarowego. Czas życia fluorescencji zależy od właściwości samej cząsteczki fluoroforu, lokalnego środowiska chemicznego (pH, polarność, obecność jonów metali), procesów, takich jak wygaszanie (dynamiczne, statyczne), transfer energii lub transfer elektronu. Próbką zawierającą fluorofor jest wzbudzana impulsem światła w wyniku czego generowana jest populacja fluoroforów w stanie wzbudzonym. Depopulacja stanu wzbudzonego zachodzi z szybkością równą sumie Γ i k_{nr} .¹

$$\frac{dn(t)}{dt} = -(\Gamma + k_{nr}) n(t)$$

gdzie: $n(t)$ jest liczbą wzbudzonych cząstek w czasie t po wzbudzeniu, Γ jest stałą szybkości przejść promienistych, k_{nr} jest stałą szybkości przejść bezpromienistych.¹

W eksperymencie nie mierzy się bezpośrednio liczby wzbudzonych cząsteczek, lecz intensywność fluorescencji, która jest proporcjonalna do funkcji $n(t)$. Dlatego wynik pomiaru można przedstawić w postaci równania zależnego od intensywności.

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau)$$

gdzie: I_0 jest intensywnością emisji w czasie 0, czas życia τ jest odwrotnością całkowitej szybkości rozpadu, $\tau = (\Gamma + k_{nr})^{-1}$.¹

Pomiar czasów zaniku fluorescencji jest powszechnie wykorzystywany w np. badaniach właściwości nanokryształów, kropek kwantowych, oddziaływania białek czy obserwacji procesów zachodzących w żywych komórkach.¹⁴⁻²¹

Jedną z najdokładniejszych i najczęściej stosowanych technik pomiaru czasów życia fluorescencji obok metody fazowo-modulacyjnej jest czasowo skorelowane zliczanie pojedynczych fotonów - TCSPC (ang. *Time-Correlated Single Photon Counting*). Metoda ta pozwala na rejestrowanie rozkładu czasów w jakich fotony docierają do detektora po wzbudzeniu próbki ultrakrótkim impulsem świetlnym. TCSPC opiera się na statystycznym zliczaniu pojedynczych fotonów, z których tworzony jest histogram czasów emisji. Dzięki niezwykle wysokiej rozdzielczości metoda ta pozwala na precyzyjne wyznaczanie czasów życia fluorescencji nawet bardzo krótkotrwałych stanów wzbudzonych, co jest jej podstawową zaletą. Poza wysoką rozdzielczością czasową (umożliwiającą pomiary rzędu pikosekund) metoda ta charakteryzuje się

wysoką czułością i brakiem zależności od intensywności wzbudzenia. Do ograniczeń tej techniki zalicza się z kolei wysokie wymagania sprzętowe, długi czas zbierania danych, brak rejestracji szybkich i ciągłych zmian sygnału.

TCSPC jest jedną z najczęściej stosowanych i najdokładniejszych metod wyznaczania czasów życia fluorescencji we fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej z techniką FLIM.

2.1.2. Mikroskopia fluorescencyjna z wykorzystaniem techniki FLIM

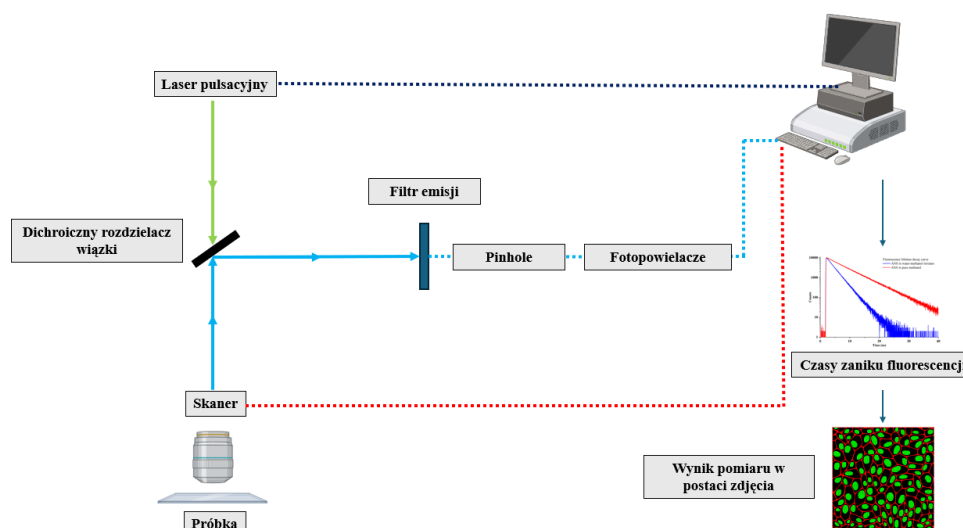
Mikroskopia fluorescencyjna stanowi jedną z najważniejszych technik obrazowania wykorzystywaną w biologii, chemii oraz naukach medycznych, pozwalając na wizualizację struktur komórkowych i pojedynczych cząstek w czasie rzeczywistym z wysoką czułością i specyficznością. Obrazowanie optyczne jest względnie bezpieczne dla żywych organizmów (światło jest niejonizujące, nieniszczące i minimalnie inwazyjne), co umożliwia pozyskanie wielu informacji niedostępnych dla innych technik. Dzięki mikroskopii fluorescencyjnej możliwe jest uzyskanie także wyjątkowo szczegółowych danych. Metoda ta daje sposobność nie tylko do analizy strukturalnej próbki, ale także do śledzenia zmian dynamicznych występujących w próbce.

Fluorescencyjna mikroskopia konfokalna umożliwia obrazowanie struktur komórkowych i tkankowych z wysoką precyzją, dzięki eliminacji światła pochodzącego spoza ogniska. Pozwala to na uzyskanie przekrojów optycznych oraz trójwymiarowych rekonstrukcji badanych obiektów. Eliminacja sygnału spoza ogniska realizowana jest poprzez zastosowanie przesłony konfokalnej (pinhole), co prowadzi do zwiększania kontrastu obrazu i poprawy rozdzielczości. Dzięki temu możliwe jest obrazowanie próbek z selektywnością osiową niedostępną w klasycznej mikroskopii fluorescencyjnej.^{22,23} Połączenie fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej z techniką FLIM pozwala na analizę właściwości fluoroforów nie tylko na podstawie intensywności sygnału, lecz także, a właściwie przede wszystkim, poprzez pomiar długości życia stanu wzbudzonego. W tej metodzie rejestruje się czas pomiędzy impulsem wzbudzającym a detekcją pojedynczego fotonu fluoroforu, a dane wykorzystywane są do generowania histogramu zaniku fluorescencji w każdym pikselu obrazu. Metoda ta umożliwia analizę zjawisk fotofizycznych, które często są niemożliwe do interpretacji i zaobserwowania tylko na podstawie pomiaru intensywności fluorescencji. Istotną zaletą badań opierających się na technice FLIM jest uniezależnienie się od stężenia badanego związku, którego kontrola zwłaszcza w układach biologicznych jest bardzo utrudniona. Czas zaniku fluorescencji

jest znacznie mniej podatny na artefakty między innymi wynikające z rozpraszania światła, wahań intensywności wzbudzenia, fotowysielania, zmian długości ścieżki optycznej lub niejednorodnego oświetlenia próbki. Na przestrzeni lat technika FLIM zyskała dużą popularność w różnych dziedzinach nauki. Jednym z przykładów jest jej zastosowanie do badania interakcji między białkami, białkami i membranami, czy białkami i enzymami lub receptorami z wykorzystaniem zjawiska FRET (rezonansowy transfer energii Förstera; ang. *Förster Resonance Energy Transfer*).^{24–27} FLIM jest wykorzystywany w badaniach wykrywających obecność jonów,²⁸ skupiających się na analizie pH,²⁹ temperatury,^{30,31} w diagnostyce raka i monitorowaniu leczenia,³² w kryminalistyce^{33,34} oraz analizie dzieł sztuki³⁵. Technika FLIM jest wielozadaniowa, a jej wykorzystanie stale rośnie.³⁴ Mikroskopię FLIM zintegrowano z innymi metodami, co znacznie poszerzyło jej potencjał aplikacyjny. Stosuje się techniki hybrydowe, w których FLIM połączono m.in. ze spektroskopią korelacji fluorescencji (FCS, ang. *Fluorescence Correlation Spectroscopy*),³⁶ mikroskopią bliskiego pola (SNOM, ang. *Scanning Near-field Optical Microscopy*),³⁷ mikroskopią z oświetleniem jednopłaszczyznowym (SPIM, ang. *Single Plane Illumination Microscopy*),³⁷ mikroskopią sił atomowych (AFM, ang. *Atomic Force Microscope*),³⁸ techniką powrotu fluorescencji po fotowysieleniu (FRAP, ang. *Fluorescence Recovery After Photobleaching*),³⁹ mikroskopią TIRF (ang. *Total Internal Reflection*),^{40,41} mikroskopią STED (ang. *Stimulated Emission Depletion*),⁴² mikroskopią CARS (ang. *Coherent Anti-stokes Raman Scattering*)^{43,44} oraz tomografią⁴⁵.

W praktyce jako źródła światła we fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej używa się obecnie głównie laserów tytanowo-szafirowych generujących ultrakrótkie impulsy (piko- i femtosekundowe), które są wydajne, łatwe w obsłudze i dostępne komercyjnie. Alternatywą są np. tanie lasery diodowe o bardzo szerokim zakresie długości fal wzbudzenia. Do detekcji najczęściej stosuje się klasyczne fotopowielacze (proste i tanie, choć wrażliwe na silne światło), fotopowielacze zawierające płyty mikrokanalikowe (droższe, ale oferujące najlepszą rozdzielczość czasową) oraz fotodiody lawinowe (SPAD), które są odporne na wysokie natężenie światła i bardzo czułe, lecz mają wąski obszar aktywny.⁴⁶

Wykorzystanie TCSPC w technice FLIM (Rysunek 3) niesie za sobą wiele zalet, takich jak dobry stosunek sygnału pochodzącego od próbki do sygnałów pochodzących z tła czyli tzw. szumów, wysoką czułość, szeroki zakres dynamiczny i nieskomplikowaną wizualizację krzywych zaniku fluorescencji.^{47,48}



Rysunek 3. Uproszczony schemat działania fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego z techniką FLIM opierający się na metodzie TCSPC.⁴⁹

3. Wpływ środowiska na właściwości spektralne i fotofizyczne

Fluorofory, będące związkami chemicznymi zdolnymi do emisji światła w wyniku absorpcji promieniowania, odgrywają kluczową rolę w licznych technikach analitycznych i biofizycznych, takich jak spektroskopia, w tym mikroskopia fluorescencyjna i obrazowanie *in vitro* oraz *in vivo*.

Środowisko chemiczne i fizyczne fluoroforu może mieć znaczący wpływ na położenie widm absorpcji i emisji, wartości wydajności kwantowej fluorescencji czy wystąpienie wygaszania fluorescencji lub transferu energii. Na opisane powyżej parametry spektroskopowe wpływają zarówno właściwości środowiska molekularnego, jak i procesy zachodzące w cząsteczce w stanie wzbudzonym. Do czynników środowiskowych zalicza się m.in. polarność i lepkość otoczenia, zdolność do tworzenia wiązań wodorowych, szybkość relaksacji rozpuszczalnika, stabilność mikrośrodowiska, pH, obecność jonów metali, ciśnienie osmotyczne, temperaturę oraz obecność dodatkowych składników, takich jak białka czy lipidy. Na parametry te wpływają również procesy fotofizyczne i fotochemiczne, takie jak wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie ładunku, przeniesienie protonu, oddziaływania między cząsteczkami sond (np. agregacja) oraz zmiany w szybkościach dezaktywacji radiacyjnej i nieradiacyjnej.¹

Zrozumienie tych zależności jest niezbędne do prawidłowej interpretacji wyników eksperymentalnych i projektowania nowych, bardziej selektywnych oraz stabilnych sond fluorescencyjnych.

W niniejszym rozdziale zostanie omówiony wpływ środowiska na właściwości spektroskopowe fluoroforów. Analiza tych czynników ma kluczowe znaczenie nie tylko dla podstawowych badań naukowych, ale także dla praktycznych zastosowań fluorescencji w diagnostyce medycznej, biologii molekularnej czy nanotechnologii.

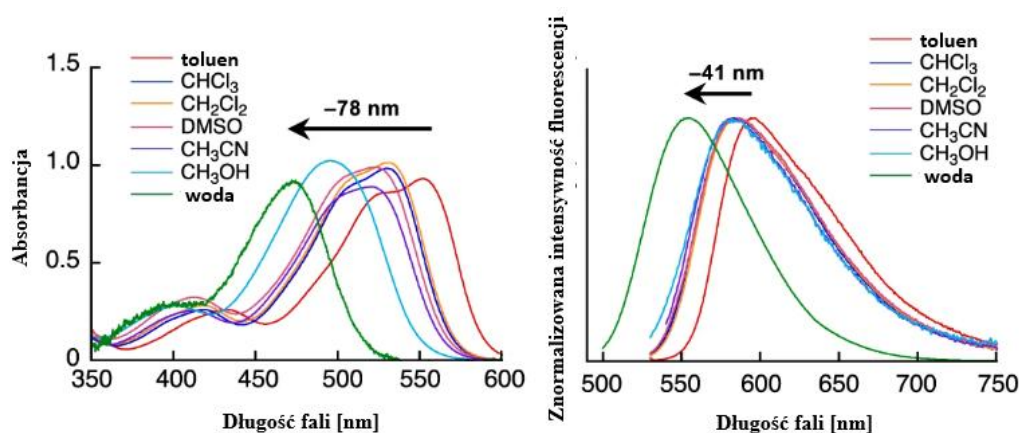
3.1. Efekty solwatochromowe

Efekty solwatochromowe istotnie wpływają na właściwości fotofizyczne fluoroforów. Solwatacja to proces oddziaływania cząsteczek rozpuszczalnika z rozpuszczoną substancją, w tym przypadku z cząsteczką fluoroforu. Kierunek i siła tych oddziaływań zależy od charakteru rozpuszczalnika (np. jego polarności), jego zdolności do tworzenia wiązań wodorowych, a także od polarności i momentu dipolowego samego fluoroforu zarówno w stanie podstawowym, jak i wzbudzonym.

Po wzbudzeniu fluoroforu dochodzi do zmiany rozkładu jego ładunku, co może wpływać na sposób, w jaki oddziałuje on z otaczającymi cząsteczkami rozpuszczalnika. Moment dipolowy fluoroforu przeważanie jest wyższy w stanie wzbudzonym niż w stanie podstawowym. Po wzbudzeniu dipole rozpuszczalnika mogą zmienić orientację lub ulec relaksacji w otoczeniu fluoroforu, co obniża energię stanu wzbudzonego i skutkuje przesunięciem widma emisji w kierunku dłuższych fal. Relaksacja rozpuszczalnika to kluczowy proces w fotofizyce molekuł fluorescencyjnych, zachodzący bezpośrednio po absorpcji światła i przejściu cząsteczki fluoroforu do stanu wzbudzonego. Proces ten warunkuje właściwości widm fluorescencji oraz dynamiki stanów wzbudzonych i może trwać od kilku pikosekund do nanosekund, w zależności od lepkości, polarności i struktury rozpuszczalnika. Efekt jest silniejszy wraz ze wzrostem polarności rozpuszczalnika.⁵⁰⁻⁵² Dodatkowo rodzaj rozpuszczalnika może wpływać na wydajność kwantową fluorescencji, stabilność znacznika fluorescencyjnego czy wygaszanie fluorescencji. Przykładowo, fluorofory w środowiskach wodnych często wykazują niższą intensywność fluorescencji niż w środowiskach organicznych, co jest związane z efektywnym wygaszaniem stanu wzbudzonego przez cząsteczki wody.⁵³ Fakt ten został opisany już prawie 60 lat temu przez Stryera, który wykazał, że woda wygasza fluorescencję kilku organicznych fluoroforów zawierających grupy donorowe protonów, co może być spowodowane transferem protonów między wodą a samym fluoroforem. Dodatkowo wskazał, iż woda deuterowana (D_2O) jest znacznie słabszym wygaszacem niż H_2O , co wiąże się z wpływem izotopu na szybkość transferu protonu podczas życia stanu wzbudzonego danego związku. Co więcej, podstawienie H_2O przez D_2O znacząco

wpływa na procesy relaksacji oscylacyjnej oraz dynamikę dezaktywacji stanu wzbudzonego. Cięższy deuter warunkuje obniżenie częstości drgań O-D w porównaniu z O-H powodując mniejsze dopasowanie energetyczne pomiędzy poziomami oscylacyjnymi fluoroforu i rozpuszczalnika. Konsekwencją tego jest mniej efektywna relaksacja oscylacyjna i procesy bezpromieniste w D₂O w porównaniu z H₂O, co może prowadzić do wydłużenia czasu życia fluorescencji oraz wzrostu wydajności kwantowej fluorescencji.⁵⁴ W późniejszych latach wiele grup badawczych potwierdziło obserwacje Stryera dotyczące działania wody jako wygaszacza fluorescencji.^{55,56}

Obok pozytywnego efektu solwatochromowego rozumianego jako batochromowe przesuwanie się pasm absorpcji i emisji wraz ze wzrostem polarności rozpuszczalnika, barwniki fluorescencyjne mogą wykazywać również negatywny (lub odwrotny) efekt solwatochromowy (Rysunek 4), który wiąże się z hipsochromowym przesuwaniem pasm absorpcji i emisji wraz ze wzrostem polarności rozpuszczalnika (Rysunek 4).⁵⁷ Bardzo rzadko, ale zdarza się, że obserwuje się te dwa zjawiska jednocześnie. Taki wyjątkowy przykład opisano dla związku 9-(2-(4-(N,N-dimetyloamino)fenylo)etynylo)antracen-10-karbonitrylu (CNAacDMA).⁵⁸



Rysunek 4. Znormalizowane widma absorpcji i emisji kwasu tłuszczowego AP-C12 zmierzone w różnych rozpuszczalnikach, obrazujące negatywny efekt solwatochromowy.⁵⁷

Interpretacja widm emisji nie zawsze jest oczywista ze względów na złożoność procesów, które na nie wpływają. Do pełniejszej charakterystyki wpływu otoczenia na właściwości spektroskopowe znacznika fluorescencyjnego wykorzystuje się wyrażenia matematyczne. Przykładem może być równanie Kawskiego⁵⁹ czy Lipperta-Matagi¹. Równie Lipperta-Matagi opisuje zależność przesunięcia Stokesa fluoroforu od polarności

rozpuszczalnika, wynikającą z różnicy momentów dipolowych cząsteczki w stanie podstawowym i wzbudzonym:

$$\bar{\nu}_A - \bar{\nu}_F = \frac{2}{hc} \left(\frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \frac{(\mu_E - \mu_G)^2}{a^3} + constant$$

gdzie: n - współczynnik załamania światła, ϵ - stała dielektryczna, h - stała Plancka, c - prędkość światła, ν_A - długość fali absorpcji [cm^{-1}], ν_F - długość fali emisji, μ_G - moment dipolowy w stanie podstawowym, μ_E - moment dipolowy w stanie wzbudzonym, a - promień wnęki w rozpuszczalniku, czyli efektywny promień cząsteczki/fluoroformu traktowanej jako dipol umieszczony w dielektrycznym ośrodku.¹

Wykorzystując ten model matematyczny można estymować różnicę momentów dipolowych fluoroformu między stanem podstawowym a wzbudzonym na podstawie danych empirycznych. Opiera się on na założeniu kulistej geometrii cząsteczki oraz jednorodnego otoczenia dielektrycznego. Warto zaznaczyć, że równanie Lipperta-Matagi nie uwzględnia innych czynników wpływających na widma emisji, takich jak np. wiązania wodorowe czy przeniesienie ładunku, co ogranicza jego zastosowanie.

Wysoka polarność rozpuszczalnika, niezależnie od tego, z wykorzystaniem jakiej skali polarności np. skala E_N^T , Kamleta-Tafta czy Catalana jest opisywana, może zwiększać prawdopodobieństwo przejść niepromienistych, a tym samym obniżać intensywność fluorescencji. Skale te różnią się jednak zakresem informacji, jakie dostarczają o środowisku rozpuszczalnika. Parametr E_N^T opisuje polarność w sposób uogólniony jako efekt całkowity oddziaływań solwatacyjnych, natomiast podejście Kamleta-Tafta pozwala rozdzielić wpływ kwasowości rozpuszczalnika (donor wiązania wodorowego), jego zasadowości (akceptor wiązania wodorowego) oraz składowej dipolarno-polaryzowalnej (π^*). Jeszcze bardziej szczegółowy opis zapewnia skala Catalana, w której osobno uwzględnia się kwasowość i zasadowość rozpuszczalnika, a także niezależne parametry dipolarności oraz polaryzowalności. Zastosowanie tych skal umożliwia dokładniejszą interpretację zmian właściwości fluorescencyjnych, zwłaszcza gdy na wydajność emisji wpływają nie tylko efekty polarności, ale również oddziaływania specyficzne, takie jak tworzenie wiązań wodorowych czy stabilizacja stanów wzbudzonych.⁶⁰⁻⁶³

Opisany model, stosowany w środowiskach biologicznych, ze względu na mnogość oddziaływań w takich układach, może prowadzić do wyników przybliżonych lub odbiegających od wartości teoretycznych.¹

Efekty solwatochromowe stanowią kluczowy punkt odniesienia przy projektowaniu czułych sond środowiskowo, które umożliwiają monitorowanie polarności np. błon komórkowych, pH czy obecności jonów w otoczeniu wskaźnika. Do takich zastosowań projektuje się fluorofory, których właściwości w pożądanym i ściśle określonym sposobie zależne są od mikrośrodowiska. Umożliwia to uzyskanie informacji o zmianach otoczenia znacznika w czasie rzeczywistym.

3.2. Wpływ temperatury i lepkości otoczenia

Innym istotnym czynnikiem wpływającym na właściwości spektroskopowe fluoroforów jest temperatura. Determinuje ona bezpośrednio parametry fizyczne rozpuszczalnika/otoczenia oraz fotofizyczne i fotochemiczne zachodzące w cząsteczce w stanie wzbudzonym. Zmiany temperatury mogą zatem wpływać na położenie maksimum emisji, intensywność fluorescencji, QY oraz czas życia stanu wzbudzonego. Przykładowo obniżanie temperatury może wpływać na przesuwanie się widma emisji w kierunku krótszych fal, jak np. w przypadku N-acetylo-*L*-tryptofanamidu.⁶⁴

Ponadto w obniżonych temperaturach rozpuszczalnik może stać się bardziej lepki, co bezpośrednio wpływa na wydłużenie się czasu reorganizacji cząsteczek rozpuszczalnika wokół fluoroforu. Do wykonania pomiarów w obniżonych temperaturach wybiera się rozpuszczalniki, które charakteryzują się stopniowym wzrostem lepkości lub tworzą przezroczyste szkliwo, takie jak glikol propylenowy, glikol etylenowy, glicerol czy 2-metylotetrahydrofuran.⁶² Innym mniej standardowym zjawiskiem jest pojawienie się tzw. „podwójnej fluorescencji” zależnej od temperatury, w której występują dwa pasma, a ich względna intensywność zmienia się wraz z podwyższaniem lub obniżaniem temperatury.⁶⁵

Lepkość użytego do pomiarów rozpuszczalnika ma znaczący wpływ na ich wynik. W środowisku charakteryzującym się niską lepkością, podstawniki w cząsteczkach mogą łatwo rotować wokół wiązania, a konformacja cząsteczek może się zmieniać, co bezpośrednio sprzyja procesom bezpromienistym i wygaszaniu fluorescencji. W środowiskach o wysokiej lepkości obserwuje się zwiększenie intensywności fluorescencji i wydłużenie czasu życia stanu wzbudzonego, co jest wynikiem zmniejszenia efektywności procesów bezpromienistych. Związki czułe na zmianę

lepkości mogą być stosowane jako sondy. Przykładem jest sonda DCVJ (9-(2,2-dicyjanowinył)julolidyna), która wykazuje wzrost intensywności fluorescencji wraz ze wzrostem lepkości.⁶⁶

4. Wygaszanie fluorescencji

Fluorescencja jest procesem poprzedzonym absorpcją promieniowania elektromagnetycznego, w którym cząsteczka znajdująca się w stanie wzbudzonym emituje światło. Czas przebywania cząsteczki w stanie wzbudzonym oraz intensywność emitowanego światła mogą być jednak modulowane przez różne czynniki środowiskowe i molekularne. Jednym z najważniejszych procesów wpływających na te parametry jest wygaszanie fluorescencji. Ogólnie wygaszanie fluorescencji polega na obniżaniu lub całkowitym zaniku intensywności fluorescencji, co spowodowane jest oddziaływaniem znacznika fluorescencyjnego z otoczeniem w jakim się znajduje. Zjawisko może zachodzić na drodze fizycznej lub chemicznej. Czynniki jakie mogą wpływać na wygaszanie fluorescencji jest transfer energii, temperatura, zmiany konformacyjne, lepkość środowiska, polarność środowiska, obecność wygaszaczy, takich jak np. tlen oraz pH środowiska.¹

Do głównych teorii opisujących wygaszanie fluorescencji zalicza się wygaszanie kolizyjne (dynamiczne), wygaszanie statyczne, połączone wygaszanie statyczne i dynamiczne, ale i również mechanizmy, takie jak transfer energii, wymiana elektronów czy przejścia międzysystemowe wspomagane efektem ciężkiego atomu. Zrozumienie mechanizmów wygaszania ma kluczowe znaczenie w badaniach struktury i dynamiki cząsteczek biologicznych, projektowaniu sond fluorescencyjnych oraz w spektroskopii fluorescencyjnej jako narzędziu analitycznym. Poprzez analizę zmian intensywności i czasu życia emisji można uzyskać cenne informacje o środowisku mikrocząsteczek, obecności jonów metali, oddziaływaniach molekularnych czy strukturze białek.¹

Dynamiczne wygaszanie fluorescencji opisuje równanie Sterna-Volmera:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q]$$

gdzie: F_0 - intensywność fluorescencji bez wygaszacza, F - intensywność fluorescencji w obecności wygaszacza, k_q - stała szybkości wygaszania bimolekularnego (wskaźnik wydajności procesu wygaszania lub dostępności fluoroforów dla wygaszacza,

$k_q \approx 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), τ_0 - czas życia stanu wzbudzonego fluoroforu przy braku wygaszacza, Q - stężenie wygaszacza, $K_D = k_q \tau_0$.¹

Do wygaszania dynamicznego dochodzi w skutek zderzenia fluoroforu w stanie wzbudzonym z wygaszaczem w wyniku czego następuje utrata energii i brak emisji fotonu. Wygaszanie kolizyjne charakteryzuje się równoważnym spadkiem intensywności fluorescencji oraz skróceniem czasu życia stanu wzbudzonego, co jest następstwem depopulacji stanu wzbudzonego.¹ Wygaszacze kolizyjne znajdują zastosowanie w określaniu oddziaływań występujących w stanie wzbudzonym.⁶⁷

Wygaszanie statyczne polega na tworzeniu niefluorescencyjnego kompleksu między fluoroforem a wygaszaczem w stanie podstawowym. Kompleks po absorpcji światła natychmiast powraca do stanu podstawowego bez emisji fotonu. W celu opisu wygaszania statycznego można się posłużyć równaniem:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_s[Q]$$

gdzie: F_0 - intensywność fluorescencji bez wygaszacza, F - intensywność fluorescencji w obecności wygaszacza, K_s - stała asocjacji kompleksu.¹

Zależność F_0/F od $[Q]$ jest liniowa i identyczna jak dla wygaszania dynamicznego. Jedyną różnicą jest zastąpienie stałej wygaszania stałą asocjacji kompleksu.

Pomiary intensywności fluorescencji nie wskażą jednoznacznie jaki rodzaj wygaszania występuje w układzie. Dokładniejsze określenie rodzaju wygaszania fluorescencji umożliwia pomiar czasu życia fluorescencji. W przypadku wygaszania statycznego część cząsteczek jest skompleksowana i nie wykazuje fluorescencji, a czas życia stanu wzbudzonego jest tylko mierzalny dla cząsteczek nieskompleksowanych, więc $\frac{\tau_0}{\tau} = 1$ (gdzie τ_0 to czas życia stanu wzbudzonego fluoroforu przy braku wygaszacza, τ to czas życia stanu wzbudzonego fluoroforu w obecności wygaszacza).

Ponadto dokładna analiza widm absorpcyjnych fluoroforu stanowi jedną z metod umożliwiających rozróżnienie między wygaszaniem statycznym a dynamicznym. Wygaszanie kolizyjne oddziałuje wyłącznie na stany wzbudzone fluoroforu, nie powinno prowadzić do zmian w jego widmie absorpcji. Odmienne przedstawia się sytuacja w przypadku tworzenia kompleksów w stanie podstawowym - często towarzyszą jej zauważalne zaburzenia w widmie absorpcyjnym fluoroforu.¹

Obserwuje się również przypadki wygaszania, w których mechanizmy statyczny oraz dynamiczny zachodzą jednocześnie. Potwierdzają to badania nad oddziaływaniem 2-aminopuryny z DNA czy wykrywanie 2,4,6-trinitrobenzenu za pomocą kationowego sprzężonego polimeru.^{68,69}

Zjawisko wygaszania fluorescencji znajduje szerokie zastosowanie w badaniach białek⁷⁰⁻⁷³ czy w badaniu membran lipidowych i ich oddziaływań z fluoroformami.⁷⁴⁻⁷⁷ Pozwala np. badać proces dyfuzji tlenu w błonach lipidowych.⁷⁸

Rezonansowy transfer energii Förstera (FRET) jest jedynym z procesów powodujących spadek intensywności fluorescencji, czyli wygaszanie fluorescencji. FRET polega na bezpromienistym przeniesieniu energii z donora do akceptora powodując zmniejszenie intensywności fluorescencji donora i jednoczesny wzrost intensywności emisji akceptora, jeśli akceptor posiada zdolność do fluorescencji, w innym przypadku energia jest rozpraszana na drodze przejść bezpromienistych. Mechanizm rezonansowego transferu energii jest taki sam niezależnie od tego, czy akceptor jest fluoroformem. FRET nie wymaga bezpośredniego kontaktu molekularnego pomiędzy donorem i akceptorem, jak w przypadku wygaszania statycznego czy dynamicznego, dlatego transfer energii nie jest wrażliwy na czynniki steryczne czy oddziaływania elektrostatyczne, ale ściśle zależy od odległości między donorem i akceptorem. Odległość, przy której FRET jest wydajny w 50 %, nazywana jest odległością Förstera i mieści się najczęściej w przedziale między 20 a 60 Å. Stała szybkość transferu energii między akceptorem i donorem opisywana jest równaniem:¹

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$$

gdzie: τ_D - czas życia fluorescencji donora przy braku akceptora, r - odległość między donorem a akceptorem, R_0 - odległość Förstera.¹

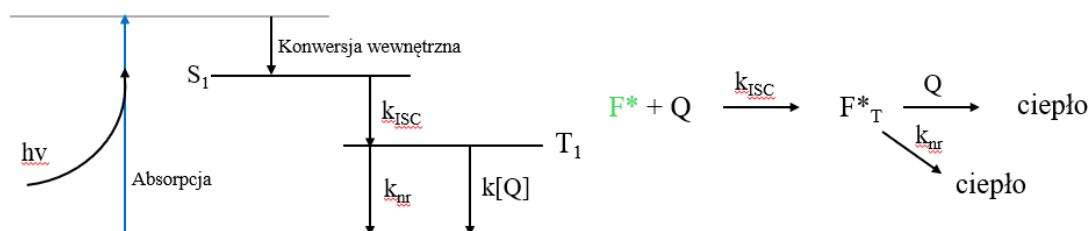
Proces rezonansowego transferu energii nie zachodzi poprzez emisję i ponowną absorpcję fotonów. Podstawą teorii transferu energii jest założenie, że fluoroform działa jak oscylujący dipol, zdolny do wymiany energii z innym dipolem, którego częstotliwość drgań jest zbliżona do jego własnej w warunkach rezonansu.^{1,79}

Do innych mechanizmów wygaszania fluorescencji można zaliczyć:

- przejścia międzysystemowe lub efekt ciężkiego atomu;
- wymiana elektronów lub oddziaływania Dexter;

- fotoindukowany transfer elektronów.

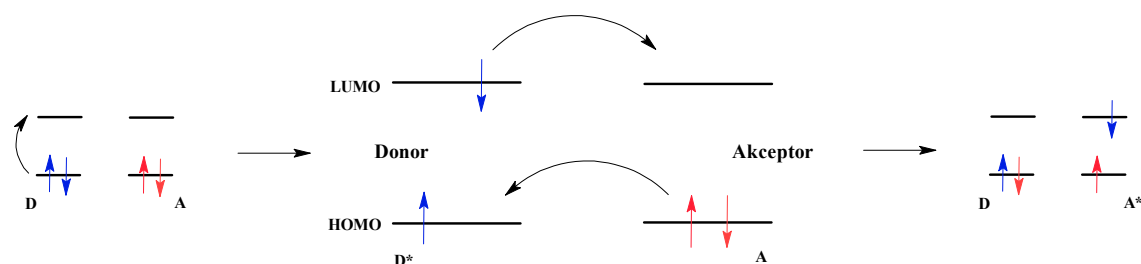
Wygaszanie fluorescencji może zachodzić na drodze przejścia międzysystemowego (Rysunek 5), które polega na bezpromienistym przejściu elektronu ze wzbudzonego stanu singletowego S_1 do stanu trypletowego T_1 . Proces ten wymaga zmiany spinu elektronu i jest ułatwiany m.in. przez silne sprzężenie spin-orbital lub obecność ciężkich atomów w cząsteczce. Przejście do stanu T_1 skutecznie omija radiacyjną ścieżkę relaksacji i prowadzi do zmniejszenia intensywności emisji, ponieważ fluorescencja zachodzi wyłącznie z poziomu S_1 . Czas życia stanu trypletowego jest zazwyczaj dłuższy i może ulegać dalszej dezaktywacji w procesach nieradiacyjnych lub przez oddziaływanie z tlenem cząsteczkowym, co dodatkowo zwiększa efektywność wygaszania fluorescencji.^{80–82}



Rysunek 5. Wygaszanie fluorescencji opierające się na przejściach międzysystemowych, gdzie: F^* - cząsteczka znajdująca się w stanie wzbudzony singletowym, F^*_T - cząsteczka znajdująca się w stanie wzbudzony trypletowym, k_{ISC} - stała szybkości przejść międzysystemowych, k_{nr} - stała szybkości przejścia niepromienistego, $k[Q]$ - stała szybkości wygaszania fosforescencji, Q - wygaszacz fluorescencji lub fosforescencji.¹

Wymiana elektronów związana z oddziaływaniem Dextera (Rysunek 6) zachodzi pomiędzy wzbudzonym donorem a akceptorem. Donor po absorpcji fotonu przechodzi w stan wzbudzony S_1 , w którym elektron przemieszcza się z orbitalu HOMO (ang. *Highest Occupied Molecular Orbital*) na LUMO (ang. *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*). Mechanizm Dextera wymaga bardzo bliskiego kontaktu cząsteczek (1 - 10 nm), ponieważ orbitale elektronowe donora i akceptora muszą się nakładać. W takiej sytuacji dochodzi do jednoczesnej wymiany dwóch elektronów: elektron ze wzbudzonego donora przechodzi do akceptora, a jednocześnie elektron z akceptora przechodzi do donora. W wyniku tego donor wraca do stanu podstawowego bez emisji fluorescencji, natomiast akceptor przechodzi do stanu wzbudzonego (singletowego lub trypletowego).

Wzbudzony stan donora zanika nieradiacyjnie, co skutecznie konkuruje z fluorescencją i prowadzi do jej wygaszenia.¹



Rysunek 6. Wygaszanie fluorescencji opierające się na wymianie elektronów (oddziaływania Dexter); D - donor, A - akceptor, D* - wzbudzona forma donora, A* - wzbudzona forma akceptora.¹

Mechanizm ten umożliwia zarówno transfer singlet-singlet, jak i tryplet-tryplet. Z kolei fotoindukowany transfer elektronów (PET) polega na przeniesieniu elektronu pomiędzy donorem a akceptorem po wzbudzeniu jednej z cząsteczek. W mechanizmie PET fluorofor może pełnić zarówno rolę donora, jak i akceptora elektronów, a kierunek transferu determinują potencjały redoks w stanie podstawowym i wzbudzonym. Dlatego w PET termin „donor” odnosi się zawsze do cząsteczki przekazującej elektron, niezależnie od tego, która z nich została wzbudzona. W wyniku tego procesu może tworzyć się kompleks o charakterze ekscypleksu (kompleks tworzący się wyłącznie w stanie wzbudzonym, powstający w wyniku oddziaływania pomiędzy dwiema różnymi cząsteczkami - najczęściej donorem i akceptorem elektronów), choć PET może zachodzić również poprzez krótkotrwałe oddziaływania zderzeniowe. Rekombinacja ładunku (powrót elektronu z akceptora do donora) i powrót układu do stanu podstawowego zazwyczaj przebiega bez emisji fotonu, chociaż w niektórych przypadkach obserwowana jest emisja pochodząca z ekscypleksu. Nadmiarowy elektron przekazany do akceptora zwykle powraca do donora w procesie rekombinacji.¹

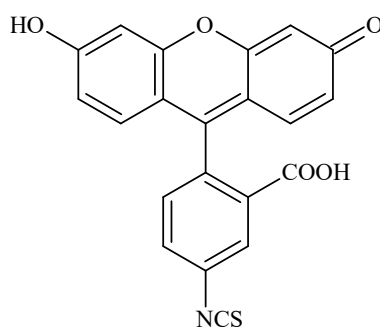
5. Znaczniki fluorescencyjne zewnętrzne

Znaczniki fluorescencyjne stanowią nieodzowne narzędzie w nowoczesnych badaniach biologicznych, biofizycznych oraz biochemicznych. Oprócz naturalnych fluoroforów, takich jak aromatyczne aminokwasy białkowe i NADH, oraz fluoroforów genetycznie kodowanych (np. GFP i jego pochodnych), szczególne znaczenie mają zewnętrzne znaczniki fluorescencyjne - cząsteczki fluoroforowe, którymi analizowane układy są wzbogacone. Znaczniki te są szeroko stosowane w mikroskopii

fluorescencyjnej, w tym w technice FRET, która umożliwia analizę lokalizacji np. białek czy badania interakcji molekularnych. Ich skuteczne zastosowanie wymaga odpowiedniego doboru strategii znakowania, np. poprzez wiązanie z grupami funkcyjnymi (takimi jak -NH_2 , -COOH i -SH) lub z wykorzystaniem bioortogonalnych reakcji chemicznych. Czasem fluorofory wprowadzane są do badanych układów w formie niezwiązanej. Odpowiednie projektowanie i zastosowanie znaczników fluorescencyjnych zewnętrznych umożliwia badania z wysoką czułością i pozwala na analizę dynamicznych procesów biologicznych w czasie rzeczywistym.

Zaletą znaczników zewnętrznych jest ich różnorodność strukturalna i spektroskopowa - można je dobrać do konkretnego zastosowania uwzględniając potrzeby i możliwości eksperymentu. Podczas doboru bierze się pod uwagę m.in. długość fali wzbudzenia i zakres emisji, wydajność kwantową fluorescencji, odporność na fotowysbielenie czy wrażliwość na warunki środowiskowe.

Dużą popularnością w badaniach naukowych cieszą się znaczniki fluorescencyjne z rodziny fluorescein i rodamin. Pochodne fluoresceiny stosunkowo łatwo sprzęga się z innymi molekułami. Na rynku pochodne fluorescein można znaleźć w postaci kwasów karboksylowych, izotiocyanianów (Rysunek 7), estrów sukcyminidylowych czy komercyjnych zestawów reaktywnych do znakowania kwasów nukleinowych. Pochodne fluoresceiny są powszechnie wykorzystywanymi znacznikami fluorescencyjnymi z emisją w zakresie zielonym, dobrze rozpuszczalnymi w wodzie, jednak wykazują pewne ograniczenia. Jednym z nich jest wysoka podatność na fotowysbielenie czy wrażliwość na zmiany pH (fluorescencja fluoresceiny jest redukowana w roztworze o pH poniżej 7).⁸³ Inną wadą jest podatność na samowysgaszanie zwłaszcza przy wysokim stopniu wyznakowania. Wady tego znacznika sprawiają, że wykorzystanie go do pomiarów ilościowych jest problematyczne, a tendencja do fotowysbielenia zmniejsza czułość technik opartych na pomiarach intensywności fluorescencji.^{84,85}

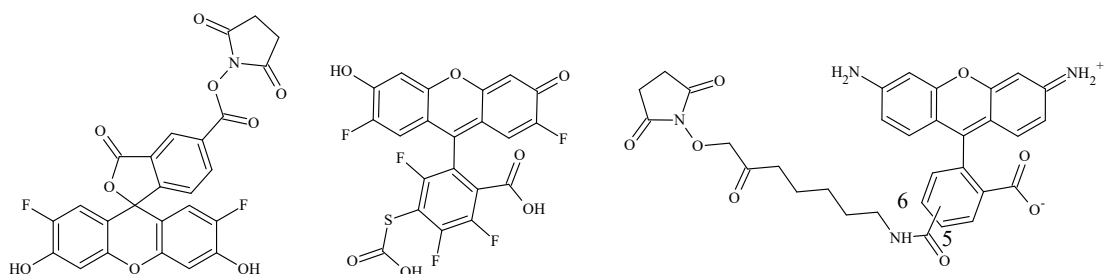


Rysunek 7. Struktura pochodnej izotiocyanianowej fluoresceiny (FITC).

Eozyna jest interesującą pochodną fluoresceiny, która w porównaniu ze związkiem macierzystym wykazuje większą skłonność do wygaszania fluorescencji, co nadaje jej potencjał aplikacyjny jako fotosensybilizator. Dodatkowo jej koniugaty są wykorzystywane w badaniach rezonansowego transferu energii (FRET) czy odzyskiwaniu fluorescencji po fotowysbieleniu (FRAP).⁸⁵

Wśród komercyjnie dostępnych znaczników fluorescencyjnych o emisji w zakresie podobnym do fluoresceiny można znaleźć bardziej stabilne i mniej podatne na zmiany środowiskowe sondy, takie jak: Alexa Fluor[®] 488, BODIPY[®] FL, Oregon Green[®] 488 i 514 czy Rhodamine Green[™].

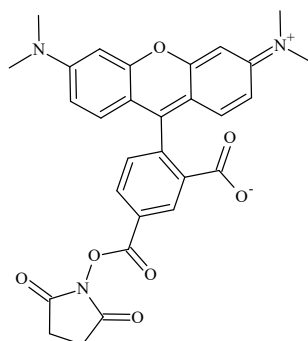
Barwniki Oregon Green[®] 488 i 514 (Rysunek 8) zostały stworzone, aby mimikować właściwości fluoresceiny. Widma absorpcji oraz emisji pokrywają się z widmami fluoresceiny. Ich przewaga nad pochodnymi fluoresceiny wynika z wyższej fotostabilności po przyłączeniu do białek, braku wrażliwości na fizjologiczne pH (choć są wrażliwe na pH lekko kwasowe) oraz z faktu, że fluorescencja tych barwników nie jest znacząco wygaszana wraz ze wzrostem stopnia wyznakowania. Znaczniki Oregon Green[®] 488 i 514 znajdują również zastosowanie w eksperymentach opierających się na badaniu interakcji białko - białko czy białko - kwas nukleinowy.⁸⁵⁻⁸⁷



Rysunek 8. Struktury komercyjnych znaczników fluorescencyjnych; od lewej Oregon Green[®] 488 i 514 oraz Rhodamine Green[™] - X.

Rhodamine Green[™] - X (pochodna Rhodamine Green[™], różniąc się obecnością linkera umożliwiającego sprzęganie (Rysunek 8)), w przeciwieństwie do fluoresceiny charakteryzuje się wysoką fotostabilnością oraz jest niewrażliwa na zmiany pH, ma wysoki współczynnik ekstynkcji ($>75\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) i wysoką wydajność kwantową fluorescencji. Pomimo swojej wysokiej fotostabilności fluorescencja może ulegać wygaszaniu po związaniu z białkami, co więcej koniugaty tego typu mają tendencję do wytrącania się z roztworu, co ogranicza jej aplikację. W rodzinie rodamin można znaleźć również barwniki z maksimum emisji przesuniętym w kierunku czerwieni, takie jak:

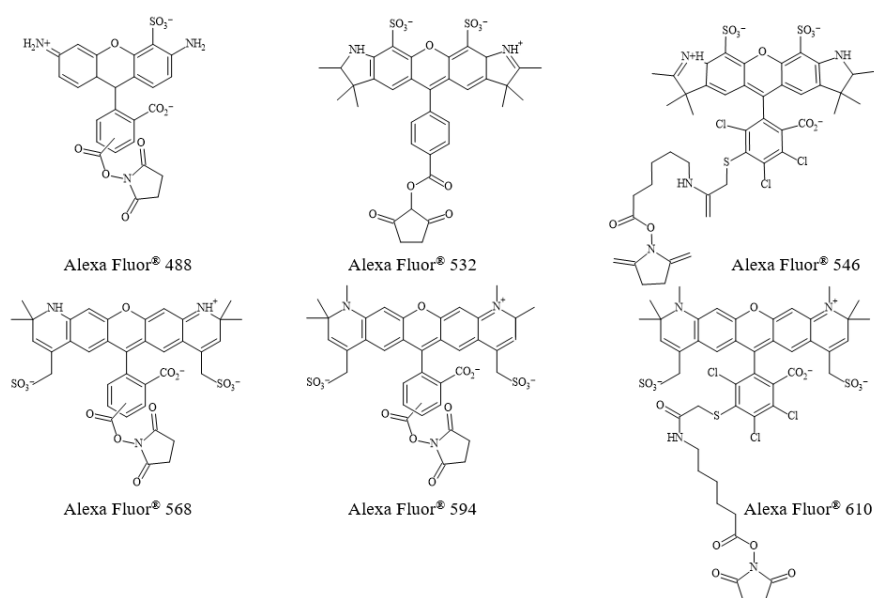
Lissamina Rodamina B, Rodamina 6G, tetrametylorodamina (TAMRA), Rhodamine Red™-X, X-rhodamine,⁸⁵ które cieszą się dużą popularnością w badaniach biologicznych. Jednym z przykładów jest 5-TAMRA (Rysunek 9), która charakteryzuje się wysoką fotostabilnością oraz intensywną fluorescencją w zakresie widzialnym (maksimum absorpcji ~546 - 555 nm, maksimum emisji ~580 - 585 nm). Z uwagi na relatywnie wysoką odporność na fotowysbielenie, jej pochodne są stosowane również w technikach wykorzystujących fluorescencyjną mikroskopię konfokalną. Zastosowanie TAMRY w badaniach interakcji biomolekuł pozwala na precyzyjne śledzenie lokalizacji i dynamiki analizowanych systemów *in vitro*, co czyni ją użytecznym narzędziem w badaniach biologicznych i diagnostycznych.^{85,88–90}



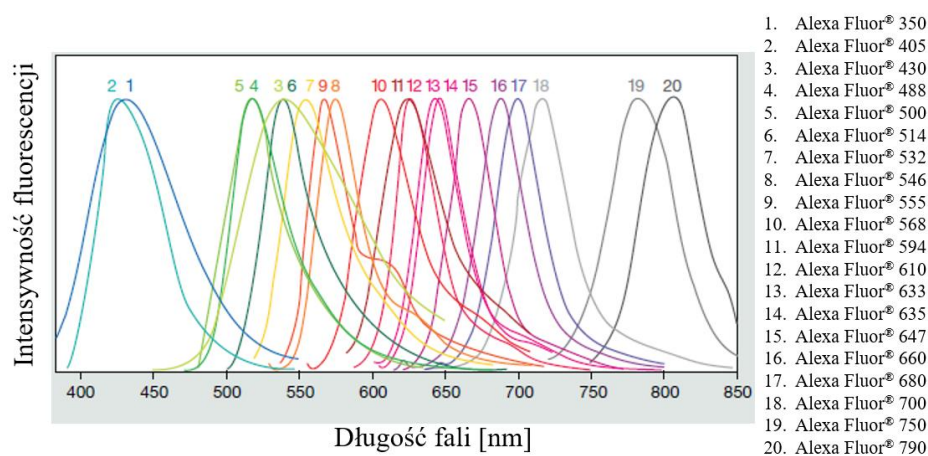
Rysunek 9. 5-karboksytetrametylorodamina (5-TAMRA) sukcyminid ester.

Szeroki potencjał aplikacyjny wykazują także fluorofory zewnętrzne z rodziny Alexa Fluor (Rysunek 10). Zostały opracowane w celu uzyskania wysokiej intensywności sygnału fluorescencyjnego, odporności na fotowysbielenie oraz szerokiego zakresu długości fal emisji (Rysunek 11), co umożliwia ich zastosowanie w eksperymentach, w których używa się kilku różnych fluoroforów charakteryzujących się zróżnicowanym zakresem emisji, aby jednocześnie śledzić różne cząsteczki lub procesy w jednym układzie. Alexa Fluor są strukturalnymi pochodnymi klasycznych fluoroforów, takich jak fluoresceina i rodamina, zmodyfikowanymi chemicznie w celu zwiększenia ich stabilności oraz rozpuszczalności w środowisku wodnym, co czyni je szczególnie użytecznymi w aplikacjach biologicznych. Barwniki te dostępne są w szerokim spektrum emisji, od Alexa Fluor 350 emitującego w zakresie niebieskim, aż po Alexa Fluor 790 emitujący w zakresie bliskiej podczerwieni (Rysunek 11). Pozwala to na elastyczny wybór znacznika do eksperymentów wymagających jednoczesnej współpracy z innymi fluoroforami. Charakteryzują się także wysokim molowym współczynnikiem absorpcji oraz wysoką wydajnością kwantową fluorescencji, co umożliwia uzyskanie

wypadkowego sygnału o odpowiednich proporcjach sygnału pożądanego do szumu nawet przy niskim poziomie znakowania. Pochodne Alexa Fluor są niewrażliwe na zmiany pH w jego szerokim zakresie. Dodatkowo, barwniki te są kompatybilne z różnorodnymi metodami sprzęgania, co pozwala na łatwe i stabilne znakowanie białek, przeciwciał oraz kwasów nukleinowych. Ze względu na swoje właściwości, fluorofory Alexa Fluor znalazły zastosowanie, w takich technikach jak fluorescencyjna mikroskopia konfokalna, mikroskopia superrozdzielcza, cytometria przepływowa, a także w analizach typu *Western blot* i immunofluorescencji. Ich użycie pozwala na precyzyjne badanie lokalizacji i dynamiki białek oraz struktur komórkowych, co czyni je nieocenionym narzędziem zarówno w badaniach podstawowych, jak i diagnostycznych.^{85,91–96}

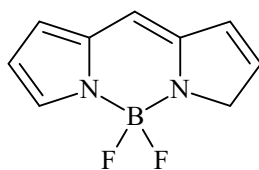


Rysunek 10. Przykładowe struktury barwników z rodziny Alexa Fluor.⁸⁵

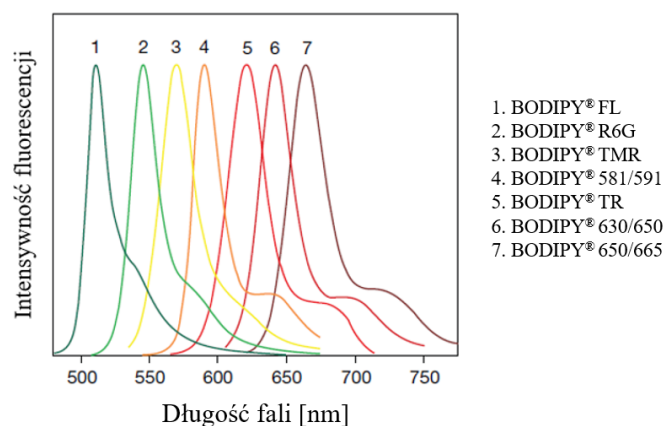


Rysunek 11. Znormalizowane widma emisji barwników z rodziny Alexa Fluor.⁸⁵

Z kolei barwniki z grupy BODIPY (Rysunek 12) stanowią jedne z bardziej wszechstronnych związków fluorescencyjnych. Ich struktura chemiczna opiera się na układzie dipirolowym skoordynowanym z atomem boru. Barwniki BODIPY charakteryzują się wysokim współczynnikiem ekstynkcji ($>80000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$), wysoką wydajnością kwantową fluorescencji (równą około 1 nawet w wodzie), wąskimi pasmami emisyjnymi (Rysunek 13) oraz dużą odpornością na fotowysbielanie. Charakteryzują się także stosunkowo długimi czasami życia stanu wzbudzonego (co najmniej 5 ns). Związki te nie są wrażliwe na zmiany pH. Dodatkową cechą wyróżniającą BODIPY jest także mnogość strukturalnych modyfikacji.⁸⁵



Rysunek 12. Struktura barwnika BODIPY.



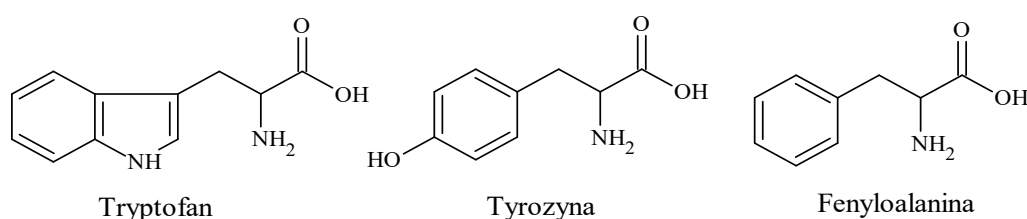
Rysunek 13. Znormalizowane widma emisji wybranych barwników z rodziny BODIPY zmierzone w etanolu.⁸⁵

Znaczники z grupy BODIPY znajdują szerokie zastosowanie w naukach chemicznych, biologicznych czy medycznych, między innymi do otrzymywania nowych narzędzi do wykrywania i/lub leczenia nowotworów, terapii fotodynamicznej, wykrywania agregatów β -amyloidu i wielu innych.^{97–101}

6. Znaczniki fluorescencyjne bazujące na strukturze aminokwasów białkowych

6.1. Znaczniki fluorescencyjne wewnętrzne - Fluorescencyjne aminokwasy białkowe

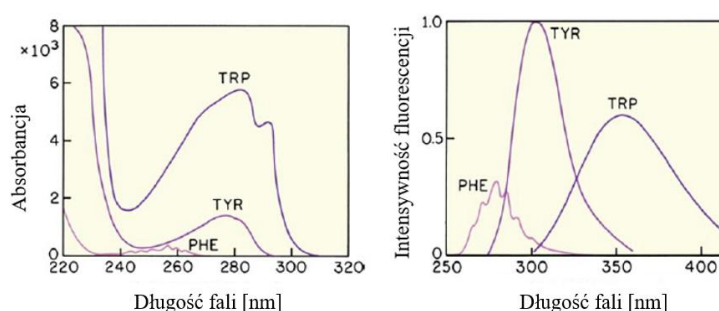
Fluorescencyjne aromatyczne aminokwasy białkowe, takie jak tryptofan, tyrozyna i fenyloalanina (Rysunek 14) występują powszechnie w organizmach żywych. Są wykorzystywane do badania aktywności enzymów, zmian konformacyjnych peptydów i białek, czy ich interakcji z innymi indywiduami. Jednak ich właściwości spektroskopowe znacząco ograniczają ich potencjalne zastosowanie. Charakteryzują się one niskimi molowymi współczynnikami absorpcji, krótkofalową charakterystyką widm absorpcji oraz emisji, niską wydajnością kwantową fluorescencji, krótkim i heterogenicznym czasem życia fluorescencji (Tabela 1, Rysunek 15). Co więcej, mogą one maskować się wzajemnie (szczególnie fenyloalanina jest maskowana w obecności tryptofanu lub tyrozyny), co utrudnia analizę otrzymanych wyników.¹ Zaletą fluorescencyjnych aromatycznych aminokwasów białkowych jest natomiast obecność dwóch grup funkcyjnych (aminowej i karboksylowej) umożliwiających łatwe wprowadzanie związków do różnych układów za pomocą wiązań kowalencyjnych. Eliminując (ewentualnie ograniczając) opisane wcześniej wady (niedostateczne właściwości spektralne i fotofizyczne) oraz zachowując ich mocne strony możliwe jest uzyskanie nowych pochodnych o zwiększonej efektywności chromoforowej oraz fluoroforowej względem proteinogenicznych aminokwasów aromatycznych.



Rysunek 14. Struktury fluorescencyjnych aromatycznych aminokwasów białkowych.¹

Tabela 1. Zestawienie właściwości spektroskopowych fenyloalaniny, tyrozyny i tryptofanu.¹

Nazwa	λ_{abs}	λ_{em}	Wydajność kwantowa fluorescencji	Czasy zaniku fluorescencji [ns]
fenyloalanina	260	282	0,02	6,8
tyrozyna	275	304	0,14	3,6
tryptofan	295	353	0,13	3,1 (średnia)



Rysunek 15. Widma absorpcji oraz emisji tryptofanu (Trp), tyrozyny (Tyr) i fenyloalaniny (Phe) zmierzone w wodzie.¹

Zatem jedną ze ścieżek umożliwiających otrzymanie wydajnych znaczników fluorescencyjnych o szerokim spektrum użyteczności jest synteza nowych pochodnych opierających się na szkieletach aminokwasów białkowych.¹⁰²

6.2. Fluorescencyjne aminokwasy niebiałkowe - synteza i właściwości spektroskopowe

Fluorescencyjne aminokwasy niebiałkowe są odpowiedzią na rosnące zainteresowanie i zapotrzebowanie na znaczniki fluorescencyjne o szerokim spektrum aplikacyjnym.^{103,104} Modyfikowane aminokwasy białkowe są szczególnie cenne, ponieważ w małym stopniu zaburzając strukturę, zachowując specyficzne właściwości peptydów i białek mogą być wbudowywane w ich łańcuchy.^{102,105}

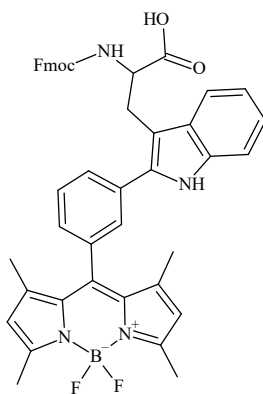
Analiza położenia widm absorpcji i emisji, intensywności fluorescencji oraz czasów zaniku fluorescencji fluorescencyjnych aminokwasów niebiałkowych pozwala na wnioskowanie o charakterze ich lokalnego środowiska.¹⁰⁶ Ponadto molekuly wyznakowane fluorescencyjnymi niebiałkowymi aminokwasami mogą być badane za pomocą pomiarów polaryzacji fluorescencji, która pozwala monitorować zmiany w dynamice rotacyjnej fluoroforu. Polaryzacja fluorescencji często jest wykorzystywana

np. do określania powinowactwa białko - ligand czy szybkości wiązania białko - białko.^{107,108}

Wbudowanie fluorescencyjnego aminokwasu niebiałkowego wraz z odpowiednio dobranym innym znacznikiem umożliwi badanie zmian w odległości między białkami za pomocą rezonansowego transferu energii Förstera, wygaszania wynikającego z fotoindukowanego transferu elektronów, anizotropii czy pomiarów polaryzacji fluorescencji.¹⁰⁹

Projektowanie nowych fluorescencyjnych aminokwasów niebiałkowych może opierać się na wprowadzeniu znaczników fluorescencyjnych komercyjnie dostępnych do struktury aminokwasów białkowych lub poprzez wprowadzanie ugrupowań aromatycznych mających na celu stworzenie nowych efektywniejszych fluoroforów w odniesieniu do wyjściowych aminokwasów białkowych.

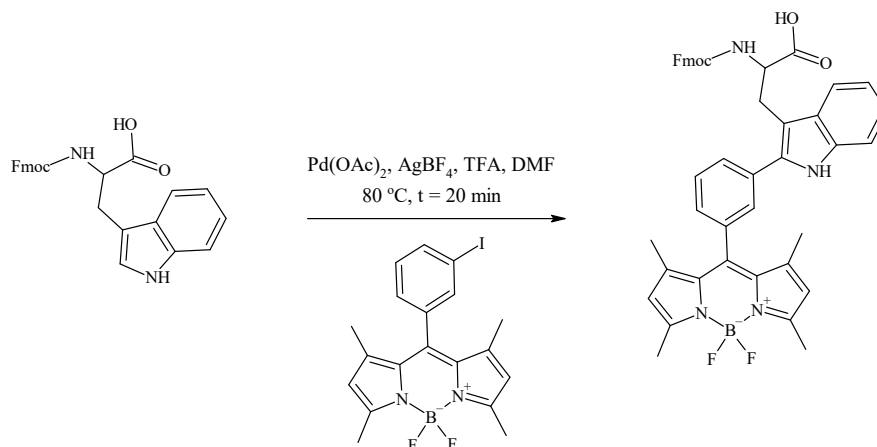
Pierwsze podejście wydaje się być bardziej przewidywalne, gdyż z dużym prawdopodobieństwem właściwości spektroskopowe reprezentowane przez znacznik dostępny komercyjnie będą analogiczne dla związku otrzymanego z połączenia aminokwasu białkowego ze znacznikiem fluorescencyjnym. Ten typ poprawy wydajności chromoforowej i fluoroforowej zastosowano w pochodnych tryptofanu połączonych z BODIPY (Rysunek 16).^{110,111}



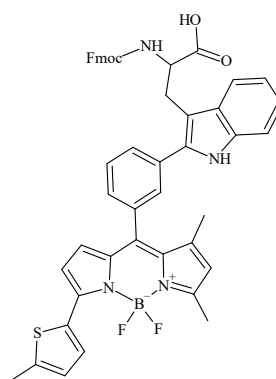
Rysunek 16. Struktura pochodnej tryptofanu wyznakowanej znacznikiem BODIPY.¹¹⁰

Zaprojektowano pochodną tryptofanu z wprowadzonym znacznikiem BODIPY do łańcucha bocznego Fmoc-aminokwasu (Rysunek 16), tak aby uzyskać związek umożliwiający w łatwy sposób wyznakowanie peptydów. Barwnik BODIPY (m-jodofenylo-BODIPY) połączono z Trp za pomocą wiązania węgiel - węgiel. Aminokwas został poddany aryłacji z pochodną BODIPY w obecności $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, AgBF_4 ,

TFA, DMF w temperaturze 80 °C (Rysunek 17). Otrzymana pochodna charakteryzuje się maksimum widma emisji przy długości fali 517 nm ($\epsilon = 12000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).¹¹⁰

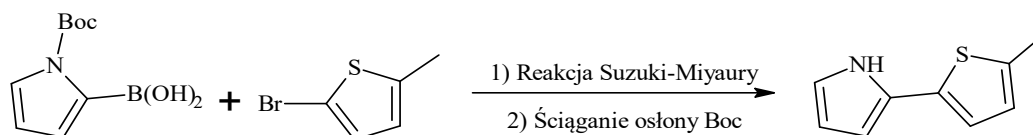


Rysunek 17. Schemat syntezy pochodnej tryptofanu ze znacznikiem BODIPY.¹¹⁰



Rysunek 18. Struktura Trp(redBODIPY).¹¹¹

Wyżej opisany związek został dodatkowo zmodyfikowany w celu poprawy właściwości spektroskopowych, w wyniku czego uzyskano związek Trp(redBODIPY) (Rysunek 18).¹¹¹



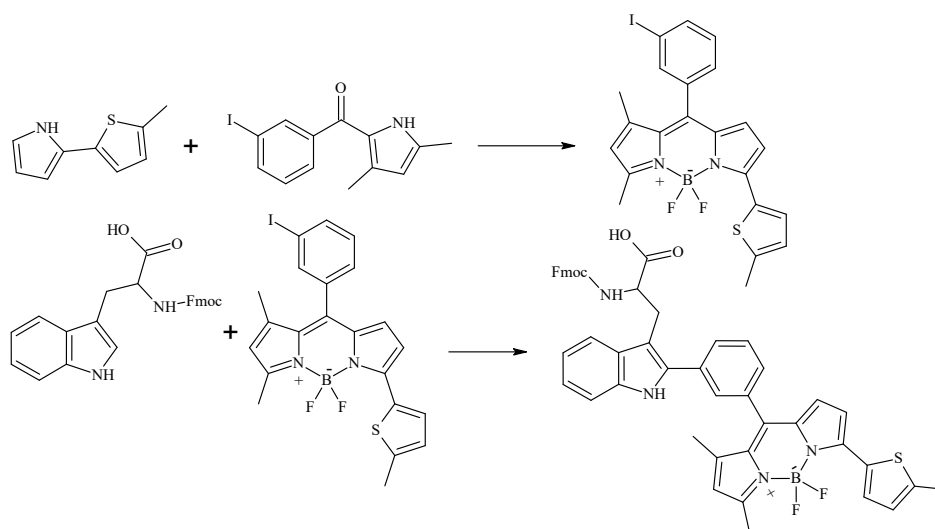
Rysunek 19. Schemat reakcji pomiędzy N-Boc-pirrolem-2-borowym a 2-bromo-5-metylo-tiofenem.¹¹¹

Pośrednie związki niezbędne do otrzymania finalnej struktury zostały otrzymane dzięki reakcji sprzęgania Suzuki-Miyaury pomiędzy N-Boc-pirrolem-2-borowym a 2-bromo-5-metylo-tiofenem. Reakcja była prowadzona w 80 °C, w obecności $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, eteru dimetylowego oraz Na_2CO_3 (Rysunek 19).¹¹¹



Rysunek 20. Schemat reakcji pomiędzy kwasem 3-jodobenzoesowym i 2,4-dimetylopirolem.¹¹¹

Za pomocą reakcji Friedela-Craftsa sprzężono kwas 3-jodobenzoesowy z 2,4-dimetylopirolem w obecności chlorku oksalilu i chlorku dimetylu w temperaturze 0 °C (Rysunek 20).

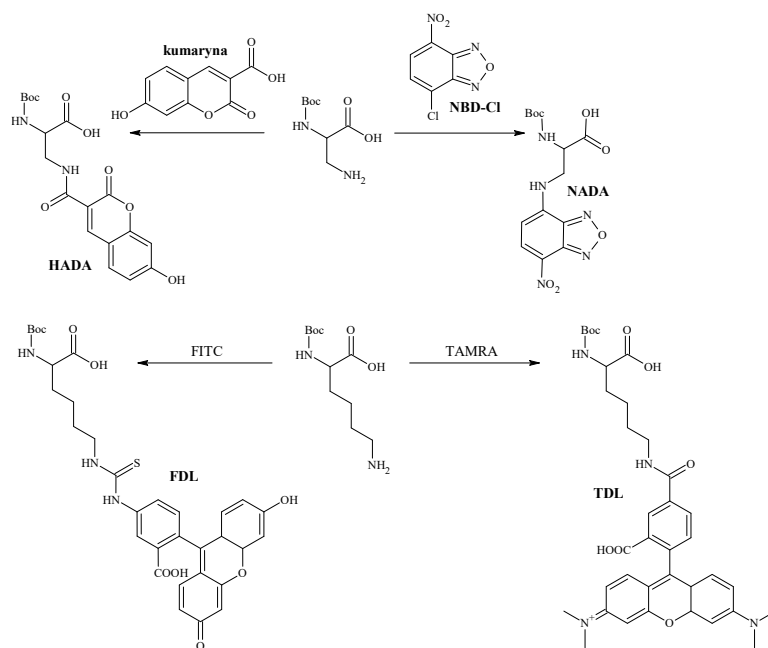


Rysunek 21. Otrzymywanie pochodnej znacznika BODIPY oraz sprzężanie go z tryptofanem.¹¹¹

Następnie przeprowadzono dwuetapową kondensację produktów przedstawionych na Rysunku 19 i 20 w obecności trichlorku fosforu (POCl_3) w temperaturze 0 °C oraz wykorzystując TEA, trifluorek boru w kompleksie z eterem dietylowym ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$) uzyskując 3-jodofenyłową pochodną barwnika BODIPY. Tak przygotowany związek przyłączył do łańcucha bocznego tryptofanu z osłoniętą grupą aminową (osłona Fmoc) za pomocą aryacji w obecności $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, AgBF_4 , DMF w temperaturze 80 °C (Rysunek 21). Otrzymana pochodna zawierająca w swojej budowie zmodyfikowany znacznik BODIPY (Trp(redBODIPY)) charakteryzuje się maksimum absorpcji przy długości 570 nm, a maksimum emisji przy długości 590 nm ($\epsilon = 52950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).¹¹¹

Barwnik BODIPY wykorzystano również w szeregu pochodnych opierających się na strukturze alaniny i fenyloalaniny z maksimum widm emisji położonym między 527 nm a 625 nm.¹¹²

Jak wyżej wspomniano znaczniki fluorescencyjne wprowadza się nie tylko do aminokwasów aromatycznych. Alaninę wyznakowano kumaryną lub NBD (4-chloro-7-nitro-1,2,3-benzoksadiazol), a łańcuch boczny lizyny wykorzystano do koniugacji z fluoresceiną lub TAMRĄ (Rysunek 22).¹¹³ Kumarynę do alaniny przyłączono w obecności 1,1'-karbonyldiimidzolu oraz THF, a NBD mieszaniny metanolu z wodą i NaHCO₃. W przypadku lizyny izotiocyanian fluoresceiny poddano reakcji z wolną grupą aminową łańcucha bocznego w bezwodnym DMF, a TAMRĘ w obecności DMF i diizopropyletyloaminy. Maksima widm emisji dla otrzymanych nowych aminokwasów niebiałkowych są różne w zależności od użytego komercyjnego znacznika fluorescencyjnego: HADA - 460 nm (pochodna zawierająca szkielet kumaryny), NADA - 555 nm (pochodna zawierająca szkielet NBD), FDL - 540 nm (pochodna zawierająca szkielet fluoresceiny), TDL - 595 nm (pochodna zawierająca szkielet TAMRY) (Rysunek 22). Tak przygotowane fluorescencyjne aminokwasy znalazły zastosowanie w badaniach śledzenia wzrostu bakterii.^{113,114}

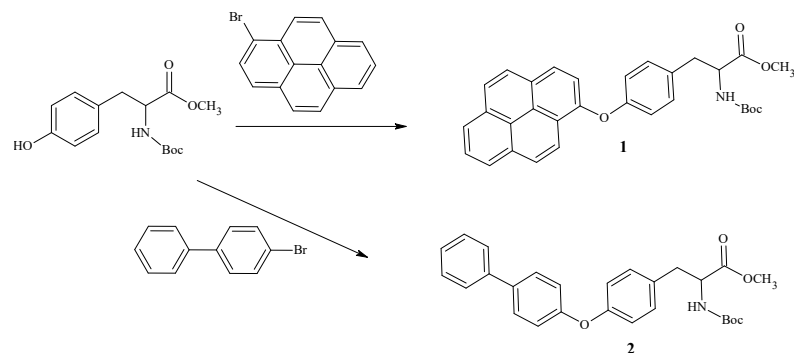


Rysunek 22. Schemat syntezy HADA, NADA, FDL, TDL.^{113,114}

Przykładów pochodnych z przyłączonym komercyjnym fluoroforem jest wiele. W większości przypadków ich właściwości spektralne oraz fotofizyczne są analogiczne, jak użytego znacznika fluorescencyjnego dostępnego komercyjnie.^{115,116}

Inne ścieżki projektowania nowych fluoroforów to modyfikacje struktur aminokwasów białkowych ugrupowaniami aromatycznymi, które same w sobie nie są powszechnie wykorzystywane jako samodzielne znaczniki fluorescencyjne.

Przykładem takiej koncepcji jest wprowadzenie poprzez ugrupowanie eterowe pirenu i bisfenylu do łańcucha bocznego tyrozyny (Rysunek 23).¹¹⁷

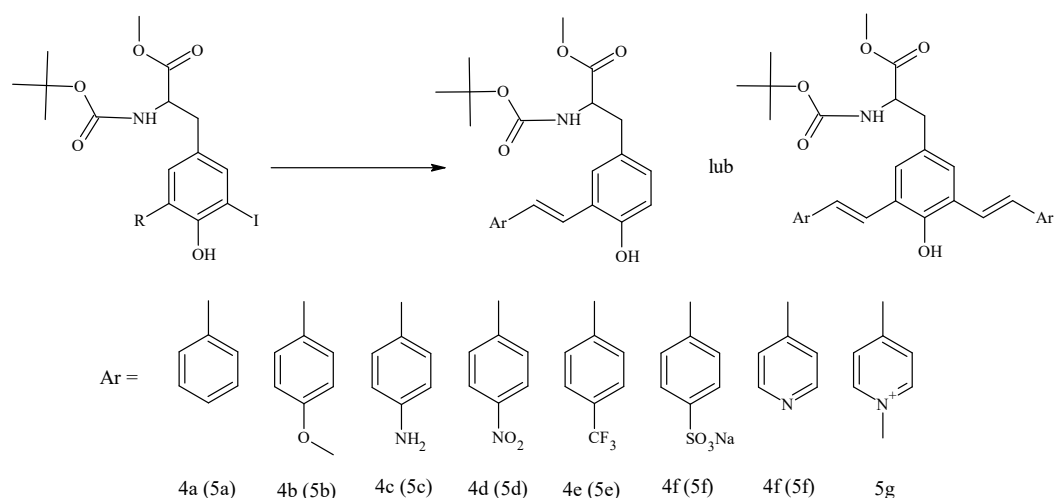


Rysunek 23. Pochodne tyrozyny z pirenem i bisfenylem.¹¹⁷

Substratami w syntezie tych pochodnych był ester metylowy N-Boc-tyrozyny i bromopochodna pirenu i bisfenylu, a reakcję prowadzono w obecności CuI, N,N-dimetyloglicyny, Cs₂CO₃ rozpuszczonego w dioksanie w temperaturze 80 °C. Wydajności reakcji wyniosły około 35 % w obu przypadkach.¹¹⁷

Otrzymane pochodne tyrozyny charakteryzują się odpowiednio maksimum absorpcji przy długości fali 242 (pochodna 1) i 260 nm (pochodna 2) oraz emisji przy długości fali 335 (pochodna 1) i 390 nm (pochodna 2). W przypadku obu związków nie zaobserwowano znaczącego wpływu polarności rozpuszczalników na położenie widm absorpcji oraz emisji. Wartości molowego współczynnika absorpcji we wszystkich zmierzonych warunkach są wyższe niż 21000 M⁻¹cm⁻¹. Wydajności kwantowe fluorescencji, w zależności od rozpuszczalnika, mieszczą się między 37 a 56 % dla związku z podstawnikiem pirenowym oraz między 15 a 20 % z podstawnikiem bisfenylowym.¹¹⁷

Z kolei za pomocą reakcji Hecka podstawiano asymetrycznie i symetrycznie łańcuch boczny L-tyrozyny otrzymując pochodne (bis)styrylowe, a następnie scharakteryzowano ich potencjał spektroskopowy (Rysunek 24).¹¹⁸



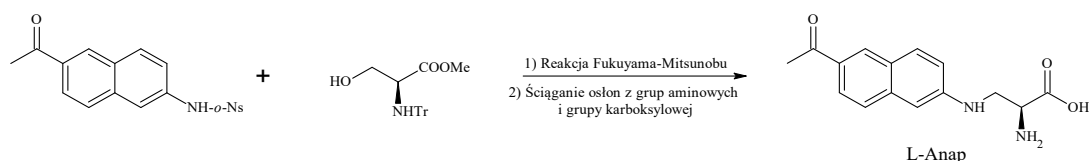
Rysunek 24. Styrylowe pochodne asymetryczne i symetryczne tyrozyny; gdzie: *R* to *I* lub *H*, *Ar* to podstawniki aromatyczne.¹¹⁸

Reakcje katalizowano $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ w obecności DMF, *N,N*-diizopropyletyloaminy, tri(*O*-tolilo)fosfiny otrzymując łącznie 13 fluorescencyjnych pochodnych. Reakcje Hecka przebiegały z wystarczającą selektywnością i prowadziły głównie do otrzymania izomeru *E* (Rysunek 24).

Maksima widm absorpcji syntezowanych styrylowych pochodnych aminokwasów niebiałkowych w DMSO mieszczą się w zakresie od 330 nm do 390 nm. Związki wykazują emisję w szerokim zakresie długości fali (od 400 nm do 800 nm). Wartość molowego współczynnika absorpcji waha się od 11000 do 39000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Wyznaczone wydajności kwantowe wynoszą od 12 do 94 % (dla pochodnych 4d i 5d nie wyznaczono). Ponadto wykazano, że część związków (Rysunek 24; związek 5b oraz 5f) jest wrażliwych na zmiany pH czy obecność utleniacza i reduktora (Rysunek 24; związek 5b). Dodatkowo przebadano użyteczność wybranej pochodnej do obrazowania komórkowego. W tym celu wprowadzono związek 5b do pentapeptydu zdolnego do penetracji błon komórkowych.^{118,119}

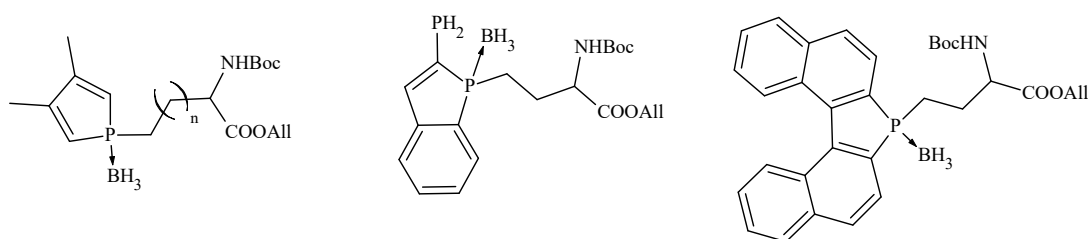
Kolejnym przykładem modyfikacji aminokwasów białkowych jest otrzymana za pomocą reakcji Fukuyama-Mitsunobu pochodna *L*-Anap (kwas *L*-3-(6-acetylo-naftalen-2-yloamino)-2-aminopropanowy) (Rysunek 25). Sprzężono osłoniętą 6-acyl-2-naftyloaminę z estrem metylowym *N*-trytylo-*L*-seryny wykorzystując azodikarboksylan diizopropylu, trifenylofosfinę w środowisku toluenu. Po ściągnięciu osłony trytylowej i metylowej uzyskano pożądaný produkt z wydajnością 51 % (Rysunek 25). Otrzymano pochodną charakteryzującą się w roztworach wodnych położeniem maksimum widma absorpcji przy długości fali 360 nm, molowym współczynnikiem

absorpcji równym $17500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, położeniem maksimum widma emisji przy 490 nm oraz wydajnością kwantową 0,32. Dodatkowo *L*-Anap charakteryzuje się wysoką czułością na zmiany polarności środowiska.^{120–124}



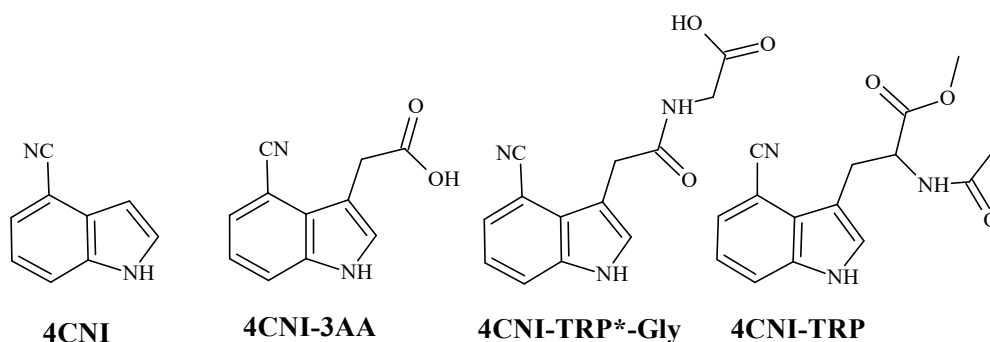
Rysunek 25. Schemat reakcji otrzymywania *L*-Anap; osłony grup aminowych: *o*-Ns-2-nitrobenzosulfonyl, Tr – osłona trytylowa.¹²⁰

Wykorzystując stereoselektywną reakcję anionu fosfolidowego z jodowanym estrem α -aminowym pochodzącym z kwasu *L*-asparaginowego lub *L*-seryny i bezpośredniego kompleksowania z boranem, otrzymano szereg pochodnych boranowych (Rysunek 26). Pochodne charakteryzują się położeniem maksimum widma emisji nawet przy 535 nm oraz dużym przesunięciem Stokesa (do 62500 cm^{-1}). Związki dodatkowo wyróżniają się dużą stabilnością oraz możliwością wprowadzania wielu dodatkowych modyfikacji w obrębie ich struktury.¹²⁵

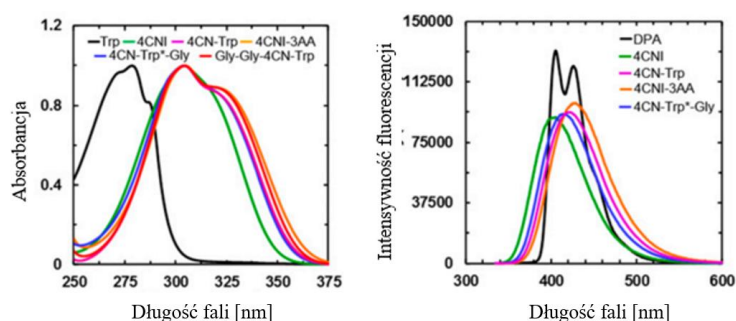


Rysunek 26. Struktury pochodnych boranowych; gdzie: Boc – osłona *tert*butyloksykarbonylowa, All – ester propylowy.¹²⁵

Szereg pochodnych świecących w zakresie niebieskim opierających się na strukturze tryptofanu przebadano pod kątem użyteczności w doświadczeniach wykorzystujących zjawisko fluorescencji (Rysunek 27). Ich maksima widm absorpcji znajdują się przy około 310 nm, a widm emisji między 400 a 450 nm. Związki charakteryzują się wysokimi wydajnościami kwantowymi fluorescencji wyznaczonymi w wodzie (0,64 – 0,91) (Rysunek 28). Ich niewielki rozmiar jest ich ogromną zaletą i zwiększa ich wartość użytkową w wielu badaniach.¹²⁶



Rysunek 27. Pochodne tryptofanu.¹²⁶



Rysunek 28. Znormalizowane widma absorpcji i widma emisji zmierzone w wodzie.¹²⁶

W literaturze można znaleźć wiele prac opisujących interesujące fluorescencyjne pochodne aminokwasów niebiałkowych charakteryzujących się szerokim wachlarzem właściwości i potencjałem aplikacyjnym.^{127–131} W odróżnieniu od naturalnych aminokwasów, ich struktura może być celowo modyfikowana, aby uzyskać pożądane właściwości spektroskopowe, takie jak określona długość fali emisji, wysoka wydajność kwantowa fluorescencji czy wrażliwość lub jej brak na czynniki zewnętrzne. Współczesne strategie (jak np. bioinżynieria) coraz częściej umożliwiają wykorzystanie aminokwasów niebiałkowych również w systemach żywych, otwierając nowe możliwości dla badań biologicznych czy w nanomedycynie. Fluorescencyjne aminokwasy niebiałkowe stają się zatem istotnym pomostem między chemią syntetyczną a badaniami biologicznymi na poziomie molekularnym.

6.3. Zastosowanie fluorescencyjnych aminokwasów niebiałkowych w badaniach biologicznych

Fluorescencyjne aminokwasy niebiałkowe znajdują szerokie zastosowanie w badaniach biologicznych. Dzięki możliwości dostosowywania struktury chemicznej fluoroforów do konkretnych celów eksperymentalnych, fluorescencyjne aminokwasy

niebiałkowe stają się nieocenionym narzędziem w badaniach nad funkcjonowaniem białek (np. badania oddziaływań białko - białko, białko - DNA), w projektowaniu biosensorów (otoczenia molekuly, w badaniach interakcji między cząsteczką a membraną komórek czy np. w badaniach kinetyki wiązania ligand - receptor), w obrazowaniu komórkowym (np. w badaniach wzrostu ściany komórkowej bakterii) oraz analizie procesów sygnalizacji wewnątrzkomórkowej.¹⁰²

W badaniach do tworzenia obrazu często wykorzystuje się fluorescencję, która dostarcza wielu informacji o analizowanym obiekcie. Zjawisko to umożliwia obrazowanie zarówno w skali makro (np. w celu określenia obszaru ingerencji chirurgicznej), jak i mikro (np. komórek eukariotycznych oraz ich struktur wewnątrzkomórkowych). W tym celu otrzymano pochodne azydkowe znaczników fluorescencyjnych BODIPY wykazujących emisję przy różnych długościach fal (zielonej, czerwonej i NIR). Związki połączono z resztami tyrozynowymi modelowego białka globularnego (BSA). Potwierdzono potencjał aplikacyjny otrzymanych biokoniugatów wykorzystując komórki HeLa oraz obrazowanie za pomocą fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej otrzymując dobrą wizualizację wewnątrz komórkową.¹³²

W innych badaniach wykorzystano znacznik BODIPY wrażliwy na zmiany pH, który przyłączono do mysiej chemokiny CCL2 (białko biorące udział w odpowiedzi immunologicznej) do C-końcowej cysteiny. Otrzymano sondę do wykrywania *in vivo* makrofagów związanych z przerzutami w przedklinicznym modelu przerzutów do płuc.¹³³

Fluorofor Trp(redBODIPY) wspomniany w rozdziale 6.2. *Fluorescencyjne aminokwasy niebiałkowe - synteza i właściwości spektroskopowe* (Rysunek 18) charakteryzujący się emisją w obszarze czerwonym został sprzężony z tryptofanem w celu syntezy cyklicznych fluorescencyjnych peptydów wiążących się z KRT1 (keratyna 1), której nadekspresja występuje w niektórych komórkach nowotworowych. Zastosowany układ umożliwił obrazowanie żywych komórek nowotworowych KRT1+ zarówno *in vivo*, jak i *ex vivo*, a także badanie ich interakcji z makrofagami związanymi z nowotworem.¹¹¹

Z kolei fluorogeniczny aminokwas na bazie kumaryny ($\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$) może zostać użyty do obrazowania aktywności PTP (białkowa fosfataza tyrozynowa to enzym, który usuwa grupy fosforanowe z reszt tyrozyny w białkach, czyli wyłącza lub reguluje sygnały komórkowe oparte na fosforylacji - kontroluje przekazywanie sygnałów w komórce; nieprawidłowe działanie tych enzymów powiązane z chorobami nowotworowymi, metabolicznymi, autoimmunologicznymi) w żywych komórkach. W badaniach na

komórkach HeLa wykazano, że opracowany aminokwas posiada strukturę umożliwiającą specyficzne rozpoznawanie i wiązanie z miejscami fosforylacji tyrozyny, a jednocześnie po związaniu wykazuje fluorescencję, co pozwala na monitorowanie sygnałów fosforylacji w żywych komórkach w czasie rzeczywistym bez konieczności stosowania dodatkowych etapów znakowania czy utrwalania.¹³⁴

Czas analizy próbek biologicznych często jest kluczowy w celu uzyskania wiarygodnego wyniku badania. Zaprojektowano serię fluorogenicznych peptydów znakowanych za pomocą NBD umożliwiających wykrywanie EpCAM (nabłonkowa cząsteczka adhezyjna komórek), która jest istotnym markerem wielu typów nowotworów nabłonkowych bezpośrednio związanych z CTC (krążące komórki nowotworowe). Metoda ta pozwala na szybkie i specyficzne znakowanie komórek nowotworowych w warunkach *in vitro* bez konieczności stosowania dodatkowych etapów przemysławiania preparatu, co upraszcza procedurę oraz pozwala na dynamiczne monitorowanie ekspresji EpCAM w czasie rzeczywistym.¹³⁵

Pomocne okazuje się znakowanie fluorescencyjne terapeutów/potencjalnych terapeutów umożliwiające śledzenie mechanizmów działania, lokalizacji subkomórkowej w komórkach i *in vivo*, co finalnie może przełożyć się na określenie kierunku modyfikacji i poprawę działania. Dobór znacznika nie może być przypadkowy, aby np. nie wpłynąć negatywnie na działanie biologiczne leku. Do wybranego heksapeptydu (PAF26) o przeciwgrzybiczym działaniu wprowadzano kilka różnych znaczników fluorescencyjnych charakteryzujących się zróżnicowanymi właściwościami spektralnymi i fotofizycznymi, takie jak powszechnie wykorzystywane w badaniach biologicznych: BODIPY, fluoresceina, rodamina, cyjanina, małe znaczniki: NBD, dansyl, znaczniki wrażliwe na zmiany otoczenia: błękit nilu, zieleń malachitowa, styryl, wrażliwe na zmiany pH: naftalimid oraz aktywowane esterazami: dioctan fluoresceiny (FDA, pochodna fluoresceiny nie wykazująca fluorescencji, która pod wpływem esteraz w żywych komórkach jest przekształcana do świecącej na zielono fluoresceiny). Znaczniki przyłączano do N-końca peptydu. Aktywność biologiczną i akumulację wewnątrz komórkową powstałych koniugatów badano na dwóch gatunkach grzybów (*Neurospora crassa* i *Aspergillus fumigatus*). Modyfikacja peptydu poprzez wprowadzenie znaczników fluorescencyjnych nie zaburzała jego pierwotnej aktywności przeciwgrzybiczej. Potwierdzono natomiast, iż zmiana struktury znacznika fluorescencyjnego bezpośrednio wpływa na subkomórkową lokalizację znakowanego peptydu.¹³⁶

Podobne badania zostały przeprowadzone względem *A. fumigatus*, gdzie do sekwencji peptydu PAF26 wprowadzano modyfikowany tryptofan za pomocą znacznika BODIPY. Uzyskano sondy pozwalające na obrazowanie zarażonych tkanek ludzkich *ex vivo*.¹³⁷

Obrazowanie patogenów z wykorzystaniem endomikroskopii optycznej (OEM) jest niezwykle atrakcyjne.^{138–140} Fluorescencyjny analog UBI_{dent} otrzymany poprzez wyznakowanie peptydu NBD umożliwia wykrywanie patogenów w ludzkim płucu. Związek ten jest już wykorzystywany klinicznie. Dostarczany w mikrodawkach pozwala na selektywne znakowanie *ex vivo* i *in vivo* wielu patogenów chorobotwórczych, co więcej wykazano jego użyteczność w przypadku mukowiscydozy.¹⁴¹

Znaczniki fluorescencyjne stanowią cenne narzędzie w badaniach wzrostu bakterii, umożliwiając szybką i precyzyjną analizę procesów metabolicznych oraz monitorowanie zmian liczebności komórek w czasie rzeczywistym. Dzięki zastosowaniu cytometrii przepływowej lub fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej możliwe jest ilościowe określenie tempa podziału komórek oraz analiza rozkładu barwnika pomiędzy komórki potomne, co pozwala śledzić dynamikę populacji w różnych warunkach środowiskowych i podczas ekspozycji na związki przeciwdrobnoustrojowe. W efekcie znaczniki fluorescencyjne stanowią wygodne i czułe narzędzie do badania wzrostu i aktywności bakterii, wspierając optymalizację warunków hodowli oraz ocenę skuteczności nowych strategii terapeutycznych.^{142–146}

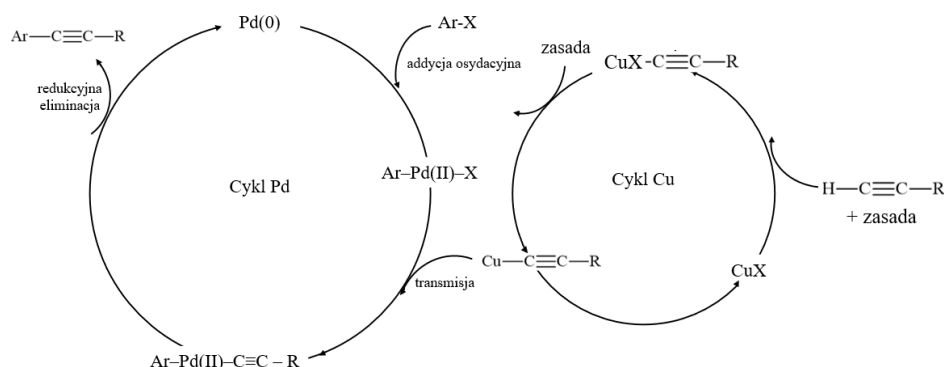
Fluorescencyjne *D*-aminokwasy zawierające fluorofory, takie jak: NADA, TDL oraz HADA (Rysunek 22), stanowią nowoczesne narzędzie umożliwiające wizualizację nowo syntetyzowanego peptydoglikanu - składnika ściany komórkowej - w żywych komórkach bakteryjnych. Układy te, wbudowane do sieci peptydoglikanu podczas aktywnego wzrostu i podziału komórek, umożliwiają selektywne znakowanie miejsc syntezy ściany komórkowej w czasie rzeczywistym, bez konieczności utrwalania próbek.¹¹⁴

Znakowane fluorescencyjnie aminokwasy charakteryzują się również potencjałem analitycznym, takim jak np. wykrywanie obecności innych molekuł.

Informacji w literaturze o poszukiwaniu nowych znakowanych fluorescencyjnie terapeutyków umożliwiających śledzenie ich działania w organizmach jest wiele, co tylko potwierdza użyteczność zjawiska fluorescencji w badaniach biologicznych i konieczność poszukiwania coraz to nowych bardziej selektywnych i efektywnych znaczników fluorescencyjnych.

7. Reakcja Sonogashiry-Hagihary jako potencjalna metoda syntezy nowych znaczników fluorescencyjnych

Reakcja Sonogashiry-Hagihary, opracowana w latach 70. XX wieku, należy do najważniejszych metod tworzenia wiązań węgiel-węgiel między aryłowymi lub winylowymi halogenkami (lub triflanami) a terminalnymi alkinami. Klasycznymi katalizatorami są związki palladu (na różnym stopniu utlenienia) oraz sole miedzi(I), a rolę zasady pełni amina. Dzięki swojej łagodności, wysokiej wydajności oraz tolerancji względem podstawników reakcja ta znalazła bardzo szerokie zastosowanie zarówno w chemii materiałowej, jak i w syntezie związków bioaktywnych. Opierając się na klasycznym wariacie, mechanizm reakcji przedstawia się w dwóch cyklach, w których w jednym udział bierze katalizator palladowy, a w drugim miedziowy.^{147–149} W tym przypadku cykl palladowy (Rysunek 29) polega na aktywacji palladu w stopniu utlenienia Pd(0), stosowanego w postaci kompleksu np. $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, który ulega addycji oksydacyjnej z halogenkiem arylowym lub winylowym (Ar-X , gdzie $\text{X} = \text{I}, \text{Br}$, czasem Cl), prowadząc do kompleksu Pd(II). Etap ten prowadzi zatem do utworzenia kompleksu Ar-Pd(II)-X i aktywacji substratu niealkinowego. Rola miedzi (Rysunek 29) w tym wariacie opiera się na aktywacji alkinu. Terminalny alkin ulega deprotonacji w obecności zasady (np. $i\text{-Pr}_2\text{NH}$, $i\text{-Pr}_2\text{NEt}$, Et_3N , pirydyna, $n\text{-BuNH}_2$, benzyloamina lub NaOH , Cs_2CO_3)^{150–152} oraz łączy się z miedzią tworząc kompleks $\text{CuX-C}\equiv\text{C-R}$. Utworzony kompleks po przekształceniu w $\text{Cu-C}\equiv\text{C-R}$ ($-\text{HX}$) jest źródłem fragmentu alkinowego i wchodzi w reakcję z Ar-Pd(II)-X tworzy kompleks $\text{Ar-Pd(II)-C}\equiv\text{C-R}$. Następnie w wyniku eliminacji redukcyjnej powstaje docelowy produkt $\text{Ar-C}\equiv\text{C-R}$, a katalizator palladowy zostaje odtworzony.^{148–150}

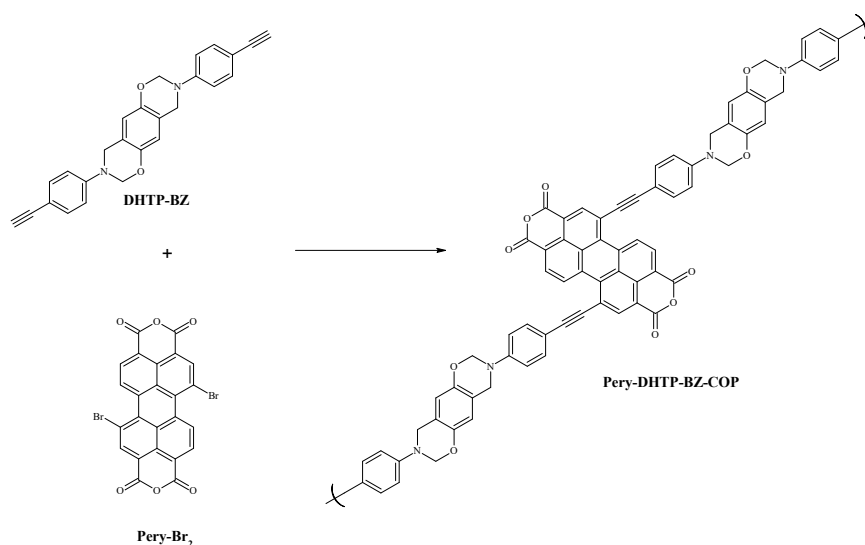


Rysunek 29. Schemat mechanizmu reakcji Sonogashira-Hagihary.¹⁴⁹

Reakcja Sonogashiry-Hagihary jest wrażliwa na obecność tlenu, dlatego zwykle prowadzi ją się w atmosferze gazu obojętnego, jak np. azotu lub argonu.^{153–156} Opisano również wiele wariantów tej reakcji np. bez soli miedzi, które są toksyczne i mogą prowadzić do powstawania wielu produktów ubocznych (jak produkty homosprzęgania terminalnych alkinów z utworzeniem pochodnych buta-1,3-diynowych) czy degradacji bioaktywnych substratów.^{156–159}

Jednym z obszarów chemii, w których reakcja Sonogashiry-Hagihary znajduje zastosowanie jest synteza nowych znaczników fluorescencyjnych lub modyfikacja już istniejących w celu poprawy ich właściwości fotofizycznych. Wyżej opisana reakcja umożliwia wprowadzanie rozbudowanych fragmentów aromatycznych, które zwiększają wydajność sprzężenia elektronów typu π , a tym samym znacząco modyfikują właściwości optyczne otrzymanych związków. Poszerzenie układu sprzężonego π prowadzi zwykle do poprawy właściwości spektroskopowych molekuł, w tym batochromowego przesunięcia widm absorpcji i emisji czy zwiększenia wydajności kwantowej fluorescencji. Dzięki temu reakcja Sonogashiry-Hagihary może być niezwykle użytecznym narzędziem w projektowaniu nowych sond fluorescencyjnych, barwników do bioobrazowania oraz materiałów optoelektronicznych.

Taktykę tą zastosowano w zaprojektowaniu fluorescencyjnej sondy (Rysunek 30) do wykrywania jonów ołowiu Pb^{2+} , sklasyfikowanych przez WHO jako jeden z najbardziej niebezpiecznych elementów dla środowiska, zdrowia ludzkiego i zwierząt,¹⁶⁰ i 2,4,6-trinitrofenolu.¹⁶¹

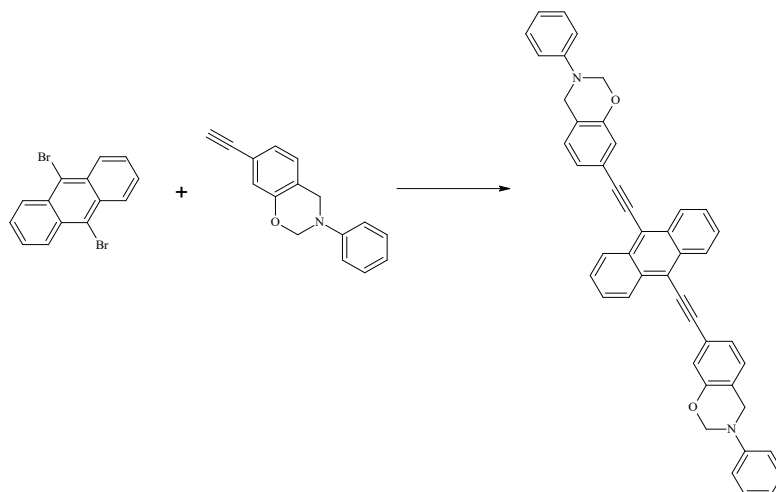


Rysunek 30. Schemat syntezy polimeru Pery-DHTP-BZ-COP z wykorzystaniem reakcji Sonogashiry-Hagihary.¹⁶¹

Sondę tę otrzymano w wyniku reakcji Sonogashiry-Hagihary prowadzonej pomiędzy DHTP-BZ oraz Pery-Br₂ (Rysunek 30), w obecności Pd(PPh₃)₄, DMF oraz TEA, przez 3 dni, w temperaturze 100 °C. Właściwości spektralne tej pochodnej zostały zbadane w metanolu, acetonie, etanolu, THF, DMF i wodzie. Maksima widm absorpcji mieszczą się w zakresie o 467 do 510 nm, a emisji od około 510 nm do 600 nm. Natomiast w etanolu i DMF nie obserwowano emisji. Wskazano, iż otrzymany związek charakteryzuje się właściwościami solwatochromowymi oraz może ulegać agregacji. Dodatkowo intensywność fluorescencji Pery-DHTP-BZ-COP zmniejsza się wraz ze wzrostem pH w zakresie od 3 do 11. Wykazano, że jony ołowiu(II) i 2,4,6-trinitrofenol powodują stopniowe wygaszanie fluorescencji otrzymanej pochodnej, co pozwala na selektywne i czułe ich wykrywanie.¹⁶¹

Innym przykładem jest 9,10-bis(6-etynylo-3-fenylo-3,4-dihydro-1,3-benzoksazy-no)antracen otrzymany w wyniku sprzęgania Sonogashiry-Hagihary pomiędzy 9,10-dibromoantracenenem a 6-etynylo-3-fenylo-3,4-dihydro-1,3-benzoksazyną w obecności Pd(PPh₃)₄, CuI, XPhos (2-dicykloheksylofosfino-2',4',6'-triizopropyllobifenyl), w środowisku TEA z dodatkiem THF, w temperaturze 80 °C i w atmosferze azotu (Rysunek 31).¹⁶²

Maksimum absorpcji tego związku w CH₂Cl₂ znajduje się przy 450 nm, a emisji 500 nm. Wydajność kwantowa fluorescencji wynosi 85 %. Po polimeryzacji prowadzonej w podwyższonej temperaturze (200 °C) w sulfolanie w obecności azotu zaobserwowano bathochromowe przesunięcie się maksimum emisji (z 507 nm do 528 nm) oraz drastyczny spadek wydajności kwantowej fluorescencji (z 85 % do 3 %). Zmiany właściwości fotofizycznych najprawdopodobniej wynikały z otwarcia pierścienia benzoksazyny, do którego doszło w warunkach polimeryzacji.¹⁶²

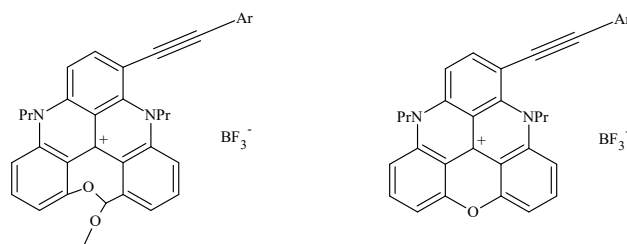


Rysunek 31. Schemat reakcji otrzymywania 9,10-bis(6-etynylo-3-fenylo-3,4-dihydro-1,3-benzoksazyno)antracenu.¹⁶²

Produkt polimeryzacji 9,10-bis(6-etynylo-3-fenylo-3,4-dihydro-1,3-benzoksazyno)antracenu stanowi potencjalną nową fotoluminescencyjną żywicę. Otrzymany materiał wykazuje charakterystyczną emisję fluorescencji, co pozwala na ocenę stopnia utwardzenia żywicy poprzez obserwację spadku intensywności fotoluminescencji. Dzięki właściwościom optycznym umożliwiającym prostą i skuteczną obserwację, opracowana żywica może służyć jako materiał utwardzalny o wysokiej stabilności termicznej.¹⁶²

Reakcja Sonogashiry-Hagihary została również wykorzystana do syntezy nowych czerwonych emiterów należących do grupy diazaoksotriangulenów i helicenów (ang. *diazaoxatriangulenes and helicenes*) (Rysunek 32). Reakcję prowadzono w obecności Pd_2dba_3 (tris(dibenzylidenoaceton) dipalladu(0)), PPh_3 , CuI , odpowiedniej jodopochodnej aromatycznej, w 1,2-dichloroetanie/TEA (3 : 1), w 75 °C przez okres od 3 do 5 h.¹⁶³

Uzyskane pochodne w rozpuszczalniku polarnym aprotycznym (acetonitrylu) charakteryzują się położeniem maksimów absorpcji w zakresie od około 570 do 640 nm, a emisji w zakresie od 620 do 730 nm (Rysunek 33). Molowy współczynnik absorpcji mieści się między 6100 a 14100 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, a przesunięcie Stokesa między 1241 a 2145 cm^{-1} . Otrzymane związki posiadają zróżnicowaną wydajność kwantową fluorescencji. Maksymalna wynosi ponad 50 % a najniższa poniżej 1 %.¹⁶³



4a - pochodna bez aromatycznego podstawnika

4b Ar = Ph

4c Ar = 4-PhNO₂

4d Ar = 4-PhCN

4e Ar = 4-PhOMe

4f Ar = 3,5-Ph(CF₃)₂

4g Ar = 2-pirydyna

4h Ar = 2-tiofen

5a - pochodna bez aromatycznego podstawnika

5b Ar = Ph

5c Ar = 4-PhNO₂

5d Ar = 4-PhCN

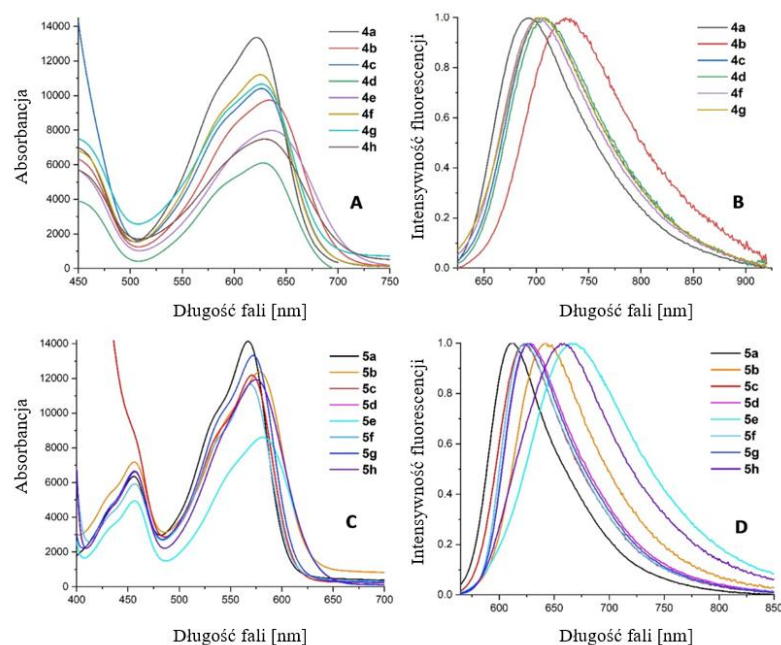
5e Ar = 4-PhOMe

5f Ar = 3,5-Ph(CF₃)₂

5g Ar = 2-pirydyna

5h Ar = 2-tiofen

Rysunek 32. Struktury czerwonych emiterów.¹⁶³

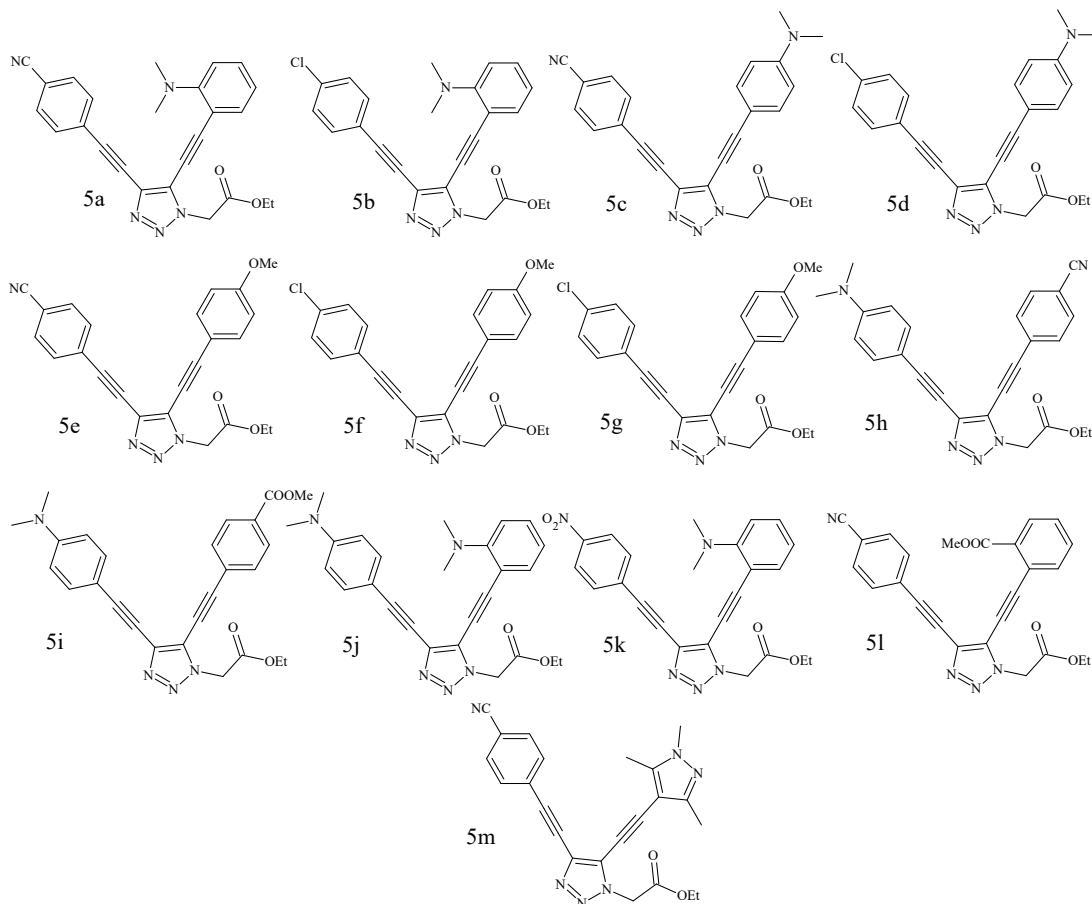


Rysunek 33. Widma absorpcji i znormalizowane widma emisji wybranych czerwonych emiterów zmierzone w acetonitrylu.¹⁶³

W przypadku większości tych pochodnych wprowadzenie podstawników aromatycznych sprzężonych przez wiązanie potrójne do układów wyjściowych poprawiło właściwości spektroskopowe i przesunęło widma absorpcji i emisji w stronę czerwieni.¹⁶³

Reakcję Sonogashiry-Hagihary wykorzystano także w syntezie dietynylotriazolowych znaczników fluorescencyjnych. Pochodne otrzymano dzięki sprzęganiu 4-etynylo-5-jodo-1,2,3-triazoli z aryloacetylenowymi pochodnymi zawierającymi grupy elektronodonorowe i elektronoakceptorowe. Reakcje prowadzono w obecności

$\text{Pd(PPh}_3)_4$, CuI , K_3PO_4 , w temperaturze wrzenia THF, przez 1 - 11 h, otrzymując 13 pochodnych (Rysunek 34).¹⁶⁴

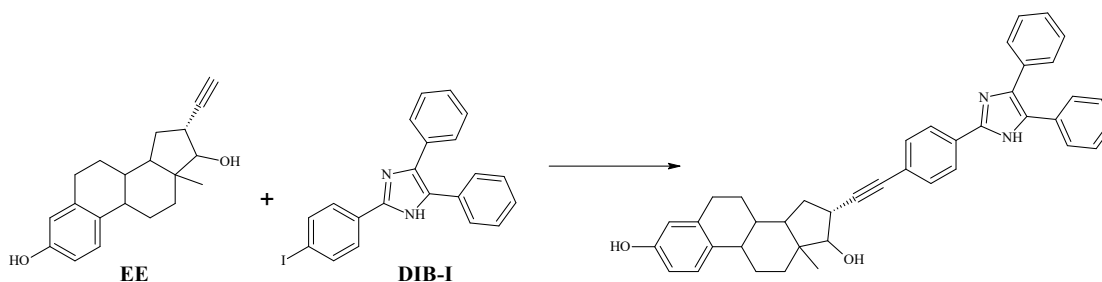


Rysunek 34. Struktury związków dietynylotriazolowych.¹⁶⁴

Uzyskane pochodne w środowisku THF wykazują maksima absorpcji w zakresie od około 252 do 307 nm, natomiast maksima emisji są zdecydowanie bardziej zróżnicowane i występują między 353 a 609 nm. Molowy współczynnik absorpcji mieści się w przedziale od 18000 do 49870 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, a przesunięcie Stokesa wynosi od około 7000 do 18500 cm^{-1} . Wydajności kwantowe fluorescencji wahają się od 5 do 60 %. Najdłuższe czasy zaniku fluorescencji (7,7 ns) zarejestrowano dla pochodnej 5a (Rysunek 34). Dla części wybranych związków (5b-e, 5i) właściwości spektroskopowe określono także w środowisku wodnym (Rysunek 34). Widma absorpcji i fluorescencji zasadniczo są zależne są od rodzaju środowiska wodnego (woda, PBS, woda/DMSO 2 %, PBS/DMSO 2 %, DMEM (zmodyfikowana pożywka Dulbecco Eagle - podłoże do hodowli komórkowych)/DMSO 2 %) w tym od pH, jak i obecności różnych związków organicznych (aminokwasów, witamin i białek) obecnych w DMEM.

Otrzymane związki umożliwiają znakowanie białek oraz obrazowanie komórkowe. Ich aktywność biologiczną przebadano względem komórek HeLa oraz HEK293 i wykazano brak działania cytotoksycznego.¹⁶⁴

Kolejnym przykładem zastosowania reakcji Sonogashiry-Hagihary jest uzyskanie związku fluoryzującego umożliwiającego wykrywanie etynyloestradiolu (EE) w próbkach wody rzecznej (Rysunek 35). Związek ten jest powszechnym składnikiem doustnych tabletek antykoncepcyjnych dla kobiet, a poziom jego stężenia w akwenach wodnych wymaga kontroli. Do syntezy wykorzystano DIB-I (4-(4,5-difenylo-1H-imidazol-2-ilo)jodobenzen), który w wyniku reakcji z EE prowadzi do otrzymania fluorescencyjnej pochodnej z maksimum emisji obserwowanym przy długości fali 400 nm. Metoda ta jest niezwykle czuła i umożliwia wykrycie EE nawet w niskich stężeniach - rzędu 7,4 ng/l.¹⁶⁵



Rysunek 35. Schemat reakcji pomiędzy EE a DIB.¹⁶⁵

W literaturze przykładów wykorzystania reakcji Sonogashiry-Hagihary jest wiele, a sama reakcja nadal cieszy się dużą popularnością.^{166–169}

Reakcja ta otwiera szerokie perspektywy w projektowaniu i otrzymywaniu nowych znaczników fluorescencyjnych o zróżnicowanych długościach fal emisji, wysokiej czułości oraz selektywności, a co najważniejsze umożliwia otrzymywanie fluoroforów charakteryzujących się zróżnicowanym i bardzo szerokim potencjałem aplikacyjnym.

II. Cel pracy

Techniki wykorzystujące fluorescencję charakteryzują się wieloma zaletami, które determinują ich szerokie zastosowanie w badaniach chemicznych, biologicznych, medycznych i materiałowych. Jedną z ich podstawowych zalet jest wysoka czułość umożliwiająca monitorowanie śladowych ilości różnych substancji, a nawet pojedynczych cząsteczek. Techniki bazujące na zjawisku fluorescencji są również selektywne. Dzięki odpowiedniemu doborowi długości fal wzbudzenia i obserwacji emisji możliwa jest jednoczesna analiza wielu składników w złożonych układach. Na podkreślenie zasługuje także niska inwazyjność tych technik, która umożliwia obserwację struktur biologicznych *in situ* bez ich destrukcji.

Obecność fluoroforu o odpowiednich właściwościach spektralnych i fotofizycznych (takich jak długofalowa charakterystyka widmowa, wysoka wydajność kwantowa fluorescencji oraz fotostabilność) w analizowanym obiekcie, stanowi podstawowy warunek stosowania pełnej gamy technik fluorescencyjnych. Wiele układów nie wykazuje fluorescencji lub cechuje się emisją niekompatybilną z wymaganiami eksperymentu. W takich przypadkach konieczne jest wprowadzenie zewnętrznych fluoroforów, co może prowadzić do komplikacji, takich jak zaburzenie natywnych właściwości fizykochemicznych lub strukturalnych próbki, wpływ na dynamikę zachodzących procesów, a w przypadku układów biologicznych - ingerencja w funkcje komórkowe lub molekularne. Wskazuje to jak istotne znaczenie ma właściwy dobór znacznika, który dodatkowo powinien wykazywać odporność na fotowysbielanie, działanie wygaszaczy obecnych w badanym układzie oraz niepożądane oddziaływania z analizowanym obiektem.¹

Biorąc pod uwagę zalety oraz wymagania stawiane eksperymentom wykorzystującym zjawisko fluorescencji, istotne jest ciągle poszerzanie baz sond fluorescencyjnych, co umożliwia ich racjonalny i celowany dobór w zależności od specyfiki badanego układu. Źródłem inspiracji dla wielu modyfikacji strukturalnych mających na celu otrzymanie nowych, efektywnych znaczników fluorescencyjnych są białkowe aminokwasy aromatyczne (Tyr, Phe, Trp). Wykorzystanie niezmodyfikowanych aromatycznych naturalnych aminokwasów jako narzędzi do badań fluorescencyjnych ma swoje ograniczenia. Wynikają one głównie z właściwości spektralnych i fotofizycznych tych związków.¹ Wady te są częściowo niwelowane przez łatwość przyłączenia naturalnych fluoroforów do analizowanych układów. Projektowanie oraz synteza nowych

fluoroforów, będących zmodyfikowanymi formami białkowych aminokwasów aromatycznych, umożliwiają wykorzystanie zalet oraz redukcję wad fluoroforów naturalnych poprzez zwiększenie efektywności chromoforowej oraz fluoroforowej. Z tego powodu stanowią one często punkt wyjścia do syntezy nowych fluorescencyjnych pochodnych o zoptymalizowanych właściwościach spektralnych i fotofizycznych. W literaturze fluorescencyjne niebiałkowe aminokwasy aromatyczne są szeroko opisywane jako narzędzia umożliwiające syntezę znakowanych peptydów i białek, wizualizację wzrostu bakterii, obrazowanie żywych komórek czy badanie interakcji między białkami. Ponadto wprowadzenie ich do danego układu nie wpływa znacząco na jego właściwości.¹⁰²

Dlatego celem niniejszej pracy doktorskiej zatytułowanej „*Fluorescencyjne analogi aminokwasów niebiałkowych z fragmentem tyrozyny - synteza, charakterystyka fotofizyczna i ocena aktywności biologicznej*” było projektowanie, synteza oraz badanie właściwości nowych znaczników fluorescencyjnych zawierających szkielet tyrozyny.

Cel realizowano poprzez:

- projektowanie i syntezę asymetrycznych i symetrycznych acetylenowych pochodnych tyrozyny
- badanie właściwości spektroskopowych otrzymanych acetylenowych pochodnych tyrozyny
- sprawdzenie fotostabilności otrzymanych acetylenowych pochodnych tyrozyny
- określenie wpływu na żywotność wybranych linii komórkowych otrzymanych acetylenowych pochodnych tyrozyny
- badanie zdolności do przenikania przez modelowe błony komórkowe oraz błony komórkowe komórek nowotworowych wybranych acetylenowych pochodnych tyrozyny.

Realizacja postawionego celu umożliwiła określenie potencjału aplikacyjnego otrzymanych znaczników fluorescencyjnych, ze szczególnym uwzględnieniem ich zastosowania w badaniach układów biologicznych.

Do syntezy zaplanowanych pochodnych wykorzystano reakcję Sonogashiry-Hagihary, natomiast właściwości spektroskopowe określono poprzez analizę widm absorpcji i emisji, wyznaczenie molowych współczynników absorpcji, przesunięć Stokesa, wydajności kwantowych fluorescencji, jasności świecenia, czasów zaniku fluorescencji oraz fotostabilności. Zakres badań rozszerzono o ocenę wpływu środowiska na

wymienione parametry. Aktywność biologiczna została sprawdzona w badaniach MTT, w których określono wpływ otrzymanych związków na żywotność wybranych linii komórkowych (HaCaT (zdrowe keratynocyty ludzkie), MCF-7 (komórki nowotworowe raka piersi) oraz PC-3 (komórki nowotworowe raka prostaty)). Dodatkowo sprawdzono zdolności zsyntezowanych pochodnych do oddziaływań z liposomami oraz penetracji błony komórkowej komórek MCF-7.

Rosnące znaczenie technik fluorescencyjnych w badaniach naukowych stwarza potrzebę opracowywania nowych, bardziej selektywnych i czułych znaczników fluorescencyjnych. W tym kontekście pochodne tyrozyny są obiecującymi fluoroforami o szerokim potencjale aplikacyjnym. Dzięki obecności dwóch grup funkcyjnych (aminowej i karboksylowej) możliwe jest wbudowanie tych pochodnych w peptydy, białka i inne układy biologiczne, a ich właściwości umożliwiają prowadzenie badań z wykorzystaniem wyjątkowo czułego zjawiska fluorescencji, co pozwala na wnikliwą analizę różnorodnych układów w tym także biologicznych.

III. Część doświadczalna

1. Uwagi ogólne

1.1. Wykaz stosowanych skrótów i symboli:

ac-2-Naft - 2-etynylnaftalen,
ac-2-Naft-6-OMe - 2-etynylo-6-metoksynaftalen,
acDMA - 4-etynylo-N,N-dimetyloanilina,
AcOEt - octan etylu,
AcOH - kwas octowy,
acPh - etynylobenzen,
acPh-4-CHO - 4-etynylobenzaldehyd,
acPh-4-NO₂ - 1-etynylo-4-nitrobenzen,
acPh-4-OMe - 1-etynylo-4-metoksybenzen,
acPhacDMA - 4-[(4-etynylofenylo)etynylo]-N,N-dimetyloanilina,
acPh-O-Ph - 1-etynylo-4-fenoksybenzen,
acPir - 2-etynylopirydyna,
Biotin-DOPE - 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfoetanoloamina-N-(biotynoilo),
Boc - grupa tert-butyloksykarbonylowa,
Boc₂O - diwęglan di-tert-butylu,
BocTyrOMe - ester metylowy N-Boc-*L*-tyrozyny,
BocTyrOMeI - ester metylowy N-Boc-3-jodo-*L*-tyrozyny,
BocTyrOMeI₂ - ester metylowy N-Boc-3,5-dijodo-*L*-tyrozyny,
CX - cykloheksan,
DCM - dichlorometan,
DMF - dimetyloformamid,
DMSO - dimetylosulfotlenek,
DNTB - (Odczynnik Ellmana) kwas 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy),
Et₂O - eter dietylowy,
GUV - (ang. *giant unilamellar vesicles*) gigantyczne jednowarstwowe liposomy,
H₂N₂Tyr(I)₂OMe - ester metylowy 3,5-dijodo-*L*-tyrozyny,
H₂N₂Tyr(I)OMe - ester metylowy 3-jodo-*L*-tyrozyny,
LUV - (ang. *large unilamellar vesicles*) duże jednowarstwowe liposomy,
MeCN - acetonitryl,

MeOH - metanol,

PBS - buforowany fosforanem roztwór soli fizjologicznej o $\text{pH} \cong 7,4$ ($C_{\text{NaCl}} = 137 \text{ mM}$, $C_{\text{KCl}} = 2,7 \text{ mM}$, $C_{\text{Na}_2\text{HPO}_4} = 10 \text{ mM}$, $C_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = 1,8 \text{ mM}$ - stężenia przeliczone na 1 litr roztworu PBS),

$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ - tetrakis(trifenylofosfino)pallad(0),

POPC - 1-palmitoilo-2-oleoil-*sn*-glycero-3-fosfocholina,

QY - wydajność kwantowa fluorescencji,

t-BuOH - tert-butanol,

TEA - trietyloamina,

TFA - kwas trifluorooctowy,

TMSacPh-4-CHO - 4-((trimetylosililo)etynylo)benzaldehyd,

TMSacPhacDMA - 4-((4-(trimetylosililoetynylo)fenylo)etynylo)-N,N-dimetyloanilina,

TNB - kwas 2-nitro-5-tiobenzoesowy,

t_R - czas retencji w analizie RP-HPLC,

Tyr(ac-2-Naft) - ester metylowy N-Boc-(3-(naftalen-2-ylo)etynylo)-L-tyrozyny,

Tyr(ac-2-Naft)₂ - ester metylowy N-Boc-(3,5-bis-(naftalen-2-ylo)etynylo)-L-tyrozyny,

Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) - ester metylowy N-Boc-(3-(6-metoksynaftalen-2-ylo)etynylo)-L-tyrozyny,

Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂ - ester metylowy N-Boc-(3,5-bis-(6-metoksynaftalen-2-ylo)etynylo)-L-tyrozyny,

Tyr(acDMA) - ester metylowy N-Boc-(3-(4-N,N-dimetylofenyloetynylo))-L-tyrozyny,

Tyr(acDMA)₂ - ester metylowy N-Boc-(3,5-bis-(4-N,N-dimetylofenyloetynylo))-L-tyrozyny,

Tyr(acPh) - ester metylowy N-Boc-(3-(2-fenyloetynylo))-L-tyrozyny,

Tyr(acPh)₂ - ester metylowy N-Boc-(3,5-bis-(2-fenyloetynylo))-L-tyrozyny,

Tyr(acPh-4-CHO) - ester metylowy N-Boc-(3-(4-formylofenyloetynylo))-L-tyrozyny,

Tyr(acPh-4-CHO)₂ - ester metylowy N-Boc-(3,5-bis-(4-formylofenyloetynylo))-L-tyrozyny,

Tyr(acPh-4-NO₂) - ester metylowy N-Boc-(3-(4-nitrofenyloetynylo))-L-tyrozyny,

Tyr(acPh-4-NO₂)₂ - ester metylowy N-Boc-(3,5-bis-(4-nitrofenyloetynylo))-L-tyrozyny,

Tyr(acPh-4-OMe) - ester metylowy N-Boc-(3-(4-metoksyfenyloetynylo))-L-tyrozyny,

Tyr(acPh-4-OMe)₂ - ester metylowy N-Boc-(3,5-bis-(4-metoksyfenyloetynylo))-L-tyrozyny,

Tyr(acPhacDMA) - ester metylowy N-Boc-3-(4-(4-(N,N-dimetyloamino)fenyloetynylo)fenyloetynylo)-*L*-tyrozyny,

Tyr(acPh-O-Ph) - ester metylowy N-Boc-(3-(4-fenoksyfenyloetynylo))-*L*-tyrozyny,

Tyr(acPh-O-Ph)₂ - ester metylowy N-Boc-(3,5-bis-(4-fenoksyfenyloetynylo))-*L*-tyrozyny,

Tyr(acPir) - ester metylowy N-Boc-(3-(pirydyn-2-ylo)etynylo)-*L*-tyrozyny,

Tyr(acPir)₂ - ester metylowy N-Boc-(3,5-bis-(pirydyn-2-ylo)etynylo)-*L*-tyrozyny.

1.2. Metody oczyszczania związków

- a) Chromatografia kolumnowa (kolumna o wymiarach 4 x 45 cm), z wykorzystaniem jako fazy stacjonarnej żelu krzemionkowego (Kieselgel 60, 0,040 - 0,063 mm, Merck), a jako fazy ruchomej:

AcOEt : eter naftowy (1 : 1) **(a)**

AcOEt : eter naftowy (1 : 2) **(b)**

AcOEt : eter naftowy (1 : 3) **(c)**

AcOEt : eter naftowy (1 : 4) **(d)**

AcOEt : eter naftowy (1 : 5) **(e)**

AcOEt : eter naftowy (1 : 7) **(f)**

AcOEt : eter naftowy (1 : 8) **(g)**

AcOEt : eter naftowy (1 : 9) **(h)**

AcOEt : eter naftowy (2 : 1) **(i)**

1.3. Metody sprawdzania czystości związków

- a) Wysokosprawna chromatografia cieczowa na fazach odwróconych (RP-HPLC), używając kolumny analitycznej C8-Discovery 25 cm x 4,6 mm x 5 µm; detektora PDA, z detekcją UV ($\lambda = 254$ nm) przy przepływie 1 ml/min, stosując gradient:

- roztwór B od 0 do 100 % w 60 min oraz 10 min 100 % B;

gdzie A to 0,1 % wodny roztwór TFA, B to 80 % wodny roztwór MeCN z dodatkiem 0,08 % TFA. **(A)**

- roztwór C od 0 do 100 % w 60 min oraz 10 min 100 % C; gdzie

B to 80% wodny roztwór MeCN z dodatkiem 0,08 % TFA, C to MeCN. **(B)**

- roztwór B od 0 do 100 % w 60 min oraz 10 min 100 % B;

gdzie A to woda, B to 80 % wodny roztwór MeCN bez dodatku TFA. **(C)**

- roztwór C od 0 do 100 % w 60 min oraz 10 min 100 % C;
B to 80 % wodny roztwór MeCN bez dodatku TFA, C to MeCN. (D)

Analiza RP-HPLC wykazała, że wszystkie otrzymane asymetryczne i symetryczne acetylenowe pochodne tyrozyny charakteryzowały się czystością przekraczającą 96 %.

1.4. Metody identyfikacji związków

- Analiza widm mas (MS) otrzymanych za pomocą spektrometru Burker Daltonics HCT Ultra z jonizacją typu „elektrosprej” z pułapką jonową. (I)
 - Analiza widm mas (LC/MS) zarejestrowanych z wykorzystaniem spektrometru Burker Daltonics HCT Ultra z jonizacją typu „elektrosprej” z pułapką jonową oraz chromatografu cieczowego firmy Agilent Technologies (model 1200). (II)
- Warunki analizy HPLC:

Faza ruchoma A₁: woda dejonizowana z dodatkiem 0,3 % MeCN i 0,1 % kwasu mrówkowego, Faza B₁: 100 % MeCN z 0,1 % dodatkiem kwasu mrówkowego. Kolumna: ZORBAX Eclipse Plus C18, Rapid Resolution HD 2,1 x 100 mm, 1,8 Micro.

- Analiza widm ¹H NMR otrzymanych za pomocą spektrometru Bruker AVANCE III 500 MHz.

1.5. Aparatura stosowana do badań spektroskopowych

- Spektrofotometr UV/Vis Perkin-Elmer Lambda 40, badany zakres: 220 - 500, 220 - 700 nm.
 - Spektrofluorymetr FluoroMax-4 Horiba Jobin Yvon - rejestracja widm emisji po wzbudzeniu przy podanej długości fali (λ_{wzb}) z szerokością spektralną wiązki w torze wzbudzającym i obserwacyjnym 1 nm:
- BocTyrOMe: $\lambda_{wzb} = 270$ nm; badany zakres: 275 - 500 nm (MeCN, MeOH, PBS z dodatkiem 25 % DMSO), $\lambda_{wzb} = 260$ nm; badany zakres: 265 - 500 nm (CX),
 - Tyr(acPh): $\lambda_{wzb} = 305$ nm; badany zakres: 310 - 600 nm (MeCN, MeOH, CX), $\lambda_{wzb} = 300$ nm; badany zakres: 305 - 500 nm (PBS z dodatkiem 25 % DMSO),
 - Tyr(acPh)₂: $\lambda_{wzb} = 300$ nm; badany zakres: 310 - 680 nm (MeCN, CX), $\lambda_{wzb} = 305$ nm; badany zakres: 310 - 600 nm (MeOH), $\lambda_{wzb} = 320$ nm; badany zakres: 325 - 600 nm (PBS z dodatkiem 25 % DMSO),

- Tyr(acPh-4-OMe): $\lambda_{wzb} = 310$ nm; badany zakres: 315 - 600 nm (MeCN, MeOH, CX), $\lambda_{wzb} = 300$ nm; badany zakres: 305 - 600 nm (PBS z dodatkiem 25 % DMSO),
- Tyr(acPh-4-OMe)₂: $\lambda_{wzb} = 320$ nm; badany zakres: 325 - 600 nm (MeCN, MeOH, CX, PBS z dodatkiem 25 % DMSO),
- Tyr(acDMA): $\lambda_{wzb} = 340$ nm; badany zakres: 345 - 650 nm (MeCN, MeOH, CX), $\lambda_{wzb} = 355$ nm; badany zakres: 360 - 600 nm (PBS z dodatkiem 25 % DMSO),
- Tyr(acDMA)₂: $\lambda_{wzb} = 360$ nm; badany zakres: 365 - 615 nm (MeCN, MeOH, CX), $\lambda_{wzb} = 380$ nm; badany zakres: 385 - 750 nm (PBS z dodatkiem 25 % DMSO),
- Tyr(acPir)₂: $\lambda_{wzb} = 320$ nm; badany zakres: 325 - 630 nm (MeCN, MeOH, CX, PBS z dodatkiem 25 % DMSO),
- Tyr(acPh-4-CHO): $\lambda_{wzb} = 340$ nm; badany zakres: 345 - 670 nm (MeCN, MeOH, CX, PBS z dodatkiem 25 % DMSO),
- Tyr(acPh-4-CHO)₂: $\lambda_{wzb} = 330$ nm; badany zakres: 335 - 650 nm (MeCN), $\lambda_{wzb} = 325$ nm; badany zakres: 330 - 640 nm (MeOH, CX, PBS z dodatkiem 25 % DMSO),
- Tyr(acPh-4-NO₂): $\lambda_{wzb} = 380$ nm; badany zakres: 385 - 700 nm (MeCN, MeOH, CX, PBS z dodatkiem 25 % DMSO),
- Tyr(acPh-4-NO₂)₂: $\lambda_{wzb} = 370$ nm; badany zakres: 375 - 720 nm (MeCN, MeOH, CX, PBS z dodatkiem 25 % DMSO),
- Tyr(acPh-O-Ph): $\lambda_{wzb} = 310$ nm; badany zakres: 315 - 600 nm (MeCN, MeOH, CX, PBS z dodatkiem 25 % DMSO),
- Tyr(acPh-O-Ph)₂: $\lambda_{wzb} = 310$ nm; badany zakres: 315 - 610 nm (MeCN, MeOH, CX, PBS z dodatkiem 25 % DMSO),
- Tyr(ac-2-Naft): $\lambda_{wzb} = 320$ nm; badany zakres: 325 - 600 nm (MeCN, MeOH, CX, PBS z dodatkiem 25 % DMSO),
- Tyr(ac-2-Naft)₂: $\lambda_{wzb} = 320$ nm; badany zakres: 325 - 620 nm (MeCN, MeOH, CX, PBS z dodatkiem 25 % DMSO),
- Tyr(ac-2-Naft-6-OMe): $\lambda_{wzb} = 335$ nm; badany zakres: 340 - 600 nm (MeCN, MeOH, CX), $\lambda_{wzb} = 320$ nm; badany zakres: 325 - 620 nm (PBS z dodatkiem 25 % DMSO),

- Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂: $\lambda_{wzb} = 335$ nm; badany zakres: 340 - 600 nm (MeCN, MeOH, CX), $\lambda_{wzb} = 350$ nm; badany zakres: 355 - 650 nm (PBS z dodatkiem 25 % DMSO),
 - Tyr(acPhacDMA): $\lambda_{wzb} = 390$ nm; badany zakres: 395 - 730 nm (MeCN, MeOH, PBS z dodatkiem 25 % DMSO), $\lambda_{wzb} = 350$ nm; badany zakres: 355 - 600 nm (CX).
- c) Fluorymetr impulsowy FT 300 firmy PicoQuant z wykorzystaniem jako źródła światła impulsowej diody laserowej PLS:
- ✓ 280 nm dla: BocTyrOMe,
 - ✓ 313 nm dla: Tyr(acPh), Tyr(acPh)₂, Tyr(acPh-4-OMe), Tyr(acPh-4-OMe)₂, Tyr(acDMA), Tyr(acDMA)₂, Tyr(acPh-4-NO₂)₂, Tyr(ac-2-Naft), Tyr(ac-2-Naft)₂, Tyr(ac-2-Naft-6-OMe), Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂, Tyr(acPir)₂, Tyr(acPh-4-CHO), Tyr(acPh-4-CHO)₂, Tyr(acPh-O-Ph), Tyr(acPh-O-Ph)₂,
 - ✓ 340 nm dla: Tyr(acPhacDMA),
- oraz lasera diodowego LDH:
- ✓ 375 nm dla: Tyr(acPh-4-NO₂).

1.6. Aparatura stosowana do wizualizacji modeli komórkowych i żywych komórek

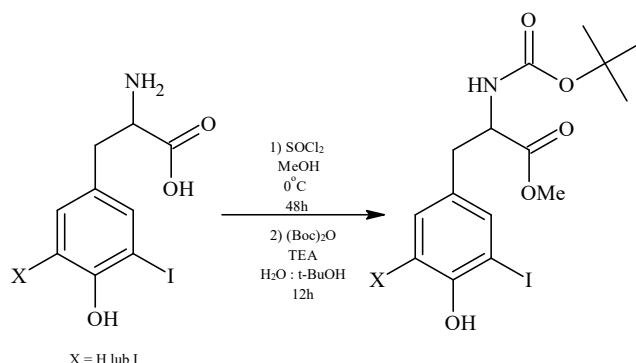
- a) Olympus FluoView1000 MPE wyposażony w laser Coherent Chameleon Vision, pracujący z częstotliwością 80 MHz. Do obserwacji użyto obiektywu Olympus UPlanSApo 60×, NA = 1,2, z immersją wodną. Do detekcji wykorzystano detektory PMT - system został użyty do badań modeli komórkowych GUV.
- b) Konfokalny mikroskop fluorescencyjny MT200 firmy PicoQuant wyposażony w laser LDH pracujący z częstotliwością 80 MHz. Do obserwacji użyto obiektywu Olympus WHN 10×/22 z immersją wodną. Do detekcji wykorzystano detektory SPAD (ang. *Single Photon Avalanche Diodes*) - system został użyty do obrazowania żywych komórek.

2. Opis syntez

2.1. Synteza BocTyrOMeI oraz BocTyrOMeI₂

❖ Procedurę syntezy powtarzałam w zależności od zapotrzebowania na osłonięte jodopochodne tyrozyny.

Procedura wprowadzania osłon na 3-jodo-*L*-tyrozinę lub 3,5-dijodo-*L*-tyrozinę



Rysunek 36. Warunki wprowadzania osłon na grupę aminową i karboksylową jodopochodnych tyrozyny.

- **Wprowadzanie estru metylowego na grupę karboksylową**

Odważoną pochodną tyrozyny (550 mg, 1,8 mmola 3-jodo-*L*-tyrozyny lub 1340 mg, 3,1 mmola 3,5-dijodo-*L*-tyrozyny) zawiesiłam w świeżo przedestylowanym metanolu, a następnie ochłodziłam mieszaninę do temperatury -10 °C za pomocą łaźni lodowej. Stale mieszając reagenty wkraplałam chlorek tionylu (2 eq). Mieszaninę, zabezpieczoną przed wilgocią, pozostawiłam na 48 h, utrzymując mieszanie (w przypadku wprowadzenia osłony estrowej na 3,5-dijodo-*L*-tyrozinę procedurę powtarzałam dwukrotnie w celu zwiększenia wydajności procesu). Po tym czasie rozpuszczalnik odparowałam za pomocą wyparki próżniowej, a produkt izolowałam za pomocą krystalizacji z mieszaniny rozpuszczalników MeOH : Et₂O.

- **Wprowadzanie osłony Boc na grupę aminową**

Otrzymany ester metylowy 3-jodo-*L*-tyrozyny (580 mg, 1,8 mmola) lub 3,5-dijodo-*L*-tyrozyny (1300 mg, 2,9 mmola) rozpuściłam w mieszaninie wody i tert-butanolu w stosunku objętościowym 5 : 4. Układ doprowadziłam do pH około 7 za pomocą TEA. Następnie wprowadzałam porcjami przez godzinę Boc₂O (1,5 eq) kontrolując pH. Reakcję prowadziłam przez 24 h, stale mieszając reagenty

w temperaturze pokojowej. W celu izolacji produktu przemyłam warstwę wodną kilkukrotnie eterem naftowym, a następnie doprowadziłam jej odczyn do $\text{pH} = 2$ za pomocą 1 M HCl. Warstwę wodną przemyłam trzykrotnie ($3 \times 20 \text{ ml}$) AcOEt, a zebrane warstwy organiczne przemyłam solanką i suszyłam nad bezwodnym MgSO_4 . Środek suszący przefiltrowałam, a rozpuszczalnik organiczny odparowałam za pomocą wyparki próżniowej. Produkt izolowałam za pomocą krystalizacji z mieszaniny rozpuszczalników: AcOEt : eter naftowy (pochodna BocTyrOMeI₂) lub chloroform : eter naftowy (pochodna BocTyrOMeI).

Wydajności obu reakcji wahały się między 10 a 90 %. Tożsamość produktów potwierdzałam za pomocą widma mas:

- ✓ BocTyrOMeI ($m/z = 419,96$, $[\text{M} - \text{H}]^-$, $M = 421,23 \text{ g/mol}$) (I)
- ✓ BocTyrOMeI₂ ($m/z = 545,93$, $[\text{M} - \text{H}]^-$, $M = 547,13 \text{ g/mol}$) (II)

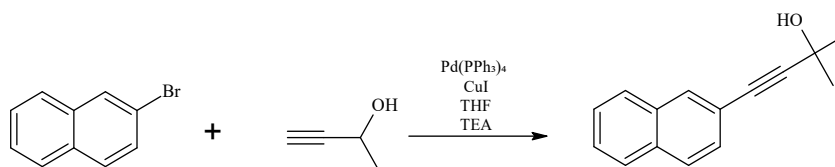
2.2. Synteza acetylenowych substratów

❖ Reakcje syntezy substratów acetylenowych i ściągania osłon były powtarzane w zależności od zapotrzebowania.

Procedura syntezy acetylenowych substratów

Do suchej kolby okrągłodennej wprowadziłam 1100 mg (5,3 mmola) 2-bromonaftalenu lub 550 mg (2,2 mmole) 4-jodonitrobenzenu lub 155 mg (0,5 mmola) 1-jodo-4-(2-(trimetylosililo)etynylobenzenu oraz w ilościach katalitycznych w atmosferze azotu $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ i CuI. Po dziesięciu minutach do kolby zabezpieczonej gumową septą dodałam za pomocą strzykawki 2 ml THF oraz 0,5 ml TEA. Mieszaninę mieszałam przez 10 minut. Następnie dodałam powoli, w porcjach, w ciągu 6 godzin, 3 eq 2-metylo-3-yn-2-olu lub 2 eq 4-etynylo-N,N-dimetyloaniliny rozpuszczonych w 0,5 ml THF. Otrzymaną mieszaninę reakcyjną mieszałam w temperaturze 60 °C w łaźni wodnej. Reakcję prowadziłam przez 48 h. Zawartość kolby przeniosłam do 20 ml H₂O, a następnie prowadziłam ekstrakcję chloroformem ($3 \times 20 \text{ ml}$) (w przypadku pochodnej z naftalenem) lub AcOEt ($3 \times 20 \text{ ml}$) (w przypadku pochodnej z nitrobenzenem i N,N-dimetyloaniliną). Połączone warstwy organiczne suszyłam nad bezwodnym MgSO_4 . Środek suszący przefiltrowałam, a rozpuszczalnik organiczny odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany produkt izolowałam za pomocą chromatografii kolumnowej, stosując odpowiedni eluent. Wstępnie oczyszczony związek poddałam krystalizacji z mieszaniny AcOEt i eteru naftowego.

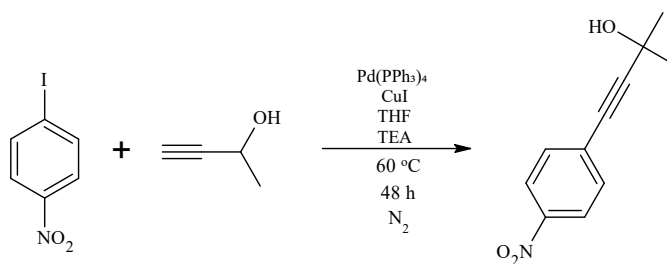
2.2.1. Synteza 2-metylo-4-(naftalen-2-ylo)but-3-yn-2-olu



Rysunek 37. Schemat syntezy 2-metylo-4-(naftalen-2-ylo)but-3-yn-2-olu.

Związek oczyszczałam za pomocą chromatografii kolumnowej stosując jako eluent kolejno układ e i f. Otrzymałam 407 mg (1,9 mmola, W = 36 %) białego ciała stałego. Tożsamość związku była potwierdzana na podstawie porównywania ze wzorcem opisanym w literaturze.¹⁷⁰

2.2.2. Synteza 4-(4-nitrofenylo)but-3-yn-2-olu

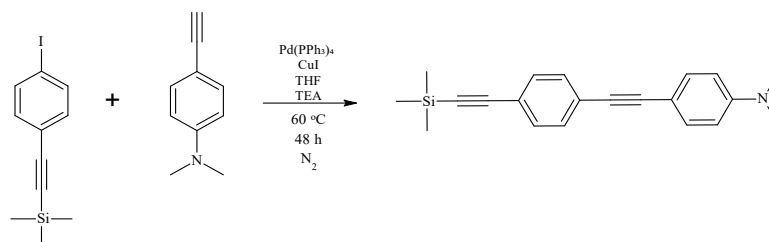


Rysunek 38. Schemat syntezy 4-(4-nitrofenylo)but-3-yn-2-olu.

Związek poddałam oczyszczaniu za pomocą chromatografii kolumnowej (układ e). Otrzymałam 281,5 mg (1,4 mmol, W = 64 %) brązowego ciała stałego. Tożsamość związku została określona za pomocą widma mas:

✓ 4-(4-nitrofenylo)but-3-yn-2-ol ($m/z = 227,90$, $[M + Na]^+$, $M = 205,00$ g/mol) (I)

2.2.3. Synteza 4-((4-(trimetylosililoetynylo)fenylo)etynylo)-N,N-dimetyloaniliny



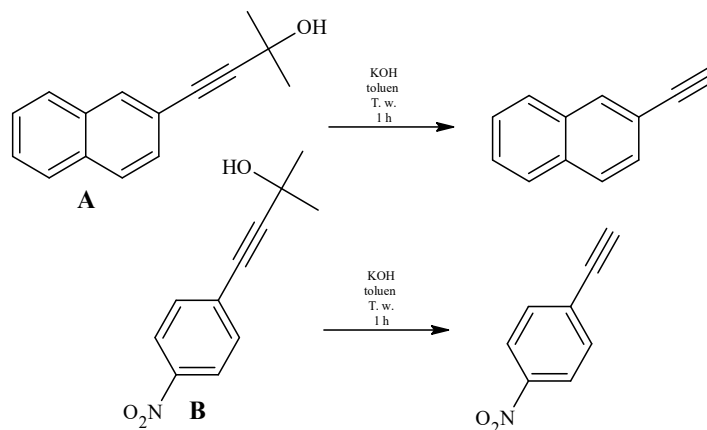
Rysunek 39. Schemat syntezy 4-((4-(trimetylosililoetynylo)fenylo)etynylo)-N,N-dimetyloaniliny.

Związek poddałam oczyszczaniu za pomocą chromatografii kolumnowej (układ e). Otrzymałam 70,1 mg (0,22 mmol, W = 44 %) białego ciała stałego. Tożsamość związku została określona za pomocą widma mas:

✓ $(\text{CH}_3)_3\text{SiacPhacDMA}$ ($m/z = 318,30$, $[\text{M} + \text{H}]^+$, $M = 317,50$ g/mol) (I)

Procedurę syntezy powtarzałam trzykrotnie ze względu na ograniczoną powtarzalność uzyskiwanych wydajności. Jednorazowe przeprowadzenie reakcji nie pozwalało na otrzymanie wystarczającej ilości produktu do dalszych etapów syntezy, dlatego konieczne było wykonanie kilku niezależnych syntez w celu zgromadzenia odpowiedniej ilości substratu do kolejnych badań.

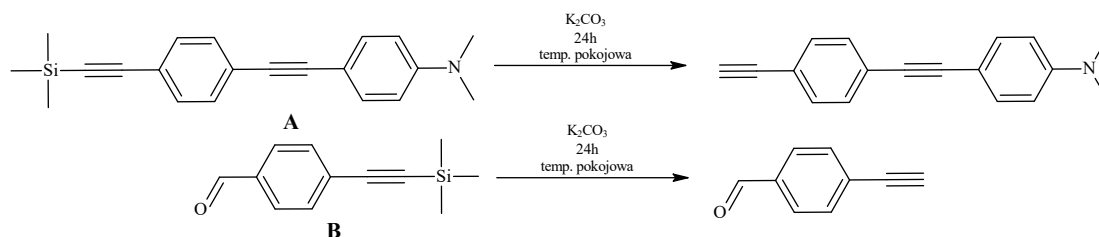
2.2.4. Usuwanie osłony z 2-metylo-4-(naftalen-2-ylo)but-3-yn-2-olu oraz 4-(4-nitrofenylo)but-3-yn-2-olu



Rysunek 40. Schemat usuwania osłony z 2-metylo-4-(naftalen-2-ylo)but-3-yn-2-olu (A) oraz 4-(4-nitrofenylo)but-3-yn-2-olu (B).

Do suchej kolby wprowadziłam 126 mg (0,6 mmol) 2-metylo-4-(naftalen-2-ylo)but-3-yn-2-olu lub 164 mg (0,8 mmol) 4-(4-nitrofenylo)but-3-yn-2-olu. Następnie dodałam 3 ml toluenu oraz 2 eq rozdrobnionego w moździerzu KOH. Reakcję prowadziłam w temperaturze wrzenia toluenu, w atmosferze azotu przez 1 h. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowałam za pomocą wyparki próżniowej. W celu usunięcia resztek toluenu kolbę przemyłam trzykrotnie etanolem, każdorazowo odparowując rozpuszczalnik. Przebieg reakcji śledziłam za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Związków nie poddawałam dalszemu oczyszczaniu. Założyłam, że ściągnięcie osłony przebiegło selektywnie ze 100 % wydajnością.

2.2.5. Usuwanie osłony trimetylosililowej z 4-((4-(trimetylosililoetynylo)fenylo)etynylo)-N,N-dimetyloaniliny oraz 4-((trimetylosililo)etynylo)benzaldehydu



Rysunek 41. Schemat usuwania osłony trimetylosililowej z 4-((4-(trimetylosililoetynylo)fenylo)etynylo)-N,N-dimetyloaniliny (A) oraz 4-((trimetylosililo)etynylo)benzaldehydu (B).

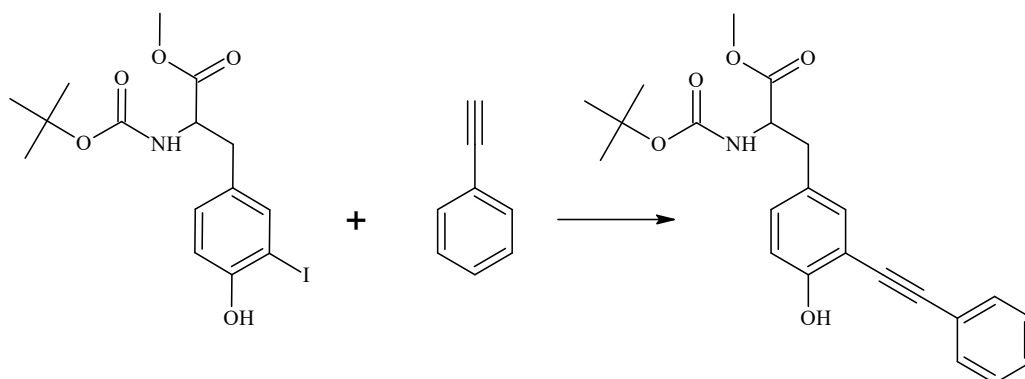
Do kolby okrągłodennej wprowadziłam 254 mg (0,8 mmola) TMSacPhacDMA lub 242 mg (1,2 mmola) TMSacPh-4-CHO i rozpuściłam w mieszaninie MeOH : THF (1 : 1). Następnie dodałam 3,3 eq K₂CO₃. Reakcję prowadziłam przez 24 h w temperaturze pokojowej, stale mieszając. Po tym czasie mieszaninę poreakcyjną rozcieńczyłam 20 ml wody i zakwasiłam do pH = 2 za pomocą 5 M HCl. Z roztworu wytrącił się osad, który następnie przesączyłam. Dodatkowo wykonałam ekstrakcję z przesączu. W tym celu filtrat przeniósłam do 20 ml H₂O, a następnie ekstrahowałam chloroformem (3 × 20 ml) (acPhacDMA) lub AcOEt (3 × 20 ml) (acPh-4-CHO). Odpowiednie warstwy organiczne połączyłam i suszyłam nad bezwodnym MgSO₄. Środek suszący przefiltrowałam, a rozpuszczalnik organiczny odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Związków nie poddawałam dalszemu oczyszczaniu. Otrzymałam 107 mg acPhacDMA (0,44 mmola, W = 55 %) oraz 74 mg acPh-4-CHO (0,57 mmola, W = 48 %).

2.3. Synteza asymetrycznych i symetrycznych acetylenowych pochodnych tyrozyny

Ogólna procedura reakcji Sonogashiry-Hagihary dla asymetrycznych i symetrycznych acetylenowych pochodnych tyrozyny

Do suchej kolby okrągłodennej wprowadziłam ester metylowy N-Boc-3-jodo-*L*-tyrozyny lub ester metylowy N-Boc-3,5-dijodo-*L*-tyrozyny (1 eq) oraz w ilościach katalitycznych w atmosferze azotu Pd(PPh₃)₄ i CuI. Po dziesięciu minutach do kolby zabezpieczonej gumową septą dodałam za pomocą strzykawki 2 ml THF oraz 0,5 ml TEA. Roztwór mieszałam przez 10 minut. Następnie dodałam powoli, w porcjach, w ciągu 6 h, 3, 2 lub 1 eq wybranej pochodnej acetylenowej rozpuszczonej w 0,5 ml THF. Otrzymany roztwór mieszałam w temperaturze 60 °C w łaźni wodnej. Reakcję prowadziłam przez 48 h. Po tym czasie mieszaninę poreakcyjną przeniosłam do 20 ml H₂O, a następnie ekstrahowałam AcOEt (3 × 20 ml). Połączone warstwy organiczne suszyłam nad bezwodnym MgSO₄. Środek suszący przefiltrowałam, a rozpuszczalnik organiczny odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany produkt oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej, stosując jako eluent jeden z wybranych układów. Wstępnie oczyszczony związek poddałam krystalizacji.

2.3.1. Synteza Tyr(acPh)



Rysunek 42. Schemat syntezy Tyr(acPh).

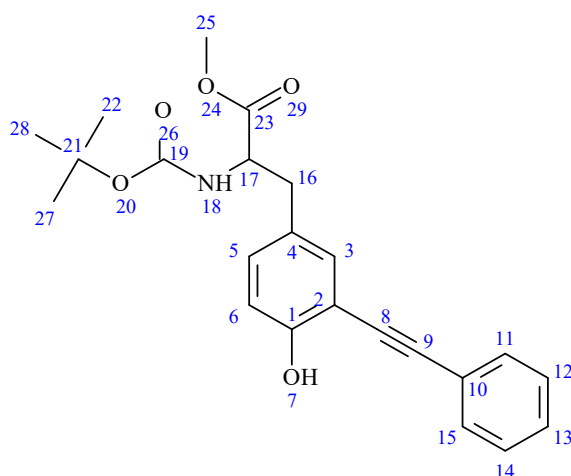
Do syntezy Tyr(acPh) użyłam 42 mg (0,1 mmola) BocTyrOMeI oraz 33 μ l (0,3 mmola) acPh, a reakcję prowadziłam zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 2.3. Otrzymany związek oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej (stosując jako eluent kolejno układ **h** i **g**). Ze względu na niewystarczającą czystość uzyskany osad poddałam krystalizacji z mieszaniny rozpuszczalników: AcOEt : eter naftowy. Z uwagi na brak postępów w krystalizacji związek ponownie poddałam oczyszczaniu za pomocą chromatografii kolumnowej (kolejno układ **g** i **e**) i ponownie krystalizowałam z AcOEt i eteru naftowego. Otrzymałam 4 mg Tyr(acPh) (0,01 mmola, W = 10 %, t_R = 57,15 min - układ A).

Tożsamość związku potwierdziłam za pomocą widma mas:

✓ Tyr(acPh) (Rysunek 43) (m/z = 417,80 [$M + Na$]⁺, M = 395,40 g/mol) (**I**)

oraz widma 1H NMR zmierzonego w $CDCl_3$:

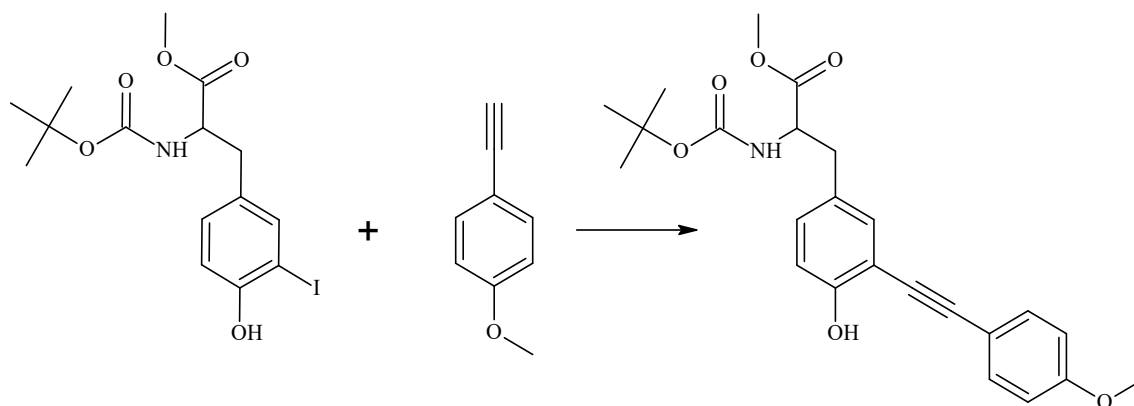
δ (ppm): 1,44 (s, 9H, C²²H, C²⁷H, C²⁸H), 3,18 - 3,31 (m, 2H, C¹⁶H), 3,74 - 3,77 (d, 3H,



C²⁵H, J = 15 Hz), 4,64 - 4,66 (m, 1H, C¹⁷H), 5,01 - 5,05 (m, 1H, N¹⁸H), 6,99 (s, 1H, O⁷H), 7,05 - 7,07 (d, 1H, C⁵H, J = 10 Hz), 7,13 - 7,14 (d, 1H, C⁶H, J = 5 Hz), 7,36 (s, 1H, C³H), 7,43 - 7,44 (m, 2H, C¹²H, C¹⁴H), 7,45 - 7,52 (m, 1H, C¹³H), 7,86 - 7,88 (d, 1H, C¹¹H, J = 10 Hz), 8,13 - 8,15 (d, 1H, C¹⁵H, J = 10 Hz).

Rysunek 43. Struktura Tyr(acPh) z numeracją atomów.

2.3.2. Synteza Tyr(acPh-4-OMe)



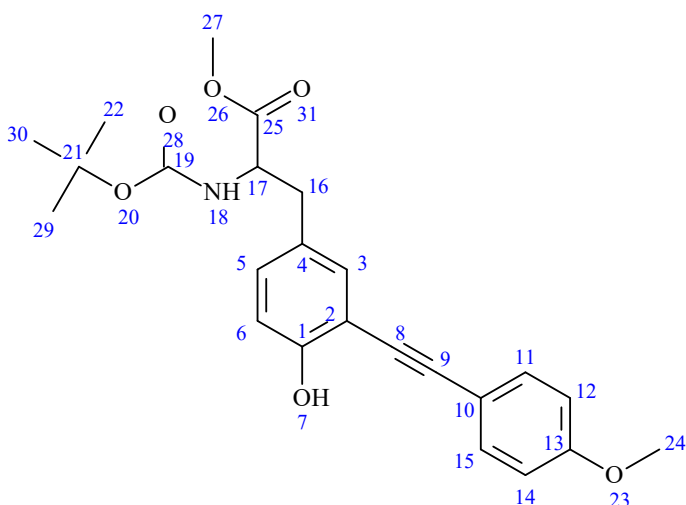
Rysunek 44. Schemat syntezy Tyr(acPh-4-OMe).

Do syntezy Tyr(acPh-4-OMe) użyłam 109 mg (0,26 mmola) BocTyrOMeI oraz 122 mg (0,92 mmola) acPh-4-OMe, a reakcję prowadziłam zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 2.3. Otrzymany związek oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej (kolejno układ **c** i **b**). Ze względu na niewystarczającą czystość osad poddałam krystalizacji z mieszaniny rozpuszczalników: MeOH : H₂O. Otrzymałam 10,3 mg Tyr(acPh-4-OMe) (0,024 mmola, W = 9 %, t_R = 56,31 min - układ A).

Tożsamość związku potwierdziłam za pomocą widma mas:

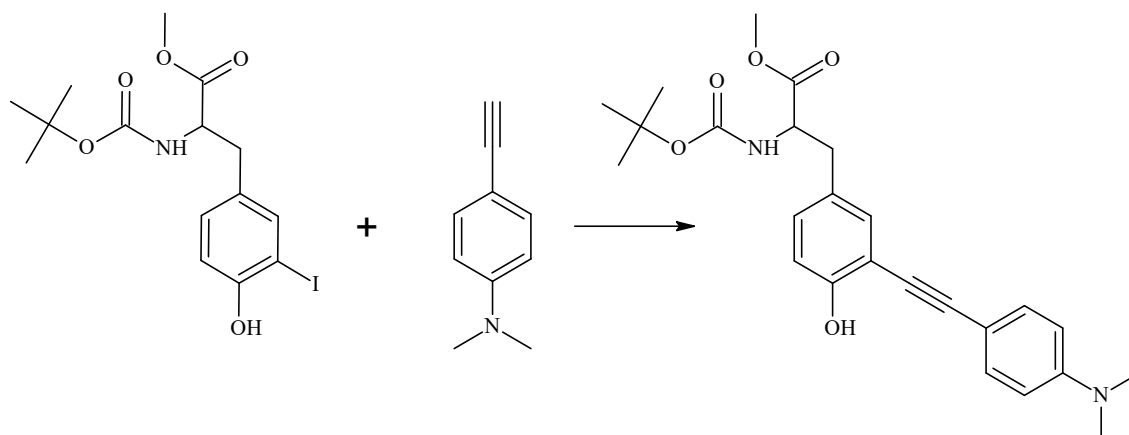
✓ Tyr(acPh-4-OMe) (Rysunek 45) (m/z = 448,10, [M + Na]⁺, M = 425,50 g/mol) (**I**) oraz widma ¹H NMR zmierzonego w CDCl₃:

δ (ppm): 1,43 (s, 9H, C²²H, C²⁹H, C³⁰H), 3,15 - 3,27 (m, 2H, C¹⁶H), 3,73 (s, 3H, C²⁷H), 3,87 (s, 3H, C²⁴H), 4,60 - 4,62 (m, 1H, C¹⁷H), 4,98 - 5,02 (m, 1H, N¹⁸H), 6,83 (s, 1H, O⁷H), 6,96 - 6,98 (d, 1H, C⁵H, J = 10 Hz), 7,00 - 7,02 (d, 1H, C⁶H, J = 10 Hz), 7,06 - 7,08 (d, 1H, C¹⁴H, J = 10 Hz), 7,30 (s, 1H, C³H), 7,38 - 7,41 (d, 1H, C¹²H, J = 15 Hz), 7,77 - 7,79 (d, 1H, C¹¹H, J = 10 Hz), 8,04 - 8,06 (d, 1H, C¹⁵H, J = 10 Hz).



Rysunek 45. Struktura Tyr(acPh-4-OMe) z numeracją atomów.

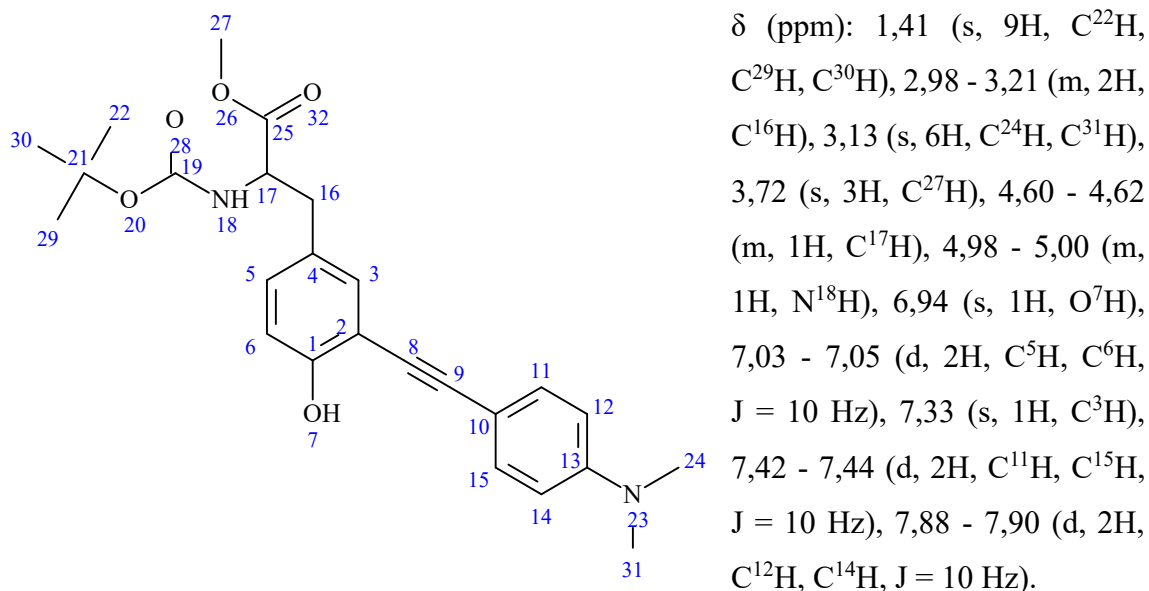
2.3.3. Synteza Tyr(acDMA)



Rysunek 46. Schemat syntezy Tyr(acDMA).

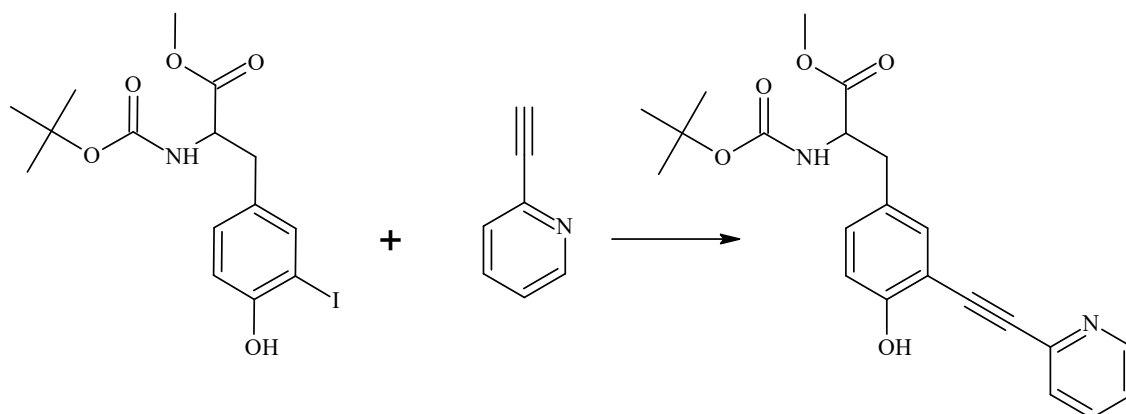
Do kolby wprowadziłam 167 mg (0,4 mmola) BocTyrOMeI oraz 185 mg (1,3 mmola) acDMA, a reakcję prowadziłam zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 2.3. Związek oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej (układ c). Otrzymany osad ze względu na niewystarczającą czystość poddałam krystalizacji z gorącego AcOEt. Otrzymałam 29,7 mg Tyr(acDMA) (0,068mmola, W = 17 %, t_R = 60,43 min - układ C). Tożsamość związku potwierdziłam za pomocą widma mas:

✓ Tyr(acDMA) (Rysunek 47) (m/z = 461,30, $[M + Na]^+$, M = 438,50 g/mol) (I) oraz widma 1H NMR zmierzonego w $CDCl_3$:



Rysunek 47. Struktura Tyr(acDMA) z numeracją atomów.

2.3.4. Synteza Tyr(acPir)



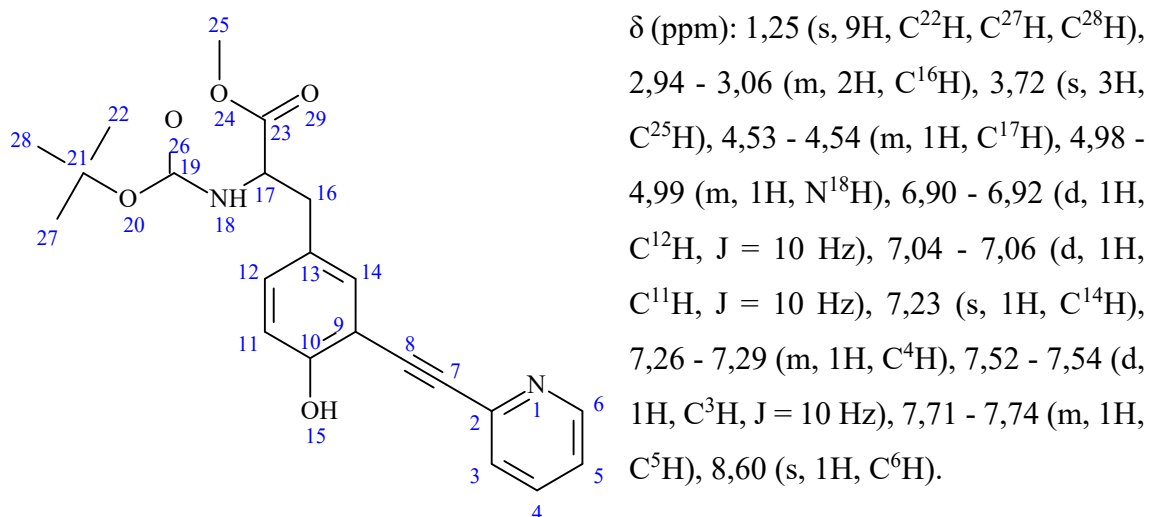
Rysunek 48. Schemat syntezy Tyr(acPir).

Do kolby wprowadziłam 167 mg (0,4 mmola) BocTyrOMeI oraz 181 μ l (1,8 mmola) acPir, a reakcję prowadziłam zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 2.3. Związek oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej (układ c). Otrzymałam 1 mg Tyr(acPir) (0,0025 mmola, W < 1 %, t_R = 35,57 min - układ C).

Tożsamość związku potwierdziłam za pomocą widma mas:

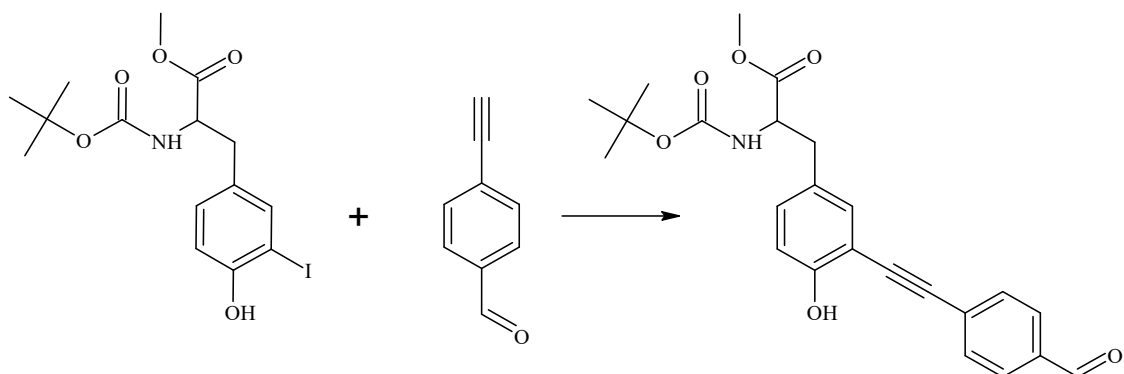
✓ Tyr(acPir) (Rysunek 49) (m/z = 394,80, $[M - H]^-$, M = 396,40 g/mol) (I)

oraz widma ^1H NMR zmierzonego w CDCl_3 :



Rysunek 49. Struktura Tyr(acPir) z numeracją atomów.

2.3.5. Synteza Tyr(acPh-4-CHO)



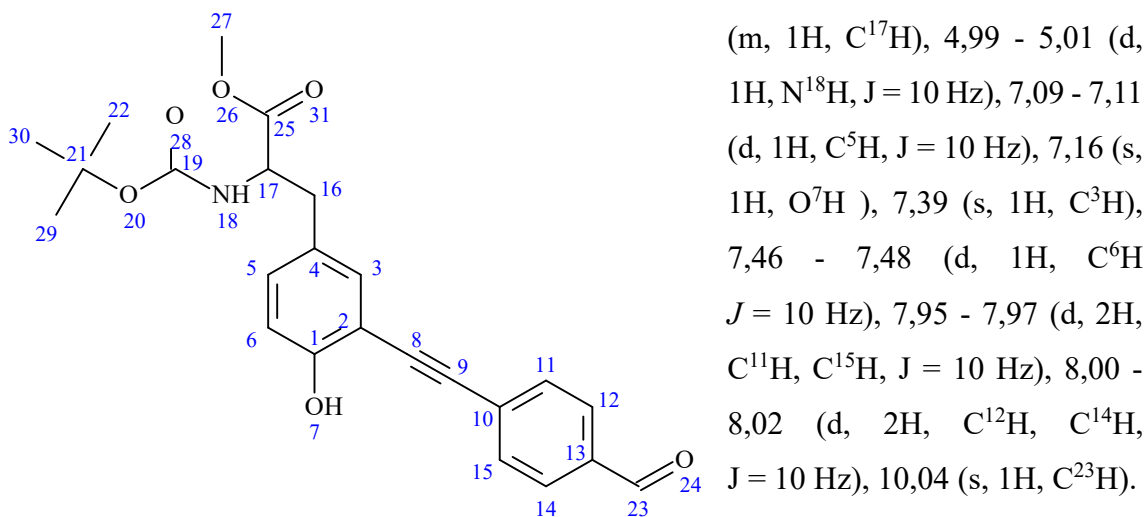
Rysunek 50. Schemat syntezy Tyr(acPh-4-CHO).

Do kolby wprowadziłam 171 mg (0,4 mmola) BocTyrOMeI oraz 163 mg (1,2 mmola) acPh-4-CHO, a reakcję prowadziłam zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 2.3. Związek oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej (układ c). Otrzymany osad ze względu na niewystarczającą czystość poddałam krystalizacji z mieszaniny AcOEt i eteru naftowego. Otrzymałam 33,9 mg Tyr(acPh-4-CHO) (0,08 mmola, W = 20 %, $t_R = 53,49$ min - układ A).

Tożsamość związku potwierdziłam za pomocą widma mas:

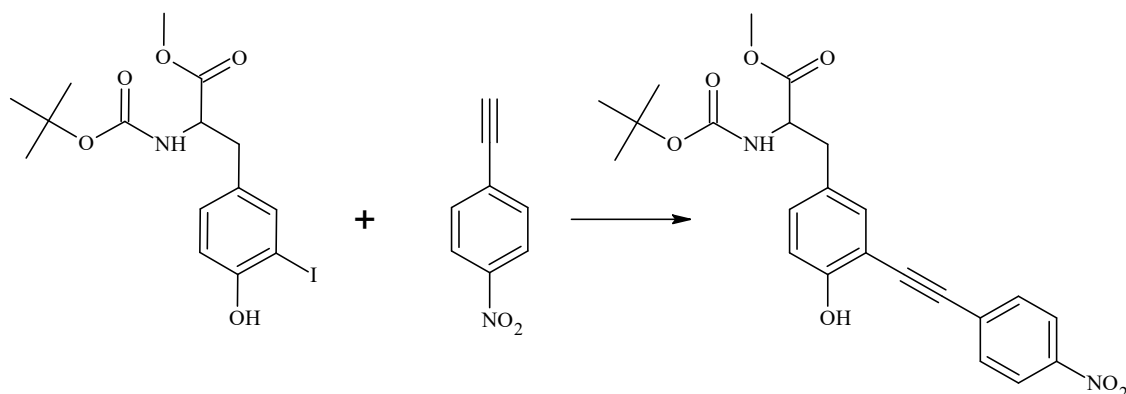
✓ Tyr(acPh-4-CHO) (Rysunek 51) ($m/z = 446,30$, $[M + Na]^+$, $M = 423,40$ g/mol) (I) oraz widma 1H NMR zmierzonego w $CDCl_3$:

δ (ppm): 1,42 (s, 9H, $C^{22}H$, $C^{29}H$, $C^{30}H$), 3,21 (m, 2H, $C^{16}H$), 3,73 (s, 3H, $C^{27}H$), 4,62



Rysunek 51. Struktura Tyr(acPh-4-CHO) z numeracją atomów.

2.3.6. Synteza Tyr(acPh-4-NO₂)

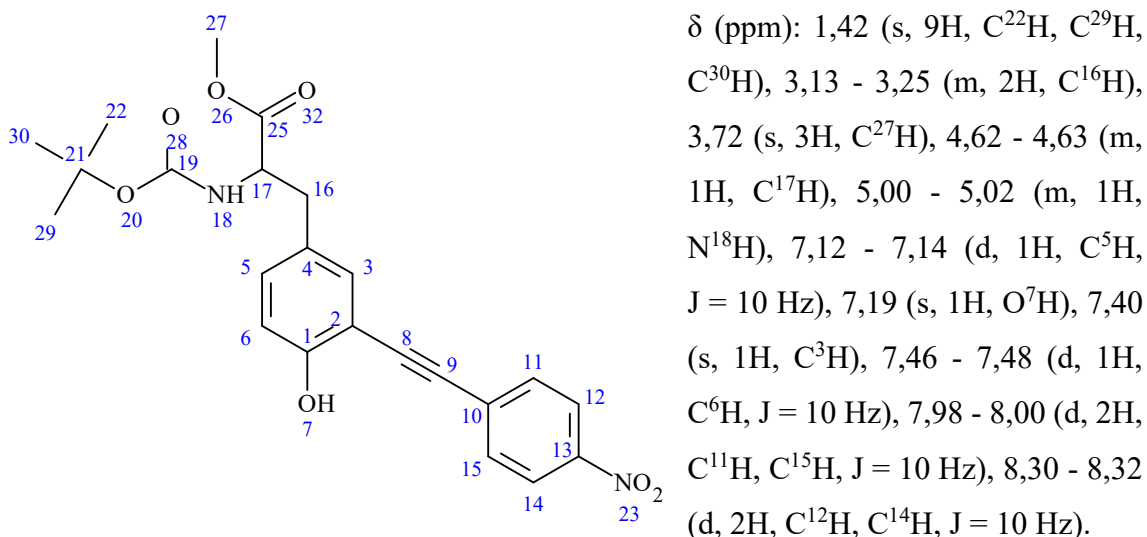


Rysunek 52. Schemat syntezy Tyr(acPh-4-NO₂).

Do kolby wprowadziłam 168 mg (0,4 mmola) BocTyrOMeI oraz 118 mg (0,8 mmola) acPh-4-NO₂, a reakcję prowadziłam zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 2.3. Związek oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej (kolejno układ **e** i **d**). Otrzymany osad ze względu na niewystarczającą czystość poddałam krystalizacji z mieszaniny AcOEt i eteru naftowego. Otrzymałam 4,2 mg Tyr(acPh-4-NO₂) (0,0095mmola, W = 2 %, t_R = 57,12 min - układ A).

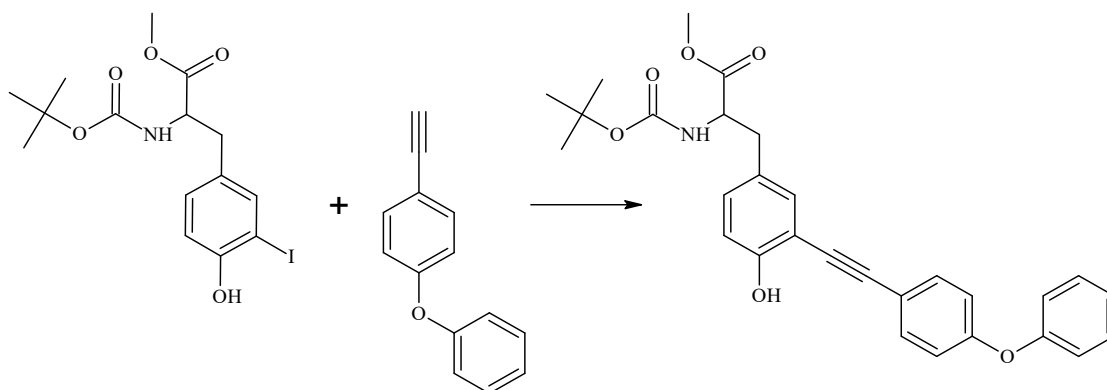
Tożsamość związku potwierdziłam za pomocą widma mas:

✓ Tyr(acPh-4- NO₂) (Rysunek 53) (m/z = 463,30, [M + H]⁺, M = 440,45 g/mol) (**I**) oraz widma ¹H NMR zmierzonego w CDCl₃:



Rysunek 53. Struktura Tyr(acPh-4-NO₂) z numeracją atomów.

2.3.7. Synteza Tyr(acPh-O-Ph)



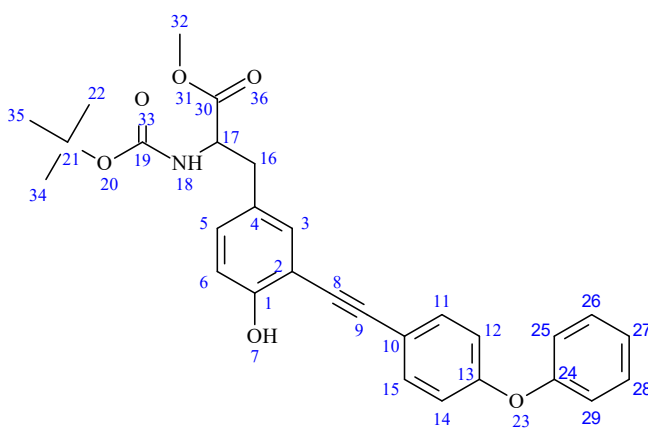
Rysunek 54. Schemat syntezy Tyr(acPh-O-Ph).

Do kolby wprowadziłam 171 mg (0,4 mmola) BocTyrOMeI oraz 150 μ l (0,8 mmola) acPh-O-Ph, a reakcję prowadziłam zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 2.3. Po 24 h do mieszaniny reakcyjnej wprowadziłam dodatkowo 75 μ l (0,4 mmole) acPh-O-Ph. Związek oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej (układ c). Otrzymany osad ze względu na niewystarczającą czystość poddałam krystalizacji z mieszaniny AcOEt i eteru naftowego, a następnie z mieszaniny chloroformu i eteru naftowego. Otrzymałam 73,3 mg Tyr(acPh-O-Ph) (0,15 mmola, W = 38 %, t_R = 63,63 min - układ A).

Tożsamość związku potwierdziłam za pomocą widma mas:

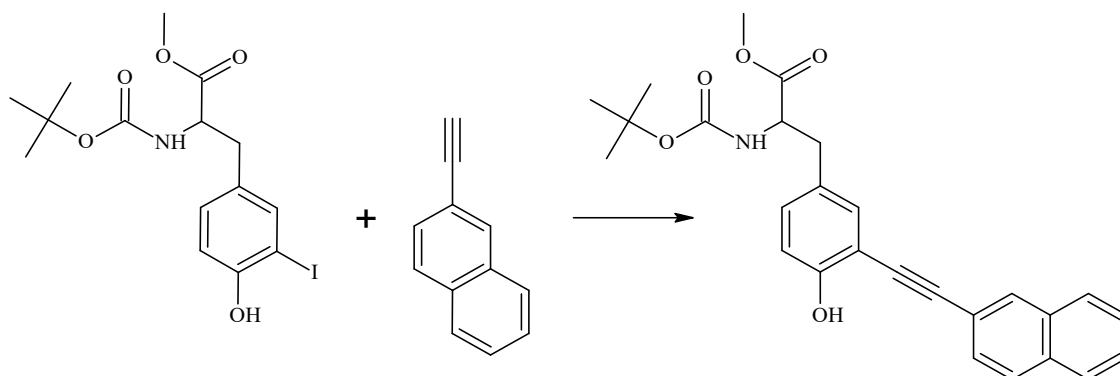
✓ Tyr(acPh-O-Ph) (Rysunek 55) (m/z = 510,20, $[M + Na]^+$, M = 487,55 g/mol) (I) oraz widma 1H NMR zmierzonego w $CDCl_3$:

δ (ppm): 1,59 (s, 9H, $C^{22}H$, $C^{34}H$, $C^{35}H$), 3,22 (m, 2H, $C^{16}H$), 3,77 (s, 3H, $C^{32}H$), 4,64 (m, 1H, $C^{17}H$), 5,03 (m, 1H, $N^{18}H$), 6,91 (s, 1H, C^3H), 7,03 - 7,05 (d, 1H, C^5H , J = 10 Hz), 7,08 - 7,12 (m, 3H, $C^{27}H$, $C^{26}H$, $C^{28}H$), 7,13 (m, 1H, C^6H), 7,20 (m, 1H, $C^{29}H$), 7,34 (s, 1H, O^7H), 7,43 (m, 3H, $C^{11}H$, $C^{15}H$, $C^{25}H$), 7,82 - 7,84 (d, 1H, $C^{12}H$, J = 10 Hz), 8,09 - 8,11 (d, 1H, $C^{14}H$, J = 10 Hz).



Rysunek 55. Struktura Tyr(acPh-O-Ph) z numeracją atomów.

2.3.8. Tyr(ac-2-Naft)

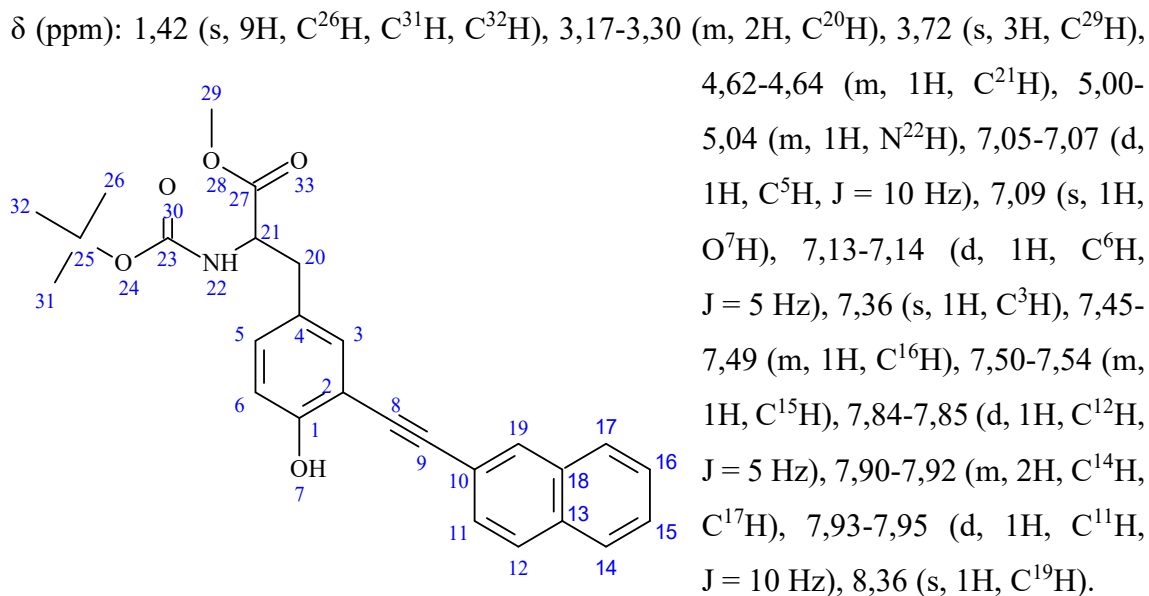


Rysunek 56. Schemat syntezy Tyr(ac-2-Naft).

Do kolby wprowadziłam 168 mg (0,4 mmola) BocTyrOMeI oraz 182 mg (1,2 mmola) ac-2-Naft, a reakcję prowadziłam zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 2.3. Związek oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej (układ e). Otrzymany osad ze względu na niewystarczającą czystość poddałam krystalizacji z mieszaniny AcOEt i eteru naftowego. Otrzymałam 6,57 mg Tyr(ac-2-Naft) (0,015mmola, W = 4 %, t_R = 62,70 min - układ A).

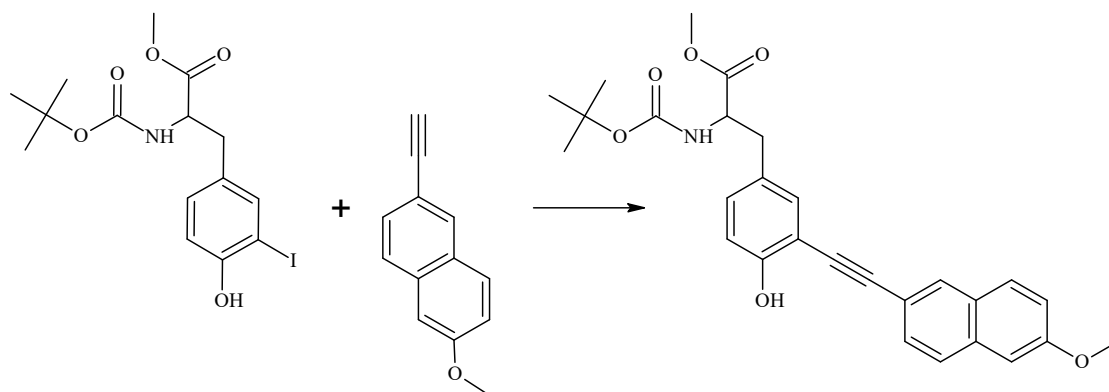
Tożsamość związku potwierdziłam za pomocą widma mas:

✓ Tyr(ac-2-Naft) (Rysunek 57) (m/z = 468,00, $[M + Na]^+$, M = 445,51 g/mol) (I) oraz widma 1H NMR zmierzonego w $CDCl_3$:



Rysunek 57. Struktura Tyr(ac-2-Naft) z numeracją atomów.

2.3.9. Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)



Rysunek 58. Schemat syntezy Tyr(ac-2-Naft-6-OMe).

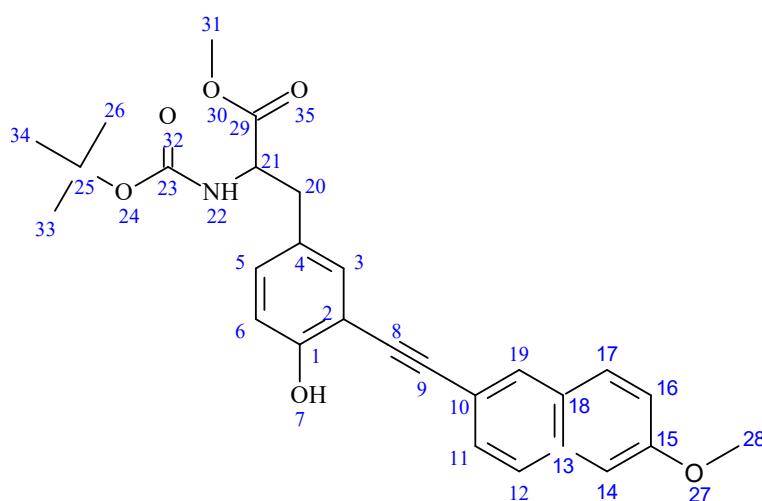
Do kolby wprowadziłam 84 mg (0,2 mmola) BocTyrOMeI oraz 75 mg (0,4 mmola) ac-2-Naft-6-OMe, a reakcję prowadziłam zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 2.3. Związek oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej (kolejno układ **d** i **c**). Otrzymany osad ze względu na niewystarczającą czystość poddałam krystalizacji z mieszaniny AcOEt i eteru naftowego. Otrzymałam 36,1 mg Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) (0,08 mmola, W = 40 %, t_R = 8,31 min - układ B).

Tożsamość związku potwierdziłam za pomocą widma mas:

✓ Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) (Rysunek 59) (m/z = 497,90, $[M + Na]^+$, M = 475,53 g/mol) (**I**)

oraz widma 1H NMR zmierzonego w $CDCl_3$:

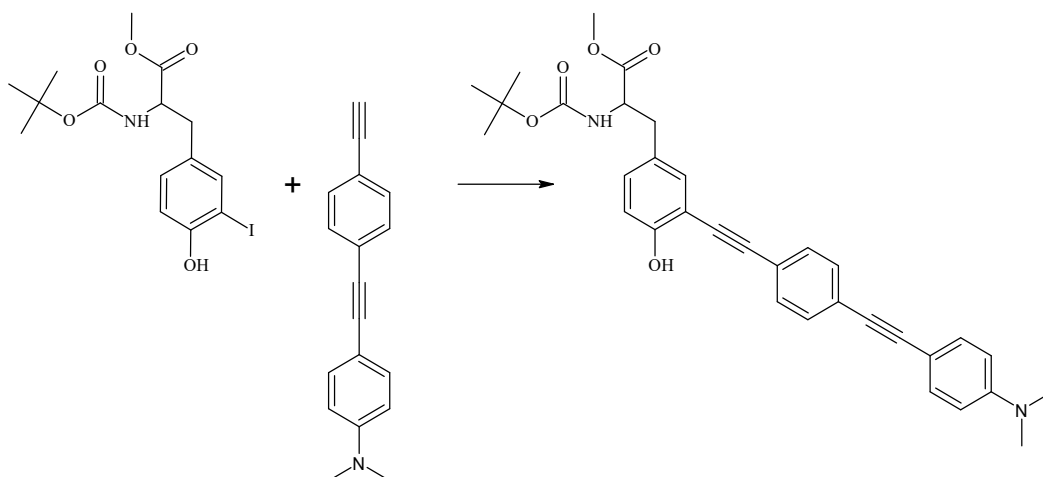
δ (ppm): 1,45 (s, 9H, $C^{26}H$, $C^{33}H$, $C^{34}H$); 3,19 - 3,32 (m, 2H, $C^{20}H$), 3,75 (s, 3H, $C^{31}H$),



3,97 (s, 3H, $C^{28}H$), 4,64 - 4,67 (m, 1H, $C^{21}H$), 5,01 - 5,06 (m, 1H, $N^{22}H$), 7,05 (s, 1H, C^5H), 7,15 (s, 1H, C^3H), 7,21 (s, 1H, $C^{19}H$), 7,37 (s, 1H, C^6H), 7,48 - 7,49 (d, 1H, $C^{17}H$, J = 5 Hz), 7,81-7,91 (m, 3H, $C^{11}H$, $C^{12}H$, $C^{16}H$), 8,25 (s, 1H, $C^{14}H$).

Rysunek 59. Struktura Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) z numeracją atomów.

2.3.10. Tyr(acPhacDMA)



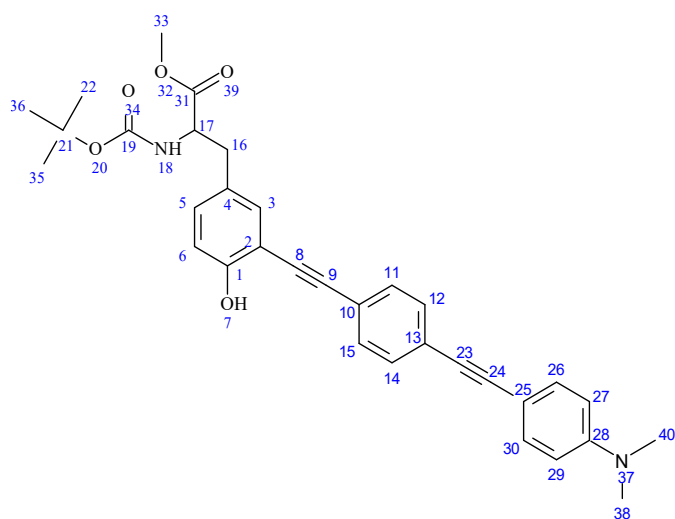
Rysunek 60. Schemat syntezy Tyr(acPhacDMA).

Do kolby wprowadziłam 176 mg (0,4 mmola) BocTyrOMeI oraz 107 mg (0,4 mmola) acPhacDMA, a reakcję prowadziłam zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 2.3. Związek oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej (układ c). Otrzymany osad ze względu na niewystarczającą czystość poddałam krystalizacji z mieszaniny chloroformu i eteru naftowego. Otrzymałam 3,53 mg Tyr(acPhacDMA) (0,0065 mmola, W = 2 %, t_R = 17,53 min - układ D).

Tożsamość związku potwierdziłam za pomocą widma mas:

✓ Tyr(acPhacDMA) (Rysunek 61) (m/z = 561,30, $[M + Na]^+$, M = 538,63 g/mol) (I) oraz widma 1H NMR zmierzonego w $CDCl_3$:

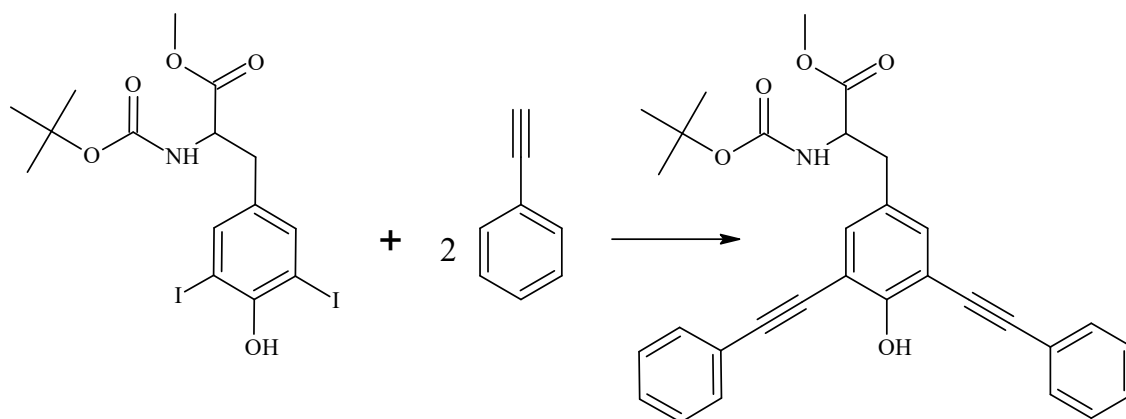
δ (ppm): 1,42 (s, 9H, $C^{22}H$, $C^{35}H$, $C^{36}H$), 3,11 (s, 6H, $C^{38}H$, $C^{40}H$), 3,16 - 3,20 (m, 2H,



$C^{16}H$), 3,72 (s, 3H, $C^{33}H$), 4,60 - 4,62 (m, 1H, $C^{17}H$), 4,99 - 5,01 (m, 1H, $N^{18}H$), 7,01 (s, 1H, O^7H), 7,04 - 7,06 (d, 2H, C^5H , C^6H , J = 10 Hz), 7,34 (s, 1H, C^3H), 7,43 - 7,45 (d, 2H, $C^{26}H$, $C^{30}H$, J = 10 Hz), 7,58 - 7,60 (d, 4H, $C^{11}H$, $C^{12}H$, $C^{14}H$, $C^{15}H$, J = 10 Hz), 7,82 - 7,84 (d, 2H, $C^{27}H$, $C^{29}H$, J = 10 Hz).

Rysunek 61. Struktura Tyr(acPhacDMA) z numeracją atomów.

2.3.11. Tyr(acPh)₂



Rysunek 62. Schemat syntezy Tyr(acPh)₂.

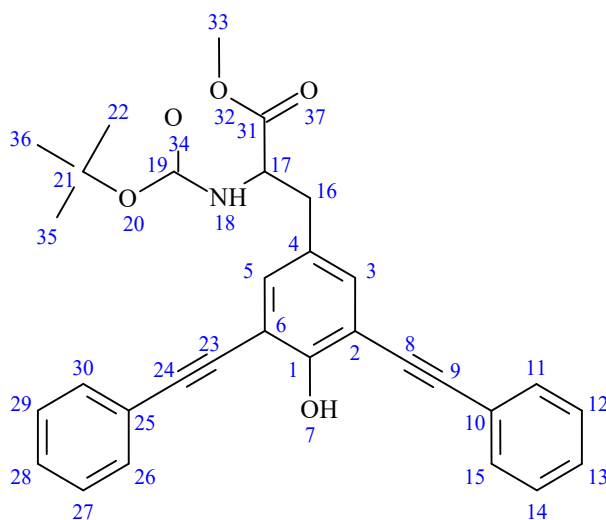
Związek Tyr(acPh)₂ został otrzymany i opisany w pracy licencjackiej przez mgr Julię Wtulich.¹⁷¹

Tożsamość związku potwierdzono za pomocą widma mas:

✓ Tyr(acPh)₂ (Rysunek 63) ($m/z = 518,20$, $[M + Na]^+$, $M = 495,20$ g/mol) (**I**)

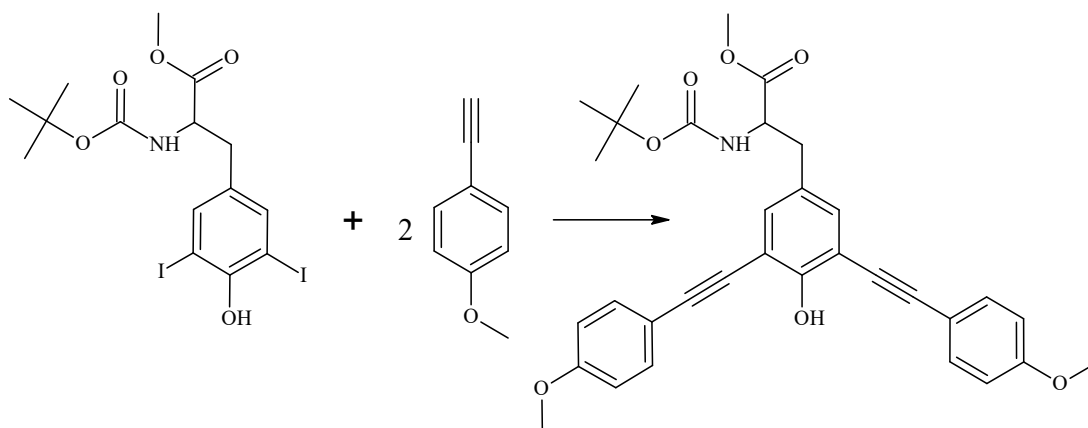
oraz widma ¹H NMR zmierzonego w CDCl₃:

δ (ppm): 1,43 (s, 9H, C²²H, C³⁵H, C³⁶H); 3,24-3,12 (m, 2H, C¹⁶H); 3,74 (s, 3H, C³³H); 4,62-4,61 (d, 1H, C¹⁷H, $J = 5$ Hz); 5,03-5,02 (d, 1H, N¹⁸H, $J = 5$ Hz); 7,00 (s, 1H, O⁷H); 7,23 (s, 1H, C³H); 7,33 (s, 1H, C⁵H); 7,43-7,36 (m, 4H, C²⁹H, C²⁷H, C¹⁴H, C¹²H); 7,48-7,45 (t, 2H, C²⁸H, C¹³H); 7,66-7,64 (m, 2H, C²⁶H, C¹⁵H); 7,92-7,90 (m, 2H, C³⁰H, C¹¹H).



Rysunek 63. Struktura Tyr(acPh)₂ z numeracją atomów.

2.3.12. Tyr(acPh-4-OMe)₂



Rysunek 64. Schemat syntezy Tyr(acPh-4-OMe)₂.

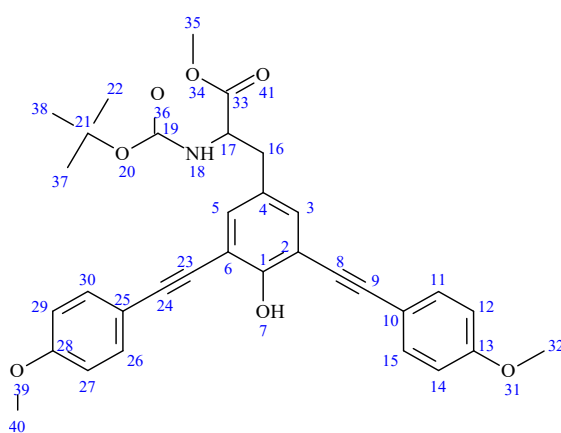
Do kolby wprowadziłam 139 mg (0,25 mmola) BocTyrOMeI₂ oraz 140 mg (1,1 mmola) acPh-4-OMe, a reakcję prowadziłam zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 2.3. Związek oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej (układ **d**). Otrzymany osad ze względu na niewystarczającą czystość poddałam krystalizacji z mieszaniny rozpuszczalników AcOEt i eter naftowy. Ze względu na brak postępów w krystalizacji zmieniłam warunki krystalizacji na MeOH i eter dietylowy. Otrzymałam 19,4 mg Tyr(acPh-4-OMe)₂ (0,035 mmola, W = 14 %, t_R = 9,47 min - układ B).

Tożsamość związku potwierdziłam za pomocą widma mas:

✓ Tyr(acPh-4-OMe)₂ (Rysunek 65) (m/z = 578,40, [M + Na]⁺, M = 555,62 g/mol)
(I)

oraz widma ¹H NMR zmierzonego w CDCl₃:

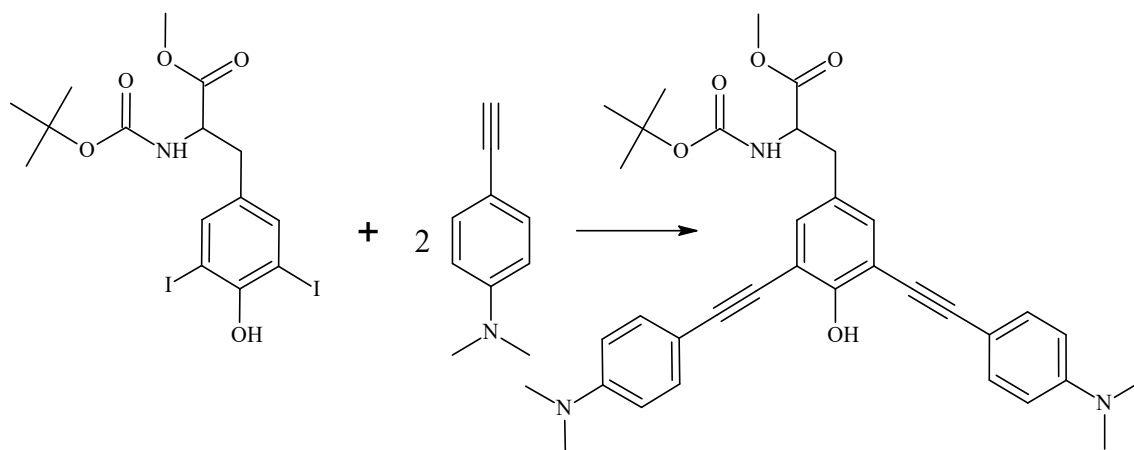
δ (ppm): 1,44 (s, 9H, C²²H, C³⁷H, C³⁸H), 3,14 - 3,27 (m, 2H, C¹⁶H), 3,75 (s, 3H, C³⁵H),



3,86 (s, 3H, C³²H), 3,88 (s, 3H, C⁴⁰H), 4,61 - 4,62 (m, 1H, C¹⁷H), 5,03 - 5,05 (m, 1H, N¹⁸H), 6,92 - 6,94 (d, 2H, C¹¹H, C³⁰H, J = 10 Hz), 7,00 (s, 1H, C³H), 7,02 - 7,04 (d, 2H, C¹⁵H, C²⁶H, J = 10 Hz), 7,57 (s, 1H, C⁵H), 7,55 - 7,57 (d, 2H, C¹²H, C²⁹H, J = 10 Hz), 8,10 - 8,12 (d, 2H, C¹⁴H, C²⁷H, J = 10 Hz).

Rysunek 65. Struktura Tyr(acPh-4-OMe)₂ z numeracją atomów.

2.3.13. Tyr(acDMA)₂

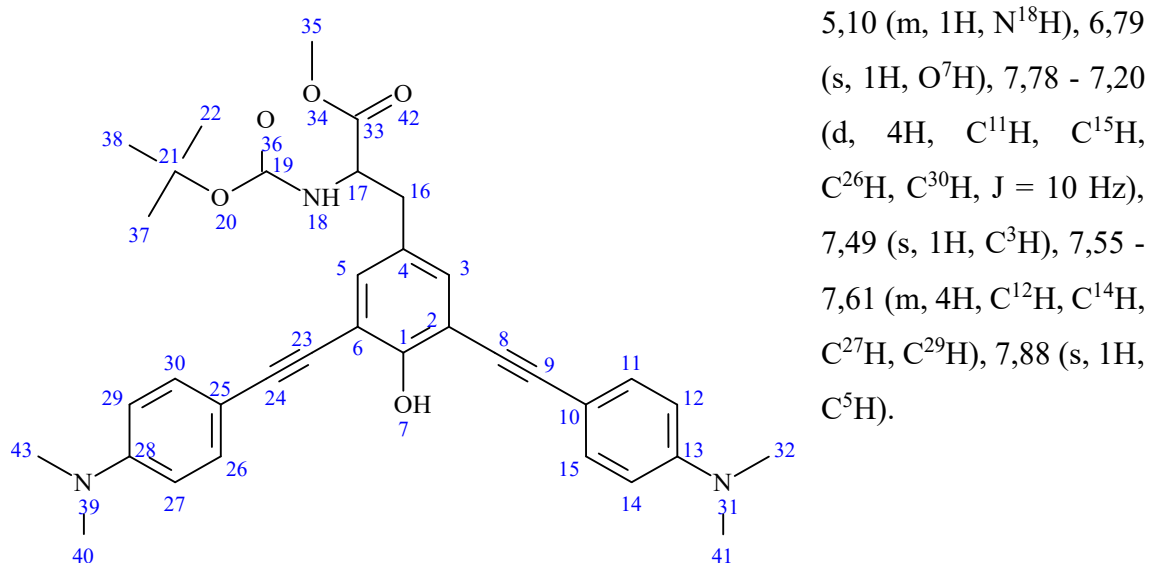


Rysunek 66. Schemat syntezy Tyr(acDMA)₂.

Do kolby wprowadziłam 111 mg (0,2 mmola) BocTyrOMeI₂ oraz 120 mg (0,8 mmola) acDMA, a reakcję prowadziłam zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 2.3. Po 24 h do mieszaniny reakcyjnej wprowadziłam dodatkowo 61 mg (0,4 mmol) acDMA. Związek oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej (kolejno układ **d**, **c**, **b**). Otrzymałam 38,2 mg Tyr(acDMA)₂ (0,066 mmola, W = 33 %, t_R = 54,74 min - układ C). Tożsamość związku potwierdziłam za pomocą widma mas:

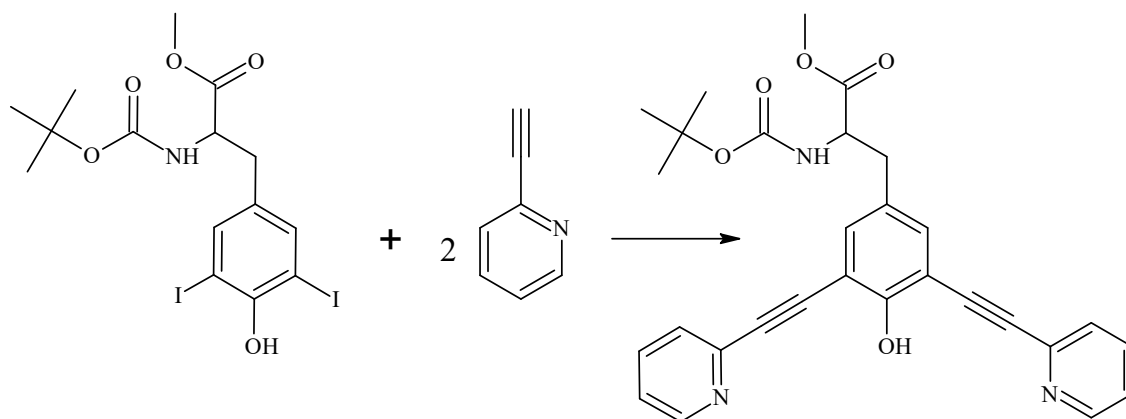
✓ Tyr(acDMA)₂ (Rysunek 67) (m/z = 604,90, [M + Na]⁺, M = 581,70 g/mol) (I) oraz widma ¹H NMR zmierzonego w CDCl₃:

δ (ppm): 1,35 - 1,46 (s, 9H, C²²H, C³⁷H, C³⁸H), 3,09 - 3,12 (m, 12H, C³²H, C⁴⁰H, C⁴¹H, C⁴³H), 3,71 (s, 3H, C³⁵H), 4,42 - 4,64 (m, 2H, C¹⁶H), 4,89 - 4,91 (m, 1H, C¹⁷H), 5,03 -



Rysunek 67. Struktura Tyr(acDMA)₂ z numeracją atomów.

2.3.14. Tyr(acPir)₂



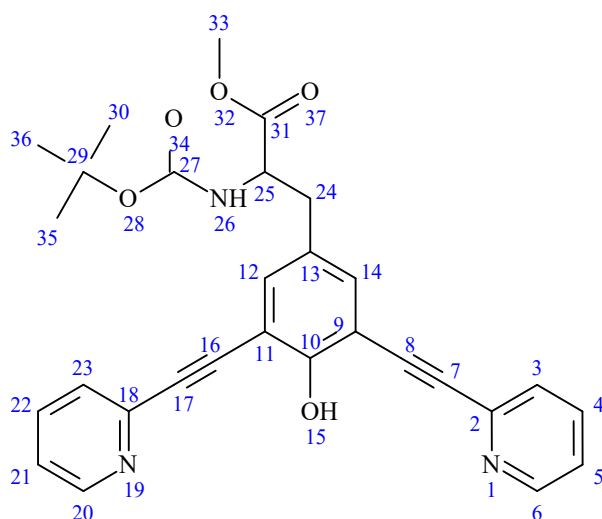
Rysunek 68. Schemat syntezy Tyr(acPir)₂.

Do kolby wprowadziłam 110 mg (0,2 mmola) BocTyrOMeI₂ oraz 80 µl (0,8 mmola) acPir, a reakcję prowadziłam zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 2.3. Po 24 h do mieszaniny reakcyjnej wprowadziłam dodatkowo 40 µl (0,4 mmola) acPir. Związek oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej (kolejno układ **a**, **i**). Otrzymałam 6,4 mg Tyr(acPir)₂ (0,013 mmola, W = 7 %, t_R = 6,64 min - układ D).

Tożsamość związku potwierdziłam za pomocą widma mas:

✓ Tyr(acPir)₂ (Rysunek 69) (m/z = 519,90, [M + Na]⁺, M = 497,54 g/mol) (I)

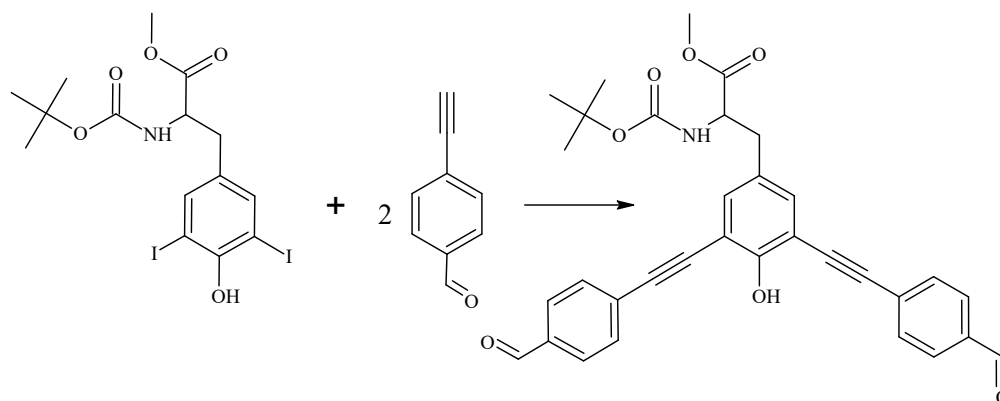
oraz widma ¹H NMR zmierzonego w CDCl₃:



δ (ppm): 1,26 (s, 9H, C³⁰H, C³⁵H, C³⁶H), 3,14 - 3,27 (m, 2H, C²⁴H), 3,75 (s, 3H, C³³H), 4,62 - 4,64 (m, 1H, C²⁵H), 5,05 - 5,06 (m, 1H, N²⁶H), 7,37 - 7,43 (m, 4H, C⁴H, C⁵H, C²¹H, C²²H), 7,51 (s, 1H, C¹²H), 7,71 - 7,73 (d, 1H, C³H, J = 10 Hz), 7,85 (s, 1H, C¹⁴H), 7,87 - 8,03 (m, 1H, C²³H), 8,72 - 8,73 (d, 2H, C⁶H, C²⁰H, J = 5 Hz).

Rysunek 69. Struktura Tyr(acPir)₂ z numeracją atomów.

2.3.15. Tyr(acPh-4-CHO)₂



Rysunek 70. Schemat syntezy Tyr(acPh-4-CHO)₂.

Związek Tyr(acPh-4-CHO)₂ został otrzymany i opisany w pracy magisterskiej przez mgr Weronikę Zauchę.¹⁷²

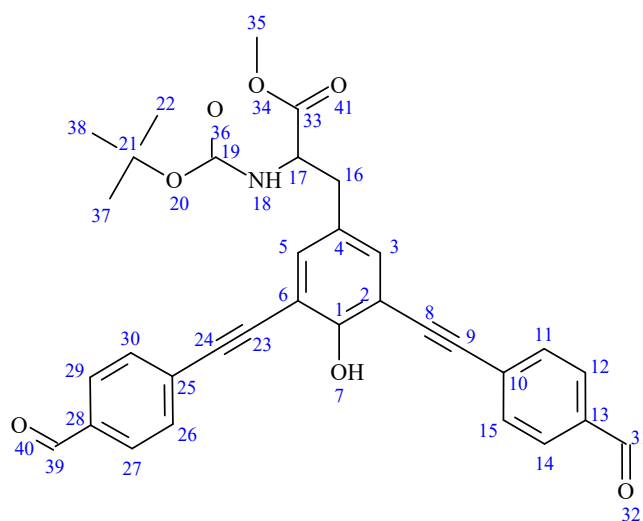
Tożsamość związku potwierdzono za pomocą widma mas:

✓ Tyr(acPh-4-CHO)₂ (Rysunek 71) ($m/z = 574,20$, $[M + Na]^+$, $M = 551,19$ g/mol)

(I)

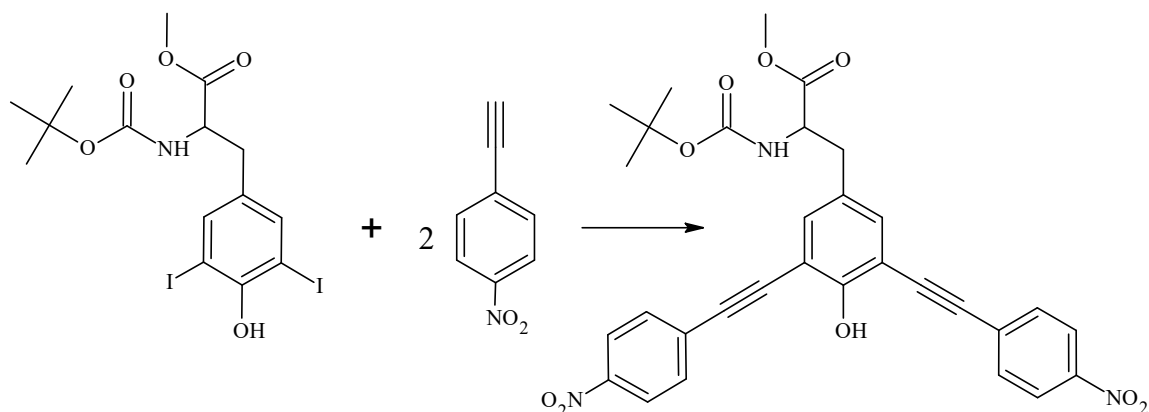
oraz widma ¹H NMR zmierzonego w CDCl₃:

δ (ppm): 1,44 (s, 9H, C²²H, C³⁷H, C³⁸H), 3,19 (m, 2H, C¹⁶H), 3,75 (s, 3H, C³⁵H), 4,64 (m, 1H, C¹⁷H), 5,07 (m, 1H, N¹⁸H), 7,20 (s, 1H, O⁷H), 7,32 (s, 1H, C³H), 7,42 (s, 1H, C⁵H), 7,81 (d, 1H, C²⁹H, $J = 7,25$ Hz), 7,95 (d, 2H, C¹⁵H, C²⁶H, $J = 8,4$ Hz), 8,00 (d, 2H, C¹¹H, C³⁰H, $J = 8,45$ Hz), 8,04 (d, 1H, C²⁷H, $J = 8,4$ Hz), 8,08 (d, 1H, C¹²H, $J = 9,65$ Hz), 8,35 (d, 1H, C¹⁴H, $J = 9,65$ Hz), 10,07 (m, 2H, C³¹H, C³⁹H).



Rysunek 71. Struktura Tyr(acPh-4-CHO)₂ z numeracją atomów.

2.3.16. Tyr(acPh-4-NO₂)₂



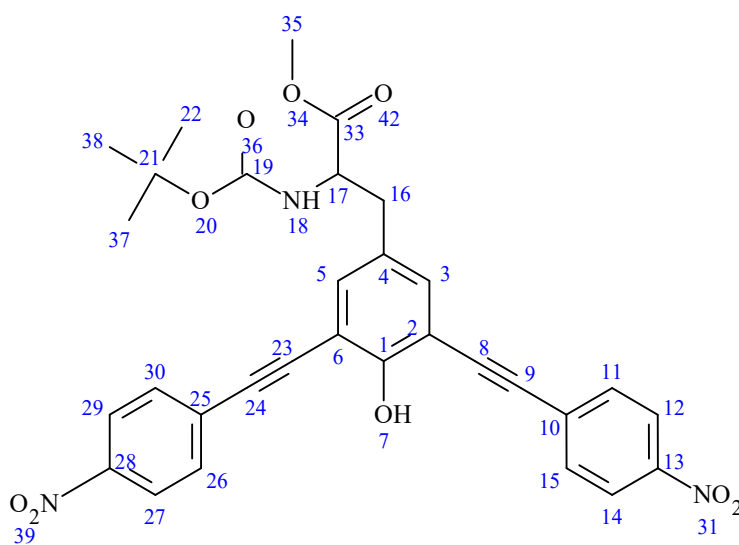
Rysunek 72. Schemat syntezy Tyr(acPh-4-NO₂)₂.

Do kolby wprowadziłam 171 mg (0,3 mmola) BocTyrOMeI₂ oraz 176 mg (1,2 mmola) acPh-4-NO₂, a reakcję prowadziłam zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 2.3. Związek oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej (układ e). Otrzymany osad ze względu na niewystarczającą czystość poddałam krystalizacji z mieszaniny rozpuszczalników: chloroform : eter naftowy. Otrzymałam 14,2 mg Tyr(acPh-4-NO₂)₂ (0,024 mmola, W = 8 %, t_R = 64,64 min - układ A).

Tożsamość związku potwierdziłam za pomocą widma mas:

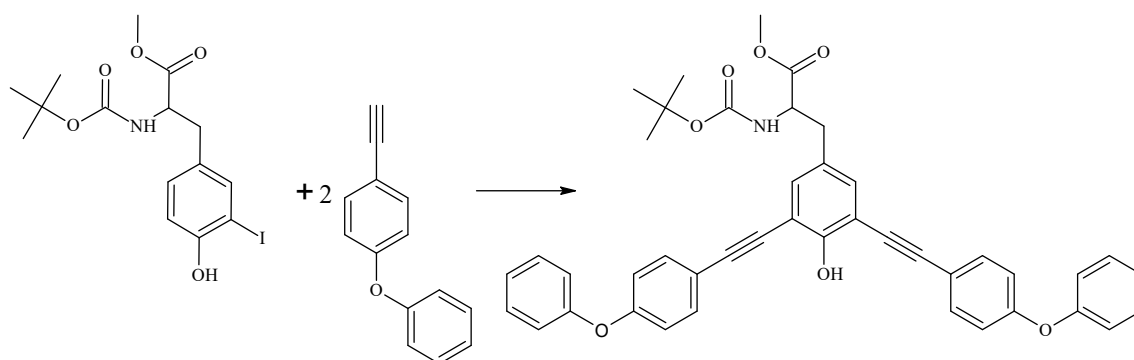
✓ Tyr(acPh-4-NO₂)₂ (Rysunek 73) (m/z = 608,20, [M + Na]⁺, M = 585,56 g/mol) (I) oraz widma ¹H NMR zmierzonego w CDCl₃:

δ (ppm): 1,43 (s, 9H, C²²H, C³⁷H, C³⁸H), 3,15 - 3,29 (m, 2H, C¹⁶H), 3,75 (s, 3H, C³⁵H), 4,63 - 4,64 (m, 1H, C¹⁷H), 5,06 - 5,07 (m, 1H, C¹⁸H), 7,23 (s, 1H, O⁷H), 7,35 (s, 1H, C³H), 7,46 (s, 1H, C⁵H), 7,78 - 7,79 (d, 2H, C¹¹H, C³⁰H, J = 10 Hz), 8,04 - 8,06 (d, 2H, C¹⁵H, C²⁶H, J = 10 Hz), 8,29 - 8,31 (d, 2H, C¹²H, C²⁹H, J = 10 Hz), 8,34 - 8,36 (d, 2H, C¹⁴H, C²⁷H, J = 10 Hz).



Rysunek 73. Struktura Tyr(acPh-4-NO₂)₂ z numeracją atomów.

2.3.17. Tyr(acPh-O-Ph)₂



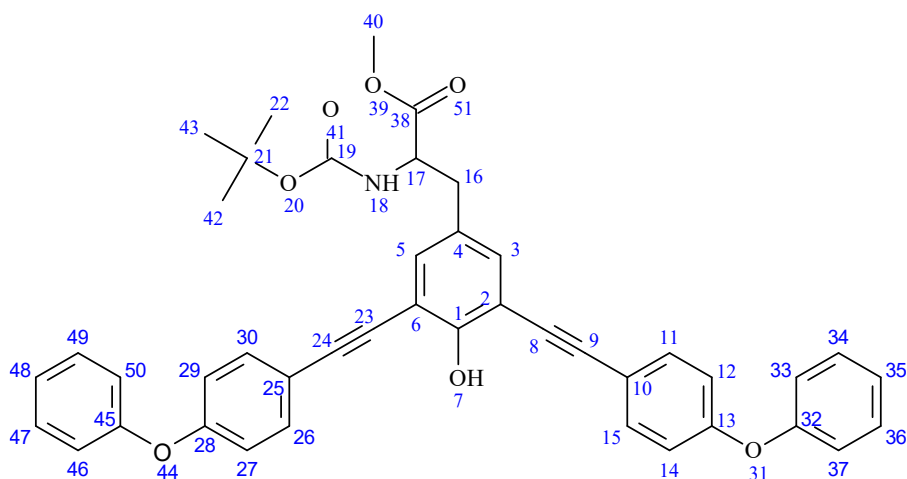
Rysunek 74. Schemat syntezy Tyr(acPh-O-Ph)₂.

Związek Tyr(acPh-O-Ph)₂ został otrzymany i opisany w pracy magisterskiej przez mgr Weronikę Zauchę.¹⁷²

Tożsamość związku potwierdzono za pomocą widma mas:

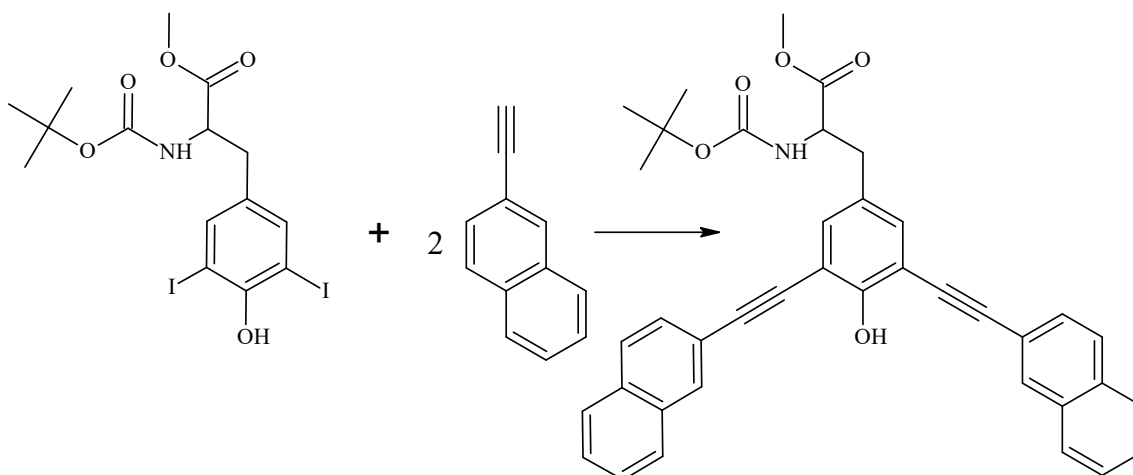
✓ Tyr(acPh-O-Ph)₂ (Rysunek 75) ($m/z = 702,50$, $[M + Na]^+$, $M = 679,26$ g/mol) (I) oraz widma ¹H NMR zmierzonego w CDCl₃:

δ (ppm): 1,42 (s, 9H, C²²H, C⁴²H, C⁴³H), 3,20 (m, 2H, C⁸H), 3,69 (s, 3H, C⁴⁰H), 4,59 (m, 1H, C¹⁷H), 5,00 (m, 1H, N¹⁸H), 6,64 (m, 2H, C³⁴H, C⁴⁹H), 6,70 (m, 2H, C³⁶H, C⁴⁷H), 6,76 (m, 1H, C³H), 7,00 (m, 1H, C⁵H), 7,07 (m, 4H, C¹²H, C¹⁴H, C²⁷H, C²⁹H), 7,17 (m, 2H, C³⁵H, C⁴⁸H), 7,24 (m, 2H, C¹¹H, C³⁰H), 7,37 (m, 4H, C³³H, C³⁷H, C⁴⁶H, C⁵⁰H), 7,93 (d, 2H, C²⁶H, C³⁰H, $J = 11,6$ Hz).



Rysunek 75. Struktura Tyr(acPh-O-Ph)₂ z numeracją atomów.

2.3.18. Tyr(ac-2-Naft)₂

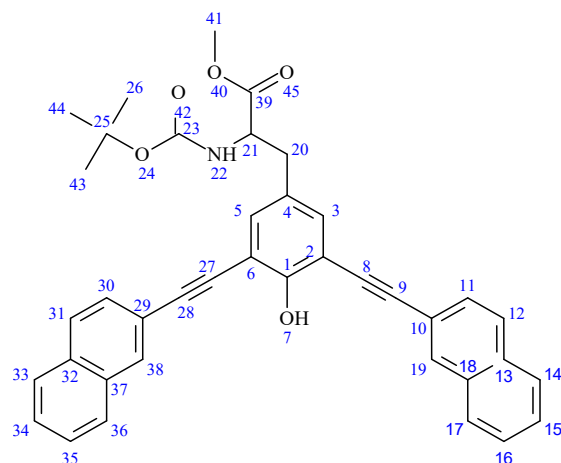


Rysunek 76. Schemat syntezy Tyr(ac-2-Naft)₂.

Do kolby wprowadziłam 138 mg (0,2 mmola) BocTyrOMeI₂ oraz 230 mg (1,5 mmola) ac-2-Naft, a reakcję prowadziłam zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 2.3. Związek oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej (kolejno układ **h**, **g**). Otrzymany osad ze względu na niewystarczającą czystość poddałam krystalizacji z mieszaniny rozpuszczalników AcOEt i eter naftowy. Ze względu na brak postępów w krystalizacji związek ponownie poddałam oczyszczaniu za pomocą chromatografii kolumnowej (kolejno układ **g**, **e**) i ponownie krystalizowałam z AcOEt i eteru naftowego. Otrzymałam 60,1 mg Tyr(ac-2-Naft)₂ (0,1 mmola, W = 50 %, t_R = 22,30 min - układ B). Tożsamość związku potwierdziłam za pomocą widma mas:

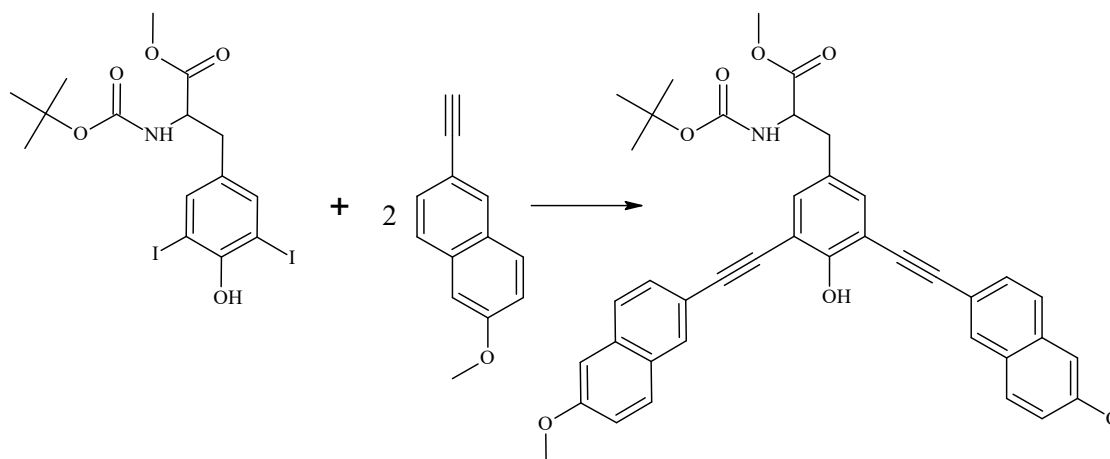
✓ Tyr(ac-2-Naft)₂ (Rysunek 77) (m/z = 618,30, [M + Na]⁺, M = 595,60 g/mol) (**I**) oraz widma ¹H NMR zmierzonego w CDCl₃:

δ (ppm): 1,48 (s, 9H, C²⁶H, C⁴³H, C⁴⁴H), 3,20 - 3,36 (m, 2H, C²⁰H), 3,80 (s, 3H, C⁴¹H), 4,67 - 4,69 (m, 1H, C²¹H), 5,11 - 5,12 (m, 1H, N²²H), 7,39 (s, 2H, C³H, C⁵H), 7,57 - 7,56 (m, 4H, C¹²H, C¹⁴H, C³¹H, C³³H), 7,72 - 7,74 (d, 1H, C³⁶H), 7,90 - 7,92 (m, 4H, C¹⁵H, C¹⁶H, C³⁴H, C³⁵H), 7,99 - 8,01 (d, 2H, C¹¹H, C³⁰H), 8,21 (s, 1H, C³⁸H), 8,32 - 8,34 (d, 1H, C¹⁷H), 8,71 (s, 1H, C¹⁹H).



Rysunek 77. Struktura Tyr(ac-2-Naft)₂ z numeracją atomów.

2.3.19. Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂



Rysunek 78. Schemat syntezy Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂.

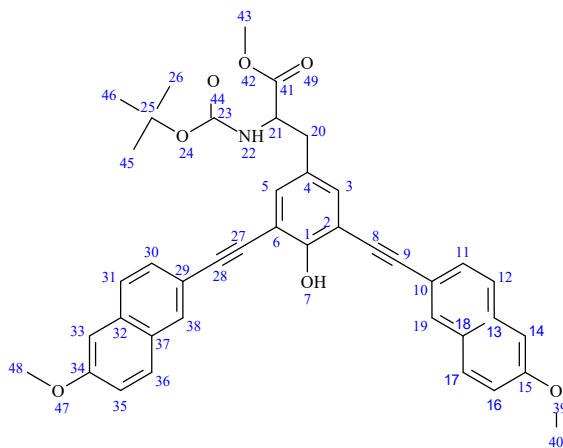
Do kolby wprowadziłam 114 mg (0,2 mmola) BocTyrOMeI₂ oraz 151 (0,8 mmola) ac-2-Naft-6-OMe, a reakcję prowadziłam zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 2.3. Po 24 h do mieszaniny reakcyjnej dodałam 75,8 mg (0,4 mmole) ac-2-Naft-6-OMe. Związek oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej (układ **d**). Otrzymany osad ze względu na niewystarczającą czystość poddałam krystalizacji z mieszaniny rozpuszczalników AcOEt i eter naftowy. Otrzymałam 45,4 mg Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂ (0,068 mmola, W = 34 %, t_R = 21,54 min - układ B).

Tożsamość związku potwierdziłam za pomocą widma mas:

✓ Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂ (Rysunek 79) (m/z = 678,00, [M + Na]⁺, M = 655,70 g/mol) (**I**)

oraz widma ¹H NMR zmierzonego w CDCl₃:

δ (ppm): 1,46 (s, 9H, C²⁶H, C⁴⁵H, C⁴⁶H), 3,16-3,28 (m, 2H, C²⁰H), 3,78 (s, 3H, C⁴³H), 3,98 (s, 6H, C⁴⁰H, C⁴⁸H), 4,65-4,67 (d, 1H, C²¹H, J = 10 Hz), 5,06-5,08 (d, 1H, N²²H, J = 10 Hz), 7,08 (s, 1H, C⁵H), 7,19 (s, 2H, C¹⁹H, C³⁸H), 7,20-7,23 (m, 2H, C¹²H, C³¹H), 7,36 (s, 1H, C³H), 7,70-7,78 (d, 1H, C¹⁷H), 7,79-7,85 (m, 3H, C¹¹H, C³⁰H, C³⁵H), 7,87 - 7,89 (d, 1H, C³⁶H), 7,95-7,97 (d, 1H, C¹⁶H), 8,15 (s, 1H, C¹⁴H), 8,39 (s, 1H, C³³H).



Rysunek 79. Struktura Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂ z numeracją atomów.

3. Właściwości spektroskopowe

Dla 18 z otrzymanych analogów aminokwasów niebiałkowych z fragmentem tyrozyny wyznaczyłam właściwości spektroskopowe, takie jak: zakres widm absorpcji oraz emisji, maksima absorpcji i emisji, molowe współczynniki absorpcji, przesunięcia Stokesa, wydajności kwantowe fluorescencji, jasności świecenia oraz czasy zaniku fluorescencji. Parametry te dla wszystkich badanych związków analizowałam w czterech rozpuszczalnikach charakteryzujących się zróżnicowaną polarnością oraz zdolnością do tworzenia wiązań wodorowych. W eksperymentach wykorzystałam rozpuszczalnik niepolarny (CX), polarny aprotyczny (MeCN), polarny protyczny (MeOH) oraz bufor PBS mimikujący warunki fizjologiczne, do którego dodałam 25 % DMSO, aby poprawić rozpuszczalność związków. Zastosowanie tak dobranego modelowego zestawu środowisk rozpuszczalnikowych umożliwiło ocenę wpływu właściwości otoczenia na parametry spektroskopowe i fotofizyczne badanych układów.

Stężenia próbek do pomiarów oszacowałam w oparciu o prawo Lamberta - Beera:

$$A = \varepsilon \times l \times c$$

gdzie: A - absorbancja ($A = 1$), ε - molowy współczynnik absorpcji (założona wartość $\varepsilon = 20000 \left[\frac{\text{dm}^3}{\text{mol} \times \text{cm}} \right]$), l - grubość warstwy absorbującej ($l = 1 \text{ cm}$), C - stężenie molowe $\left[\frac{\text{mol}}{\text{dm}^3} \right]$.

Stężenia próbek, dla których rejestrowałam widma absorpcyjne, były rzędu od 10^{-5} do $10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{dm}^3}$. Po zmierzeniu widm roztworów o znanym stężeniu wyznaczyłam molowy współczynnik ekstynkcji dla wybranych długości fal. Stężenie próbek do rejestracji widm emisji dobierałam tak, aby ich absorbancja wynosiła ok. 0,1, co pozwalało ograniczyć wygaszanie stężeniowe, w tym efekt filtra wewnętrznego I i II rzędu.

Wydajności kwantowe fluorescencji wyznaczyłam metodą porównawczą wykorzystując zależność:

$$QY_z = QY_w \times \frac{\int I_z(\lambda) d\lambda \times (1 - 10^{-A_w}) n_z^2}{\int I_w(\lambda) d\lambda \times (1 - 10^{-A_z}) n_w^2}$$

gdzie: $I(\lambda)$ - widmo emisji badanego związku (z) lub wzorca (w), zmierzone przy tej samej długości fali wzbudzenia oraz szerokości spektralnej wiązki w torze obserwacyjnym i wzbudzającym, A - absorbancja badanego związku (z) lub wzorca (w), która została

zmierzona dla długości fali wzbudzenia, n - współczynnik załamania światła rozpuszczalnika, w którym rozpuszczono badany związek (z) lub wzorec (w), QY - wydajność kwantowa fluorescencji związku (z) lub wzorca (w);

Podczas wyznaczania wydajności kwantowych fluorescencji metodą porównawczą jako wzorce zastosowałam:

- roztwór siarczanu chininy w 0,5 M H_2SO_4 ($QY = 0,55$)¹
- roztwór 2-aminopirydyny w 0,1 M H_2SO_4 ($QY = 0,60$)¹
- roztwór fluoresceiny w 0,1 M NaOH ($QY = 0,92$).¹⁷³

Czasy zaniku fluorescencji wyznaczyłam z wykorzystaniem oprogramowania FluoFit firmy PicoQuant oraz w oparciu o zależność:

$$I(t) = \int_{-\infty}^t IRF(t') \sum_{i=1}^n A_i e^{-\frac{t-t'}{\tau_i}} dt'$$

gdzie: $I(t)$ - zarejestrowany sygnał fluorescencji w czasie t , $IRF(t')$ - funkcja odpowiedzi aparatu pomiarowego, A_i - udział i -tego składnika w zaniku fluorescencji, τ_i [ns] - czas zaniku fluorescencji dla i -tego składnika, t' - zmienna całkowania, n - liczba składników i .

Jakość dopasowania oceniłam przede wszystkim na podstawie wartości zredukowanej sumy kwadratów odchyłeń χ^2 , a następnie na podstawie analizy rozkładu residuali przedstawianych przez oprogramowanie FluoFit. Za satysfakcjonujące uznawałam dopasowania charakteryzujące się wartościami χ^2 zbliżonymi do jedności oraz symetrycznym rozkładem residuali wokół zera. Ostateczny model wybierałam jako najprostsz model zapewniający poprawny opis eksperymentalnych krzywych zaniku fluorescencji.

3.1. Właściwości spektralne pochodnych asymetrycznych

Zakres widm absorpcyjnych asymetrycznych analogów aminokwasów niebiałkowych z fragmentem tyrozyny zawierających wiązanie potrójne jest różnorodny i wyraźnie zależy od rodzaju podstawnika (Rysunek 80, Rysunek 81). W niektórych przypadkach obserwuje się także zależność położenia widma od charakteru rozpuszczalnika. Najbardziej krótkofalowe widma posiada związek zawierający najprostsz podstawnik aromatyczny - fenyl (Rysunek 80: A). Wprowadzanie

dotatkowych podstawników o charakterze donorowym lub akceptorowym do pierścienia aromatycznego oraz powiększanie podstawnika o kolejny pierścień powoduje długofalowe przesunięcie widm absorpcyjnych. Najbardziej długofalową absorpcją, uwzględniając wszystkie rozpuszczalniki, charakteryzuje się pochodna Tyr(acPh-4-NO₂) (Rysunek 80: F, Rysunek 81). W przypadku pochodnych, których widma absorpcyjne są wrażliwe na charakter rozpuszczalnika widoczna jest tendencja do batochromowego przesuwania się widm wraz ze wzrostem polarności rozpuszczalnika. Wyjątek stanowi pochodna Tyr(acPhacDMA) (Rysunek 80: K), dla której widmo absorpcyjne zarejestrowane w rozpuszczalniku niepolarnym pokrywa się z widmem zarejestrowanym w rozpuszczalniku polarnym - MeCN, a w pozostałych rozpuszczalnikach intensywne pasma są przesunięte krótkofalowo. We wszystkich przypadkach najbardziej długofalową absorpcję obserwuje się w rozpuszczalniku PBS (Rysunek 80).

Maksima widm absorpcji pochodnych asymetrycznych mieszczą się w przedziale od 304 nm (dla pochodnej Tyr(acPh); widma zmierzone w MeCN oraz MeOH) do 380 nm (dla pochodnej Tyr(acPh-O-Ph); widmo zmierzone w PBS) (Rysunek 80: A, H; Tabela 2). Analizując maksima absorpcji związek podstawiony grupą fenyłową nie wykazuje istotnej zależności widm absorpcji od charakteru zastosowanego rozpuszczalnika, co jest spójne z analizą prezentowanego zakresu widma absorpcji (Rysunek 80: A).

W przypadku pochodnych podstawionych anizolem, benzaldehydem czy nitrobenzenem także nie obserwuje się znaczących przesunięć maksimum absorpcji. Związki te charakteryzują się niewielką zmianą w położeniu maksimum, co widoczne jest zwłaszcza w rozpuszczalniku naśladującym środowisko fizjologiczne (PBS) (Tabela 2). Z kolei obecność podstawnika dimetyloanilinowego w łańcuchu bocznym tyrozyny powoduje hipsochromowe przesunięcie maksimum widma absorpcji w rozpuszczalniku najbardziej polarnym spośród analizowanych (Rysunek 80: B; Tabela 2). Jest to tendencja przeciwna do tej wyznaczonej przez analizę długofalowej krawędzi widm absorpcyjnych.

Związek z podstawnikiem fenoksybenzylovym charakteryzuje się znaczącym batochromowym przesunięciem maksimum widma absorpcji zmierzonego w PBS względem widm zmierzonych w MeCN, MeOH czy CX (Rysunek 80: G, H; Tabela 2). Tendencja ta jest zgodna z analizą położenia długofalowej krawędzi widm. Długofalowy ogon absorpcji, obserwowany najwyraźniej dla pochodnych Tyr(acPh-4-OMe) i Tyr(acPh-O-Ph) w PBS, wskazuje na powstawanie prawdopodobnie dimerów, asocjatów, kompleksów lub mieszaniny konformerów (które, jak wykazano w dalszych

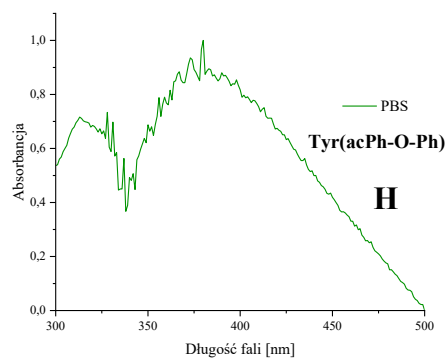
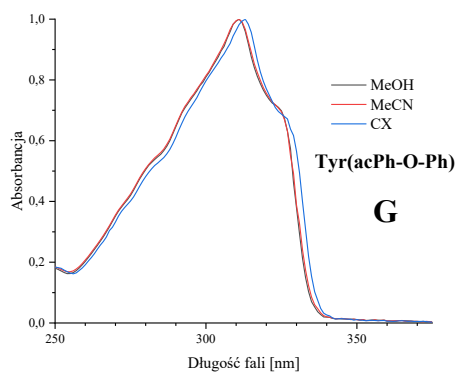
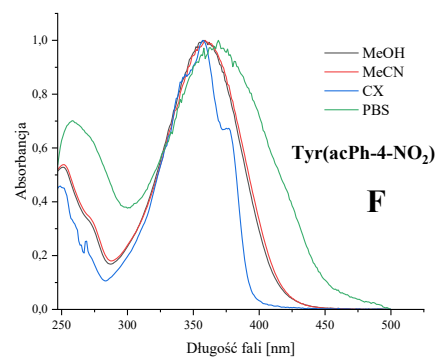
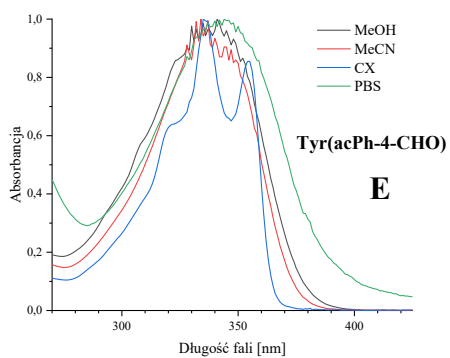
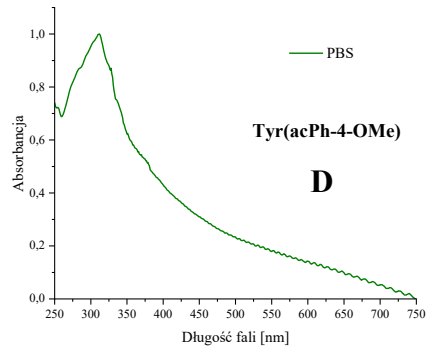
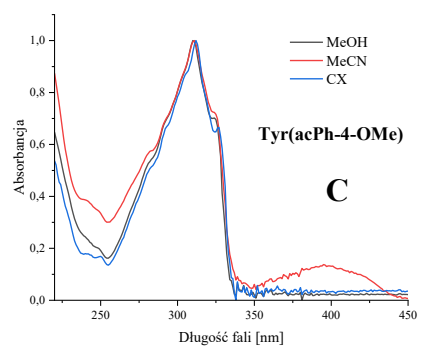
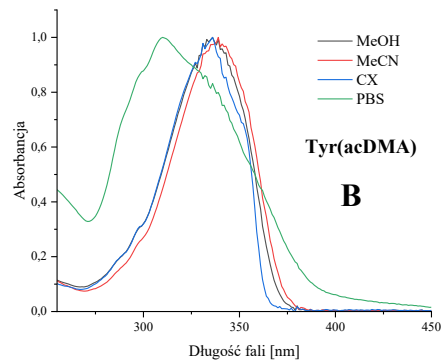
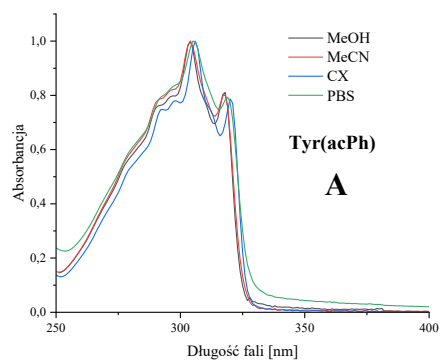
badaniach, nie wykazują fluorescencji lub są nietrwałe w stanie wzbudzonym) (Rysunek 80: D, H).

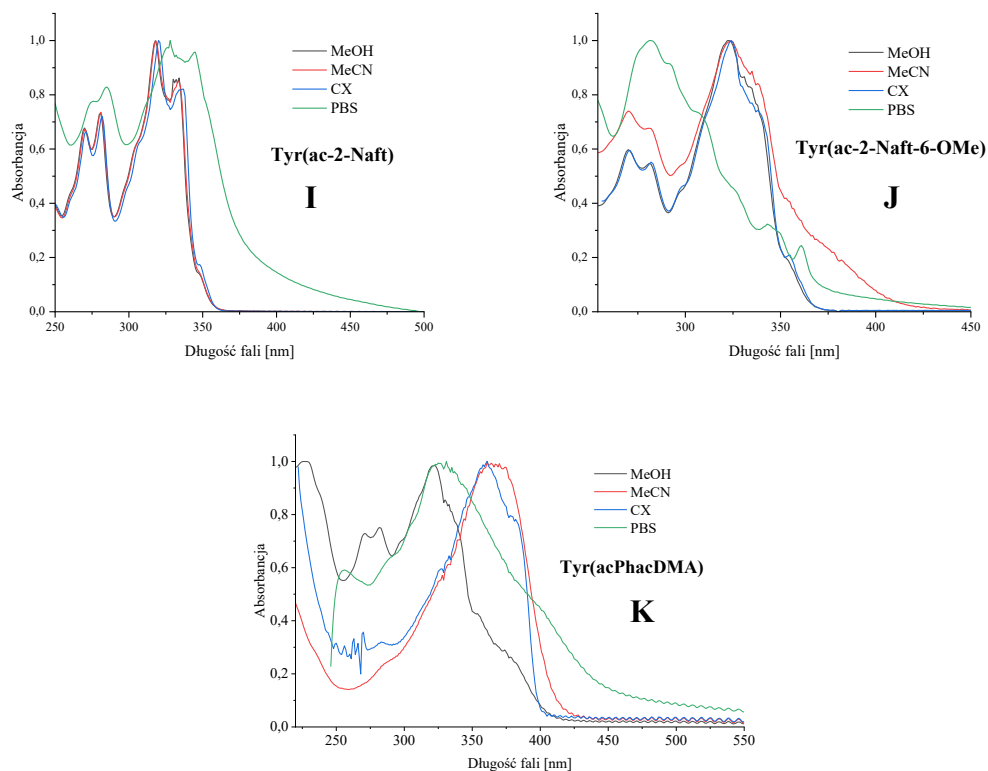
Związki z podstawnikiem naftyłowym i metoksynaftyłowym wyróżniają się dwoma pasmami absorpcji. Uwzględniając maksima absorpcji tych pochodnych wyraźną zmianę ich położenia obserwuje się tylko w przypadku rozpuszczalnika PBS, przy czym dla pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) maksimum położone jest najbardziej krótkofalowo, a dla pochodnej Tyr(ac-2-Naft) najbardziej długofalowo w porównaniu do maksimów wyznaczonych w pozostałych rozpuszczalnikach (Rysunek 80: I, J; Tabela 2). Obserwowane w polarnym aprotycznym rozpuszczalniku dodatkowe pasmo absorpcji pochodnej Tyr(acPh-4-OMe) można przypisać przejściu o charakterze przeniesienia ładunku, które nie znajduje bezpośredniego odzwierciedlenia w widmach emisji, co wskazuje na jego nieemisyjny charakter (Rysunek 80: C).

W przypadku pochodnej Tyr(acPhacDMA) zauważalne jest przesuwanie się maksimum absorpcji w kierunku krótszych fal w MeOH i PBS (Rysunek 80: K; Tabela 2).

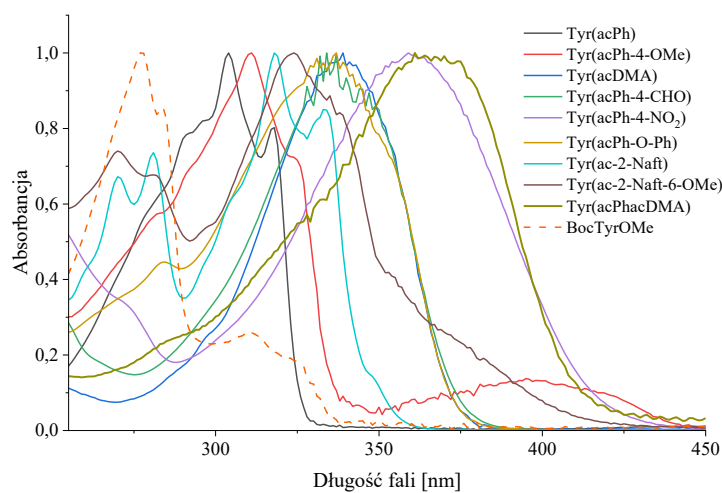
Widma absorpcyjne analizowanych pochodnych charakteryzują się raczej ubogą strukturą oscylacyjną, która w większości przypadków wraz ze wzrostem polarności rozpuszczalnika staje się bardziej rozmyta (Rysunek 80). Wyjątek stanowią widma absorpcyjne pochodnych zawierających podstawniki węglowodorowe (-fenyłowy oraz -naftyłowy), dla których struktura oscylacyjna jest wyraźna także w rozpuszczalnikach polarnych (Rysunek 80: A, I).

Asymetryczne analogi aminokwasów niebiałkowych z fragmentem tyrozyny zawierających wiązanie potrójne charakteryzują się bardzo zróżnicowanym, ale generalnie wysokim lub bardzo wysokim molowym współczynnikiem absorpcji. Jego najwyższą wartość ponad $147000 \frac{\text{dm}^3}{\text{mol} \times \text{cm}}$ (wartość wyznaczona w MeOH) posiada związek Tyr(acPhacDMA). Natomiast spośród pochodnych asymetrycznych zawierających jedno wiązanie potrójne najwyższym molowym współczynnikiem ekstynkcji wynoszącym $76420 \frac{\text{dm}^3}{\text{mol} \times \text{cm}}$ (wartość wyznaczona w PBS) charakteryzuje się pochodna Tyr(acDMA). Z kolei najniższy został określony dla pochodnej Tyr(acPh-4-CHO) i wyniósł on ok. $4300 \frac{\text{dm}^3}{\text{mol} \times \text{cm}}$ (wartość wyznaczona dla PBS) (Tabela 2). Uwzględniając wartość średnią tego parametru dla wszystkich rozpuszczalników to najwyższy molowy współczynniki absorpcji posiadają związki Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) oraz Tyr(acDMA) (Tabela 2).





Rysunek 80. Znormalizowane widma absorpcji asymetrycznych acetylenowych pochodnych tyrozyny zmierzone w MeOH, MeCN, CX, PBS.



Rysunek 81. Zestawienie znormalizowanych widm absorpcji pochodnych asymetrycznych zmierzonych w MeCN.

3.2. Właściwości spektralne pochodnych symetrycznych

Zakres widm absorpcyjnych symetrycznych analogów aminokwasów niebiałkowych z fragmentem tyrozyny zawierających wiązanie potrójne jest różnorodny

i zależny od rodzaju podstawnika (Rysunek 82, Rysunek 83). W niektórych przypadkach obserwuje się także nieznaczną zależność położenia widma od charakteru rozpuszczalnika. Najbardziej krótkofalowe widma posiada związek zawierający najprostszy podstawnik aromatyczny - fenyl (Rysunek 82: A), analogicznie jak w przypadku pochodnych asymetrycznych. Wprowadzanie dodatkowych podstawników o charakterze donorowym lub akceptorowym do pierścienia sześciocząłowego, a także powiększanie podstawnika o kolejny pierścień, prowadzi do pojawienia się absorpcji w zakresie długofalowym. Najbardziej długofalową absorpcją, uwzględniając wszystkie rozpuszczalniki, charakteryzuje się pochodna $\text{Tyr}(\text{acPh-4-NO}_2)_2$ oraz $\text{Tyr}(\text{acDMA})_2$ (Rysunek 82: C, E; Rysunek 83). W przypadku pochodnych symetrycznych wpływ charakteru rozpuszczalnika na położenie widm absorpcji jest mniejszy niż dla pochodnych asymetrycznych. Pochodne podstawione w pozycji 3 i 5 łańcucha bocznego tyrozyny charakteryzują się jedynie wyraźnym batochromowym przesunięciem widm absorpcyjnych w rozpuszczalniku skrajnie polarnym - PBS (Rysunek 82). W pozostałych analizowanych rozpuszczalnikach wpływ ten jest praktycznie niewidoczny. Wyjątek stanowi pochodna $\text{Tyr}(\text{acPir})_2$, której położenie widma absorpcji nie ulega istotnej zmianie nawet w PBS (Rysunek 82: I).

Maksima widm absorpcji pochodnych symetrycznych mieszczą się w przedziale od 289 nm (dla pochodnej $\text{Tyr}(\text{acPh})_2$; widmo zmierzone w MeOH) do 370 nm (dla pochodnej $\text{Tyr}(\text{acPh-4-NO}_2)_2$; widmo zmierzone w PBS). Maksima widm absorpcji w PBS w nieznacznym stopniu przesunięte są batochromowo względem widm zarejestrowanych w MeCN, MeOH oraz CX (Tabela 4).

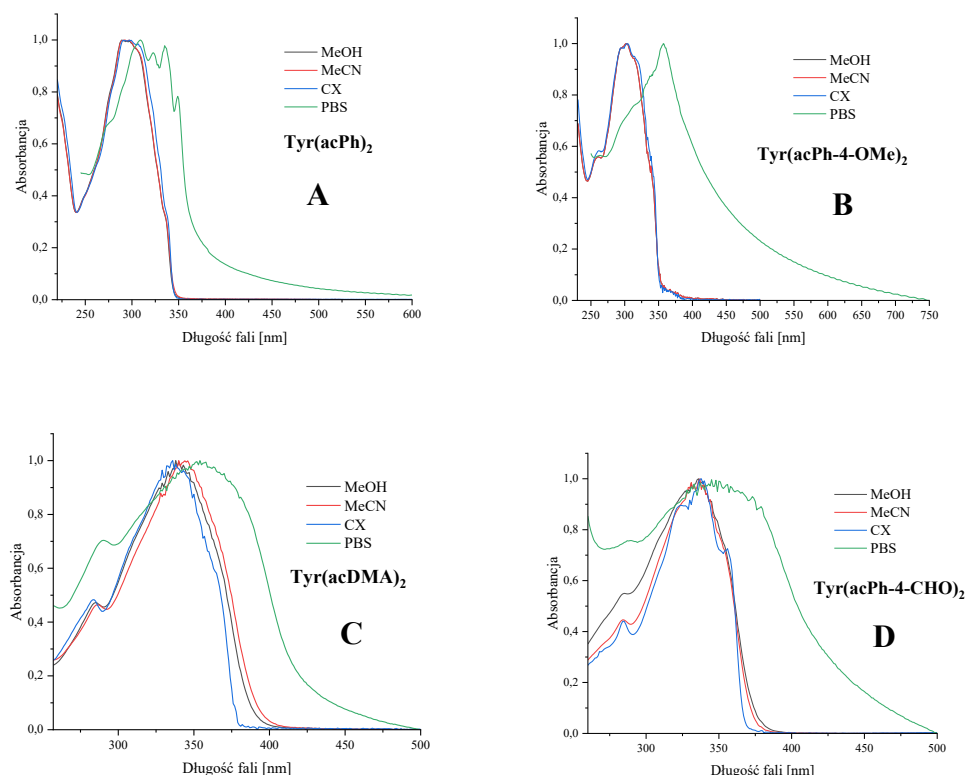
Całkowity brak wpływu polarności na położenie maksimów absorpcji obserwuje się w przypadku pochodnej podstawionej pirydyną, co jest zgodne z wcześniej obserwowanym nakładaniem się widm absorpcyjnych w zakresie długofalowym niezależnie od rodzaju rozpuszczalnika (Tabela 4).

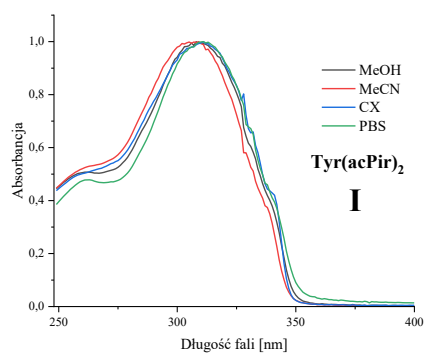
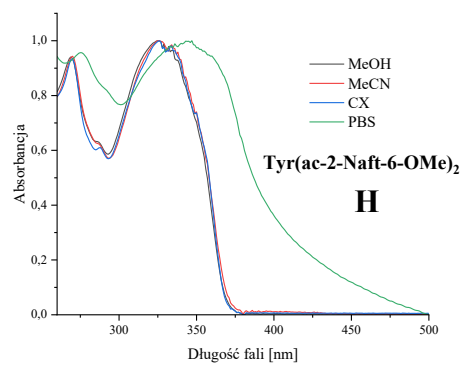
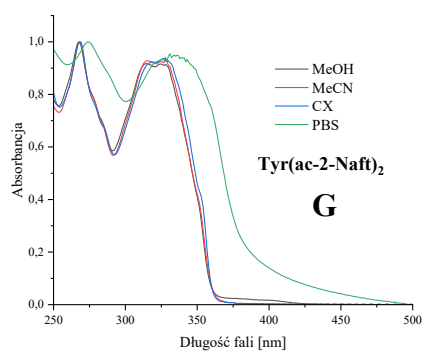
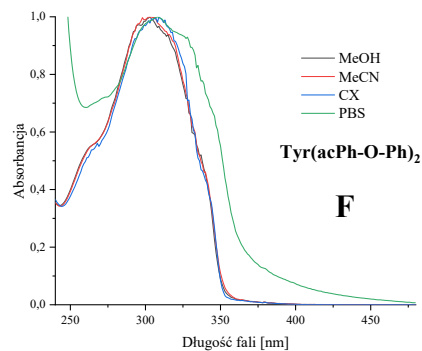
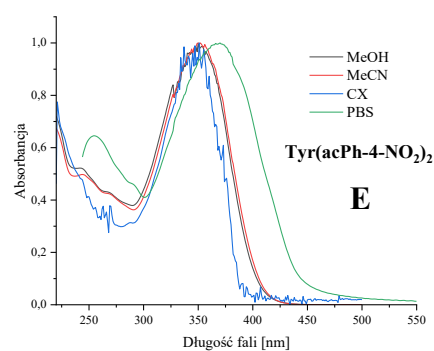
Długofalowy ogon absorpcji obserwowany dla wszystkich pochodnych w PBS (z wyjątkiem $\text{Tyr}(\text{acPir})_2$) wskazuje na powstawanie prawdopodobnie dimerów, asocjatów, kompleksów lub mieszaniny konformerów (które, jak wykazano w dalszych badaniach, nie wykazują fluorescencji lub są nietrwałe w stanie wzbudzonego) (Rysunek 82: A, B, C, D, E, F, G, H).

Symetryczne analogi aminokwasów niebiałkowych z fragmentem tyrozyny zawierających wiązanie potrójne charakteryzują się bardzo zróżnicowanym, ale generalnie umiarkowanym lub wysokim molowym współczynnikiem absorpcji.

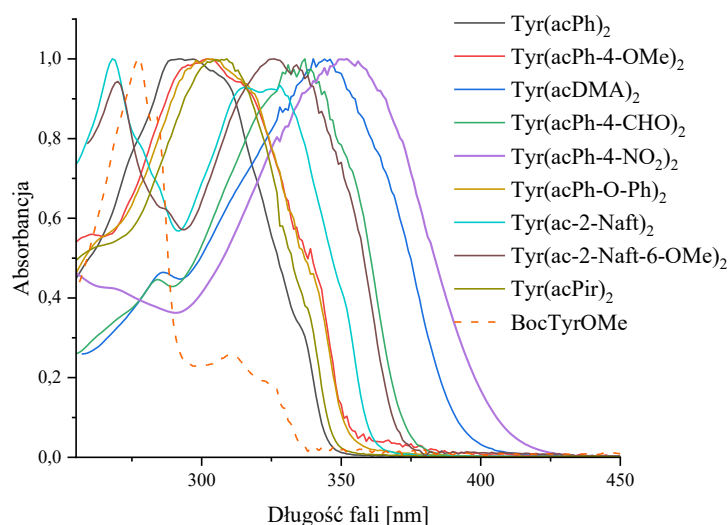
W większości przypadków wartość ε wyniosła ponad $30000 \frac{\text{dm}^3}{\text{mol} \times \text{cm}}$. Najwyższy molowy współczynnik absorpcji został wyznaczony dla Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂ i wyniósł ponad $80000 \frac{\text{dm}^3}{\text{mol} \times \text{cm}}$ (wartość wyznaczona dla PBS). Najniższym ε około $3500 \frac{\text{dm}^3}{\text{mol} \times \text{cm}}$ (wartość wyznaczona dla CX) charakteryzuje się Tyr(acPh-4-NO₂)₂ (Tabela 4). Parametr ten jest w większości przypadków wyraźnie wyższy w MeCN, MeOH, CX niż w PBS, wyjątek stanowi Tyr(acPh-4-NO₂)₂ ($\varepsilon = 19330 \frac{\text{dm}^3}{\text{mol} \times \text{cm}}$ w PBS) oraz wcześniej wspomniana pochodna Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂ (Tabela 4).

W celu oceny wpływu dodatku DMSO do buforu PBS na widma absorpcyjne wykonałam dodatkowo pomiary w DMSO dla wybranej pochodnej (Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂). Zestawienie porównawcze widm zaprezentowano poniżej (Rysunek 84). Zaobserwowałam wyraźnie większe batochromowe przesunięcie maksimum absorpcji w PBS z dodatkiem DMSO niż w czystym DMSO, co wskazuje, że decydujący wpływ na stabilizację stanów elektronowych chromoforu ma środowisko buforowe, a nie wyłącznie obecność DMSO.

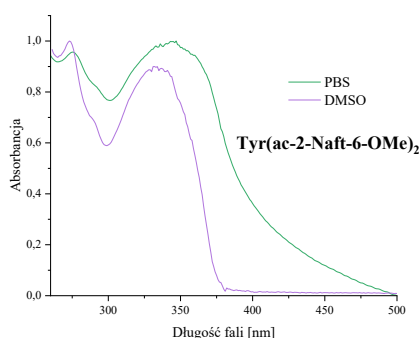




Rysunek 82. Znormalizowane widma absorpcji symetrycznych acetylenowych pochodnych tyrozyny zmierzone w MeOH, MeCN, CX, PBS.



Rysunek 83. Zestawienie znormalizowanych widm absorpcji pochodnych symetrycznych zmierzonych w MeCN.



Rysunek 84. Znnormalizowane widma absorpcji wybranej symetrycznej acetylenowej pochodnej tyrozyny zmierzone w PBS i DMSO.

3.3. Właściwości fotofizyczne pochodnych asymetrycznych

Zakres widm emisyjnych asymetrycznych analogów aminokwasów niebiałkowych z fragmentem tyrozyny zawierających wiązanie potrójne jest różnorodny i wyraźnie zależny od rodzaju podstawnika oraz w większości przypadków także od charakteru rozpuszczalnika. Najbardziej krótkofalowe widmo fluorescencji obserwuje się dla pochodnej zawierającej najprostszy podstawnik w łańcuchu bocznym tyrozyny - fenyl (Rysunek 85: A; Rysunek 86). Widmo emisji nie przekracza 450 nm w żadnym z analizowanych środowisk. Natomiast najszerszym zakresem emisji, powyżej 700 nm, charakteryzuje się pochodna zawierająca dodatkowo w podstawniku fenylowym grupę

elektronoakceptorową - Tyr(acPh-4-NO₂) (Rysunek 85: E; Rysunek 86). Podobny zakres widma fluorescencji obserwuje się także dla pochodnej zawierającej dwa wiązania potrójne w łańcuchu bocznym tyrozyny Tyr(acPhacDMA) (Rysunek 85: I; Rysunek 86). Pochodna zawierająca elektronoakceptorową grupę formylową również wyróżnia się długofalowym zakresem emisji. Pozostałe pochodne emitują powyżej 500 nm. Rozpuszczalnik wykazuje najmniejszy wpływ na zakres fluorescencji w przypadku pochodnej Tyr(acPh). Dla pochodnych Tyr(acDMA), Tyr(acPh-4-CHO), Tyr(acPh-4-NO₂) trend przesuwania się krawędzi widm emisyjnych w stronę długofalową wraz ze wzrastającą polarnością otoczenia jest stały i zdecydowany (Rysunek 85: C, D, E). Pozostałe pochodne wykazują batochromowe przesunięcie widma głównie w rozpuszczalniku PBS. Wyjątek stanowi pochodna Tyr(acPhacDMA), dla której obserwuje się silną zależność położenia widma fluorescencji od charakteru rozpuszczalnika, a najbardziej długofalowe widmo zarejestrowano w MeCN (Rysunek 85: I). Wspólną cechą wszystkich omawianych widm emisji jest rozmywanie struktury oscylacyjnej w rozpuszczalnikach polarnych (Rysunek 85). Wyjątek stanowi pochodna Tyr(acPh-O-Ph), w przypadku której struktura oscylacyjna widma emisji widoczna jest nawet w rozpuszczalniku PBS (Rysunek 85: F).

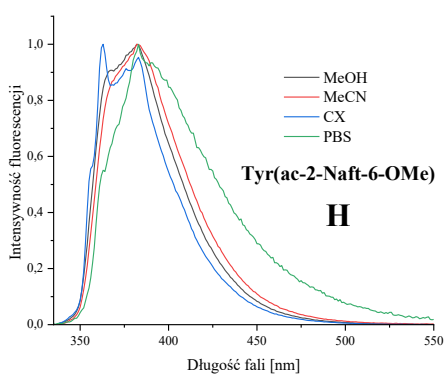
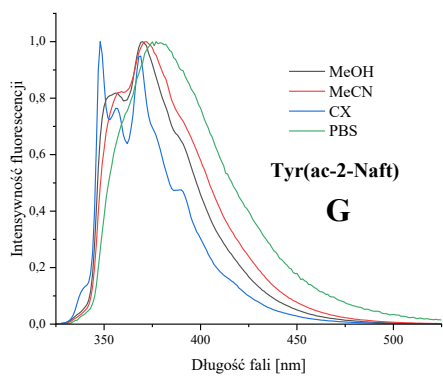
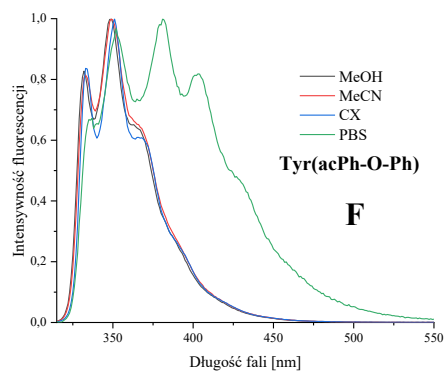
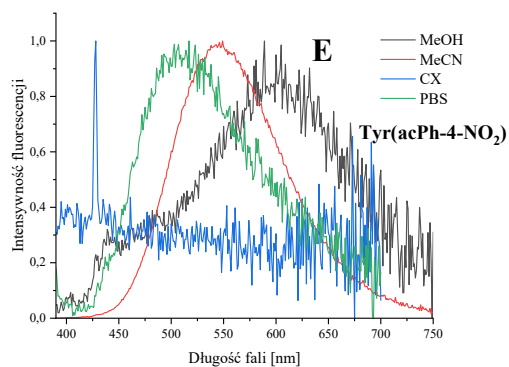
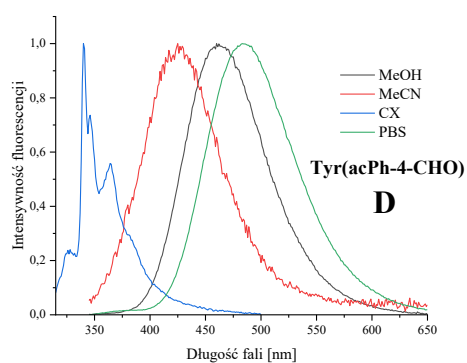
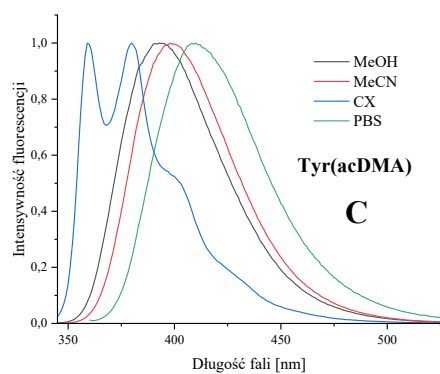
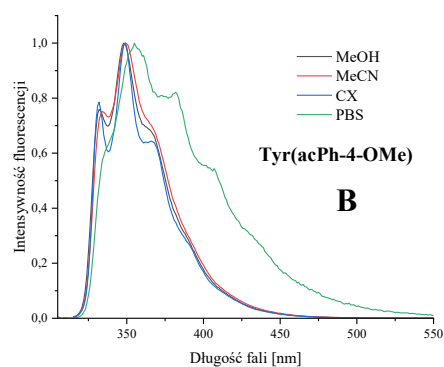
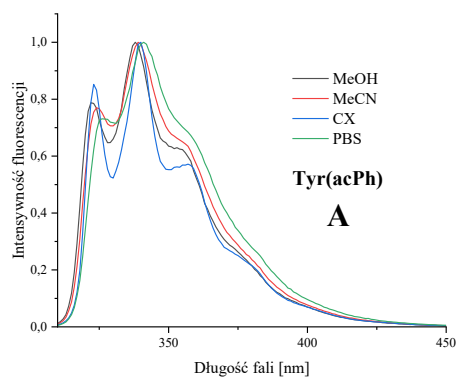
Maksima widm emisji dla pochodnych asymetrycznych mieszczą się w zakresie od 338 nm (dla pochodnej Tyr(acPh); widmo zmierzone w MeOH) do 589 nm (dla pochodnej Tyr(acPh-4-NO₂); widmo zmierzone w MeOH) (Tabela 2). Analogicznie jak w przypadku długofalowych krawędzi widm emisyjnych obserwuje się istotny wpływ polarności rozpuszczalnika na położenie maksimów emisji. W większości przypadków maksima emisji przesuwają się w kierunku długofalowym wraz ze wzrostem polarności rozpuszczalnika (Tabela 2). Maksima emisji pochodnej asymetrycznej zawierającej w swojej budowie dwa wiązania potrójne Tyr(acPhacDMA) wykazują najwyższą wrażliwość na zmiany charakteru otoczenia (λ_{max} emisji w CX wynosi 393 nm, a λ_{max} emisji kolejno w MeCN, MeOH, PBS wynosi: 516; 499; 484 nm) (Rysunek 85: I, Tabela 2).

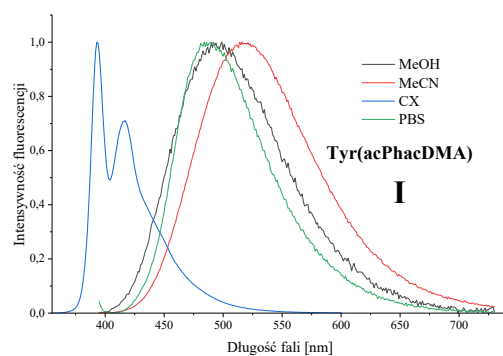
Utrudniona analiza tego parametru w przypadku pochodnej Tyr(acPh-4-NO₂) wynika z wyraźnie obniżonej intensywności fluorescencji w MeOH, CX, PBS, przy czym w rozpuszczalniku niepolarnym związek wykazuje wręcz znikomą fluorescencję. Dobrze widoczną fluorescencję obserwuje się wyłącznie w rozpuszczalniku polarnym aprotycznym (Rysunek 85: E, Rysunek 87).

Wartości przesunięć Stokesa są zróżnicowane i uzależnione zarówno od rodzaju podstawnika, jak i od polarności oraz protyczności otoczenia. Największa wartość

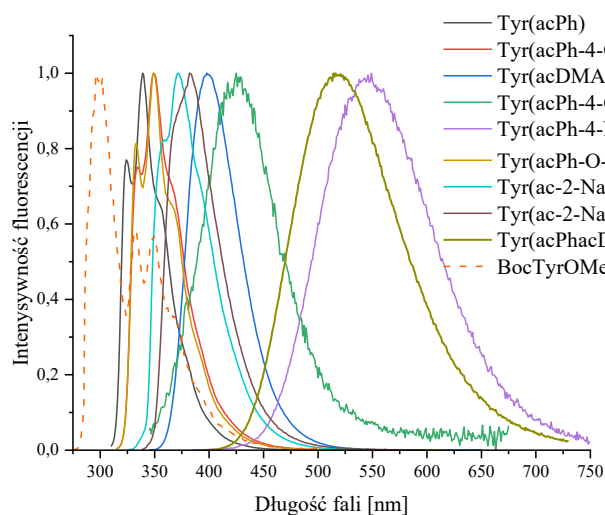
przesunięcia Stokesa została wyznaczona dla pochodnej asymetrycznej Tyr(acPhacDMA) i wyniosła ponad 11000 cm^{-1} w MeOH. Najniższą wartość przesunięcia Stokesa równą 69 cm^{-1} wyznaczono dla Tyr(acPh-O-Ph) w PBS (Tabela 2). Wartości wydajności kwantowej fluorescencji są generalnie wysokie i wyniosły w większości przypadków ponad 40 %. Niższe zaobserwowano w przypadku Tyr(acPh-4-CHO) w MeCN i CX ($<3\%$), MeOH (QY = 33 %), Tyr(acPh-4-OMe) w PBS (QY = 29 %) oraz Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) w PBS (QY = 18 %). Wyjątek stanowi pochodna Tyr(acPh-4-NO₂), dla której wydajności kwantowe fluorescencji są niskie w MeOH i PBS (rzędu kilku procent) oraz o rząd wielkości niższe w CX, natomiast co ciekawe w MeCN osiągają wartość około 20 %. Ta ostatnia obserwacja jest nietypowa, gdyż podstawnik ten wykazuje właściwości wygaszające fluorescencję.^{174–176} Warto podkreślić, że w wybranych przypadkach pochodnych zawierających podstawniki elektronodonorowe wydajność kwantowa fluorescencji wynosiła 100 %, a dla pochodnej Tyr(acDMA) wartość ta była maksymalna w każdym analizowanym środowisku (Tabela 2).

Jasność świecenia osiągnęła maksymalnie około 100000 (dla pochodnej Tyr(acPhacDMA), wartość wyznaczona w MeOH). W większości przypadków przekraczała 10000, przy czym dla pochodnej Tyr(acDMA) wynosiła nawet około 76000 w PBS oraz ponad 40000 w MeCN, MeOH i CX. Najniższe wartości jasności świecenia odnotowano dla pochodnej Tyr(acPh-4-NO₂) (7,8 w PBS oraz 131 w MeOH) oraz dla pochodnej Tyr(acPh-O-Ph) (694 w PBS) (Tabela 2). Podstawniki wprowadzone asymetrycznie o charakterze elektronodonorowym (acDMA, acPhacDMA, ac-2-Naft-6-OMe) korespondują z wystąpieniem wyższych wydajności kwantowych fluorescencji i jasności, a podstawniki elektronoakceptorowe powodują długofalowe przesuwanie krawędzi widma emisji (acPh-4-NO₂, acPh-4-CHO). Warto zaznaczyć, że w niektórych przypadkach widma fluorescencji wykazują bardziej wyraźną strukturę oscylacyjną niż odpowiadające im widma absorpcyjne. Może to wskazywać na ograniczenie relaksacji geometrycznej i częściowe usztywnienie struktury związku w stanie wzbudzonym.

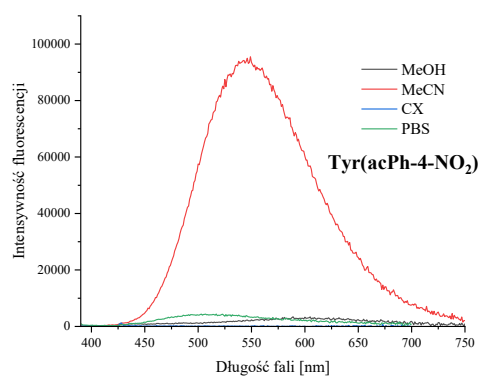




Rysunek 85. Znormalizowane widma emisji asymetrycznych acetylenowych pochodnych tyrozyny zmierzone w MeOH, MeCN, CX, PBS.



Rysunek 86. Zestawienie znormalizowanych widm emisji pochodnych asymetrycznych zmierzonych w MeCN.



Rysunek 87. Widma emisji Tyr(acPh-4-NO₂) zmierzone w MeOH, MeCN, CX, PBS.

Tabela 2. Właściwości spektralne i fotofizyczne asymetrycznych acetylenowych pochodnych tyrozyny.

Związek	Rozpuszczalnik	λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]	ϵ [dm ³ /mol · cm]	Przesunięcie Stokesa [cm ⁻¹]	QY	Jasność $\epsilon \times \text{QY}$
Tyr(acPh)	MeCN	304	339	28510	3396	0,45	12830
	MeOH	304	338	32860	3309	0,44	14457
	CX	306	340	32850	3268	0,47	15442
	PBS	305	341	16760	3461	0,73	12235
Tyr(acPh-4-OMe)	MeCN	311	349	38450	3501	0,62	23839
	MeOH	310	348	36190	3522	0,64	23159
	CX	312	349	25910	3398	0,55	14252
	PBS	312	355	5890	3882	0,29	1708
Tyr(acDMA)	MeCN	339	398	47490	4373	1	47495
	MeOH	336	393	47880	4317	1	47879
	CX	336	380	41860	3446	1	41862
	PBS	310	410	76420	7868	1	76419
Tyr(acPh-4-CHO)	MeCN	334	425	39200	6411	0,022	1941
	MeOH	341	460	34430	7586	0,33	25564
	CX	335	370	45740	2824	0,03	1372
	PBS	344	483	4310	8366	0,54	6978
Tyr(acPh-O-Ph)	MeCN	311	349	35990	3501	0,7	25192
	MeOH	311	349	35640	3501	0,62	22094
	CX	313	351	32070	3459	0,85	27260
	PBS	380	381	4340	69	0,16	694
Tyr(acPh-4-NO ₂)	MeCN	359	549	12600	9640	0,2	2519
	MeOH	358	589	13120	10955	0,01	131
	CX	357	428	7810	4647	0,001	7,8
	PBS	369	517	5300	7758	0,02	1059
Tyr(ac-2-Naft)	MeCN	318	372	34520	4565	0,93	32100
	MeOH	318	370	37380	4419	1	37381
	CX	320	348	36530	2514	0,73	26668
	PBS	328	377	20040	3963	1	20039
Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)	MeCN	324	382	52120	4686	0,65	33879
	MeOH	323	382	42760	4782	0,91	38910
	CX	324	363	41180	3316	1	41175
	PBS	281	383	15630	9477	0,18	1876
Tyr(acPhacDMA)	MeCN	361	516	49430	9875	1	49431
	MeOH	322	499	147260	11016	0,68	100135
	CX	361	393	10270	2255	1	10270
	PBS	331	484	8550	9550	0,49	4188
BocTyrOMe	MeCN	277	296	2220	2317	0,081	180
	MeOH	278	301	1550	2749	0,11	171
	CX	277	287	1640	1258	0,12	197
	PBS	276	299	1290	2787	0,072	93

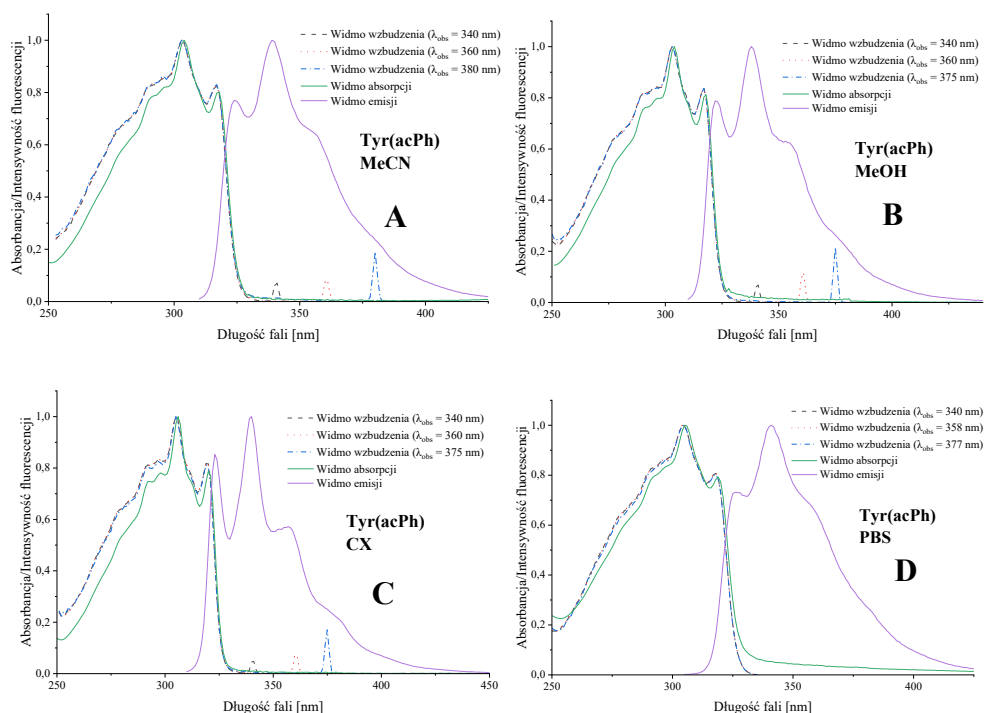
W celu pogłębionej analizy stanu wzbudzonego oraz weryfikacji jednorodności źródła emisji zmierzyłam widma wzbudzenia wszystkich pochodnych we wszystkich analizowanych rozpuszczalnikach dla różnych długości fali obserwacji.

Widma wzbudzenia pochodnych Tyr(acPh), Tyr(ac-2-Naft), Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) (Rysunek 88, 94, 95) niezależnie od długości fali obserwacji pokrywają się z widmami absorpcyjnymi, co wskazuje, że to samo indywiduum, które zaabsorbowało energię jest

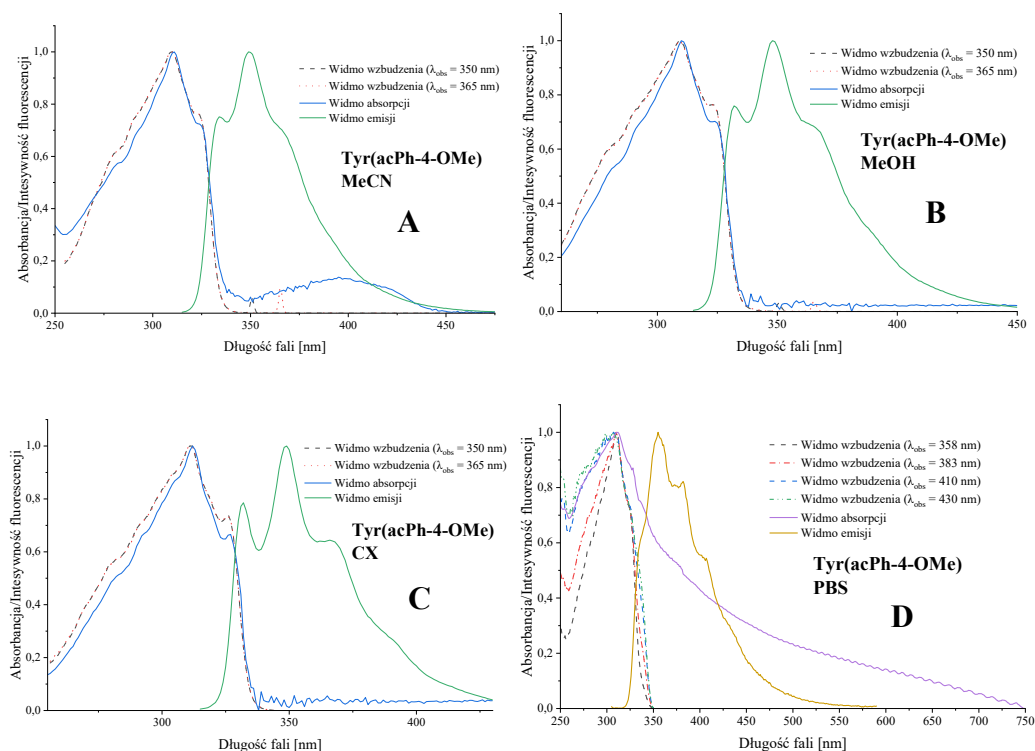
odpowiedzialne za jej emisję. W przypadku pochodnej Tyr(acPh-4-OMe) (Rysunek 89) widma wzbudzenia pokrywają się z odpowiednimi widmami absorpcyjnymi w rozpuszczalnikach CX i MeOH (Rysunek 89: B, C), a także w obszarze krótkofalowym w MeCN oraz PBS. Niewidoczne pasmo długofalowe na widmie wzbudzenia sugeruje, iż zarejestrowana emisja odpowiada indywiduum absorbującemu w obszarze do 350 nm. Długofalowe pasmo absorpcyjne (Rysunek 89: A) lub długofalowy ogon widoczny na widmie (Rysunek 89: D) jest wynikiem oddziaływań trwałych tylko w stanie podstawowym lub też generujących powstanie niefluoryzującego produktu. Widma wzbudzenia pochodnej Tyr(acDMA) (Rysunek 90) pokrywają się z widmami absorpcyjnymi we wszystkich analizowanych rozpuszczalnikach niezależnie od długości fali obserwacji. Wyjątek stanowi PBS (Rysunek 90: D). Niewielkie batochromowe przesunięcie widm wzbudzenia względem widma absorpcji, obserwowane w tym rozpuszczalniku niezależnie od długości fali obserwacji, może wynikać z częściowej stabilizacji niżej energetycznych stanów wzbudzonych przez polarne, protyczne środowisko rozpuszczalnika. Natomiast dobre odwzorowanie lustrzane widma emisji względem widma wzbudzenia przy jednoczesnych niewielkich różnicach względem widma absorpcji wskazuje na heterogeniczność stanów w stanie podstawowym oraz selektywną relaksację układu do jednego dominującego, fluorescencyjnego stanu wzbudzonego S_1 . Podobne zjawisko obserwuje się dla pochodnej Tyr(acPh-4-NO₂) (Rysunek 93: A, B, D) w rozpuszczalnikach MeCN, MeOH oraz PBS. W przypadku tej pochodnej analizę widm wzbudzenia w CX utrudnia niska intensywność fluorescencji (Rysunek 93: C). Hipsochromowe przesunięcie widma wzbudzenia względem absorpcji, obserwowane w rozpuszczalnikach MeCN, MeOH i CX dla pochodnej Tyr(acPh-4-CHO) (Rysunek 91: A, B, C), występujące jedynie przy bardzo krótkich długościach fali emisji, może wynikać z selektywnego udziału określonych przejść elektronowych $S_0 \rightarrow S_n$, które efektywnie prowadzą do fluorescencji. Wraz ze wzrostem długości fali emisji udział ten ulega zmianie, co skutkuje zanikiem obserwowanego przesunięcia. Nie można również całkowicie wykluczyć wpływu śladowych zanieczyszczeń o intensywnej fluorescencji. Natomiast w PBS widma absorpcji i wzbudzenia tej pochodnej pokrywają się niemal całkowicie niezależnie od długości fali emisji, co wskazuje na emisję z jednej dominującej, jednorodnej populacji stanu wzbudzonego S_1 . W przypadku pochodnej Tyr(acPh-O-Ph) (Rysunek 92: A, B, C, D) widma wzbudzenia zarejestrowane w rozpuszczalnikach MeCN, MeOH, CX i PBS pokrywają się z pasmem krótkofalowym widma absorpcji niezależnie od długości fali obserwacji. Na widmach zarejestrowanych

dla pochodnej Tyr(ac-2-Naft) w rozpuszczalniku polarnym (PBS) widoczne jest przesunięcie hipsochromowe wszystkich widm wzbudzenia, niezależnie od stosowanej długości fali obserwacji, co może wynikać z selektywnego udziału określonych przejść elektronowych $S_0 \rightarrow S_n$ oraz ograniczonej reorganizacji solwacyjnej układu w stanie wzbudzonym przed emisją. Dodatkowo efekt ten może być wspierany przez współlistnienie różnych mikrośrodków cząsteczki stabilizowanych przez rozpuszczalnik (Rysunek 94: D). Dobra zgodność widm wzbudzenia z widmami absorpcji, w pozostałych rozpuszczalnikach, wskazuje, że emisja fluorescencji pochodzi z jednej dominującej populacji stanu wzbudzonego S_1 , a obserwowane pasma absorpcyjne stanowią bezpośrednie kanały efektywnego wzbudzenia tego stanu. Pochodna posiadająca w swojej strukturze dwa wiązania potrójne tj. Tyr(acPhacDMA) (Rysunek 96) charakteryzuje się widmami wzbudzenia, które niezależnie od rozpuszczalnika i długości fali obserwacji pokrywają się z widmami absorpcyjnymi. Wyjątek stanowią widma wzbudzenia zarejestrowane w MeOH (Rysunek 96: B), które przesunięte są w stronę fal dłuższych względem widm absorpcji, co jak w przypadku pochodnej Tyr(acDMA) (PBS, Rysunek 90: D) może wynikać z częściowej stabilizacji niższych energetycznych stanów wzbudzonych przez polarne, protyczne środowisko rozpuszczalnika.

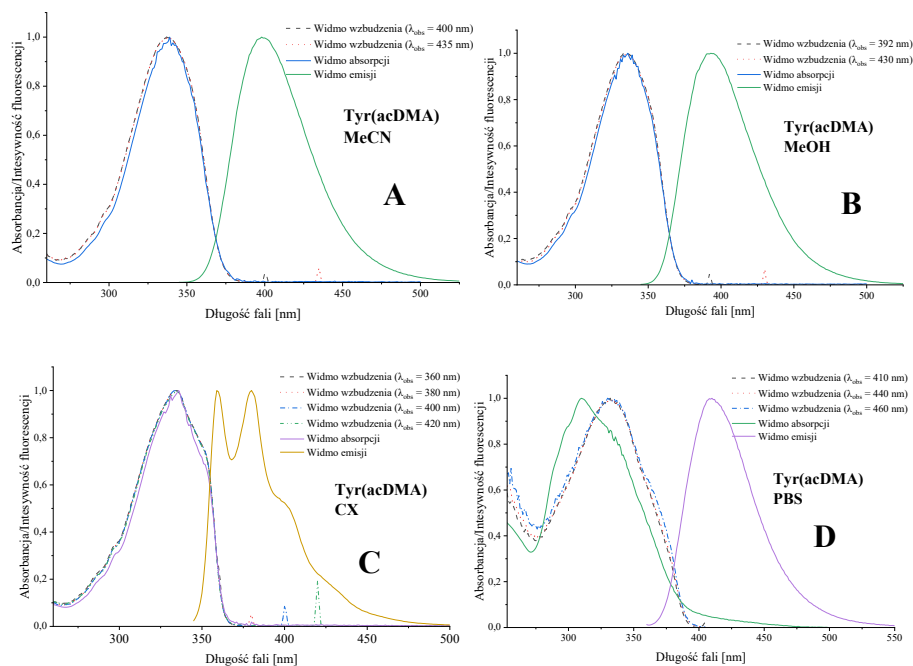
Pomiary widm wzbudzenia potwierdziły, że długofalowe ogony widm absorpcji obserwowane w PBS nie biorą udziału w procesie emisji fluorescencji. Widma wzbudzenia, niezależnie od długości fali emisji, pokrywają się ze sobą oraz z krótkofalową częścią widma absorpcyjnego, która stanowi również lustrzane odbicie widma emisji. Oznacza to, że przejścia odpowiedzialne za absorpcję w zakresie długofalowym nie prowadzą efektywnie do emisji, natomiast fluorescencja pochodzi z jednej dominującej populacji stanu wzbudzonego S_1 , związanej z główną formą cząsteczki (Rysunek 89: D, Rysunek 92: D).



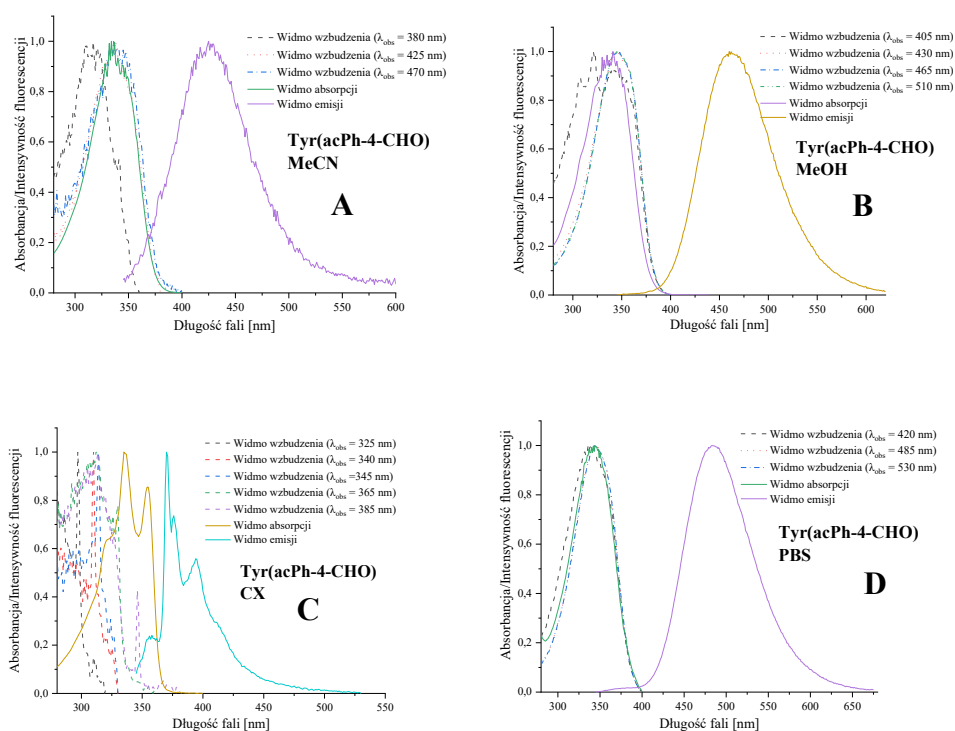
Rysunek 88. Znormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(acPh) zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.



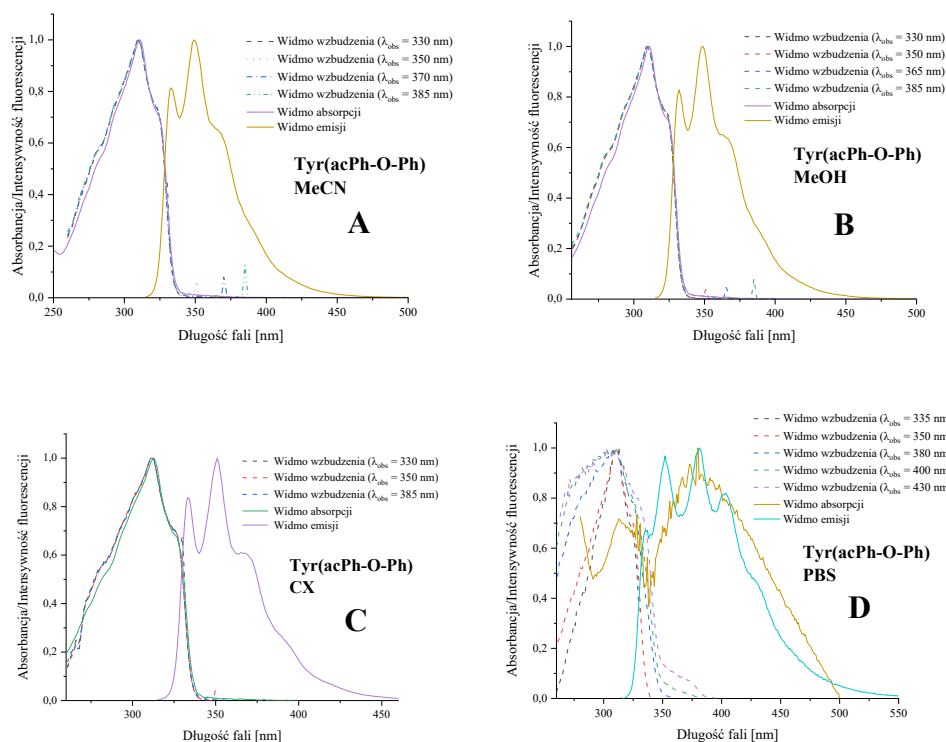
Rysunek 89. Znormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(acPh-4-OMe) zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.



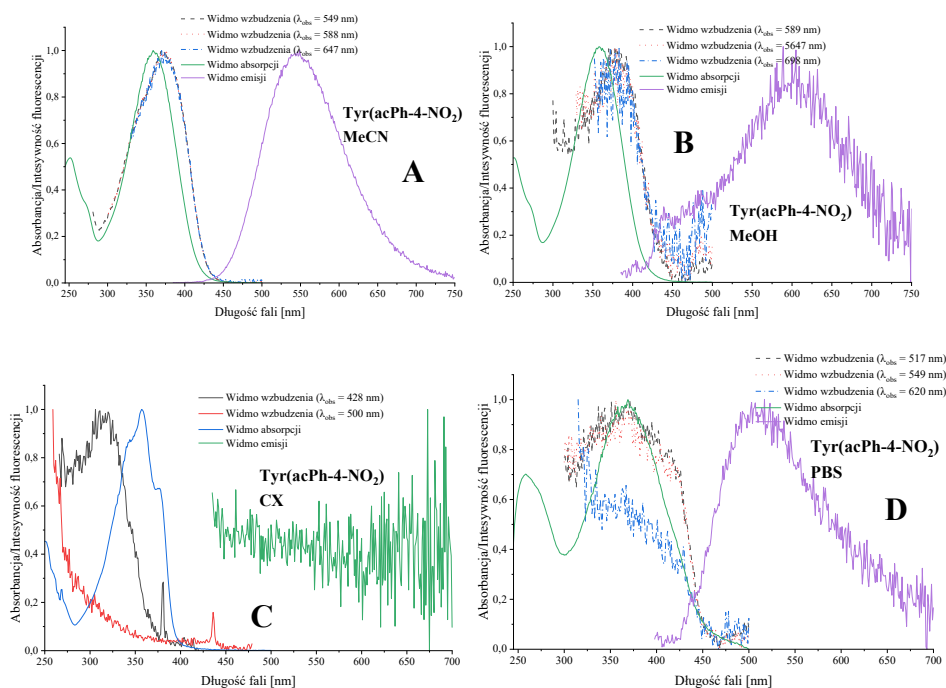
Rysunek 90. Znormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(acDMA) zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.



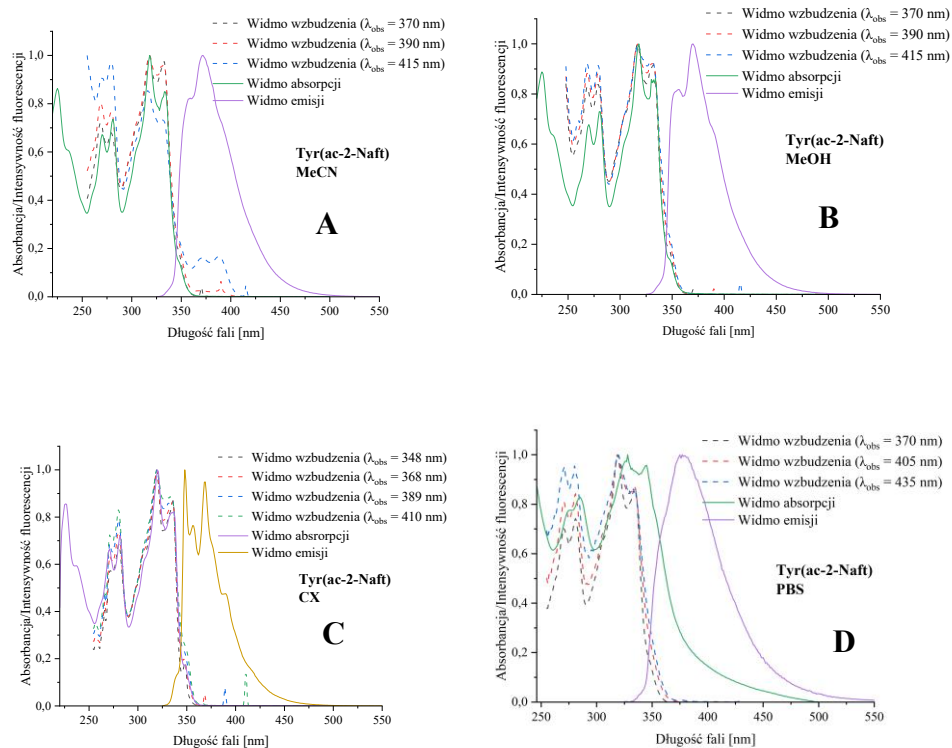
Rysunek 91. Znormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(acPh-4-CHO) zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.



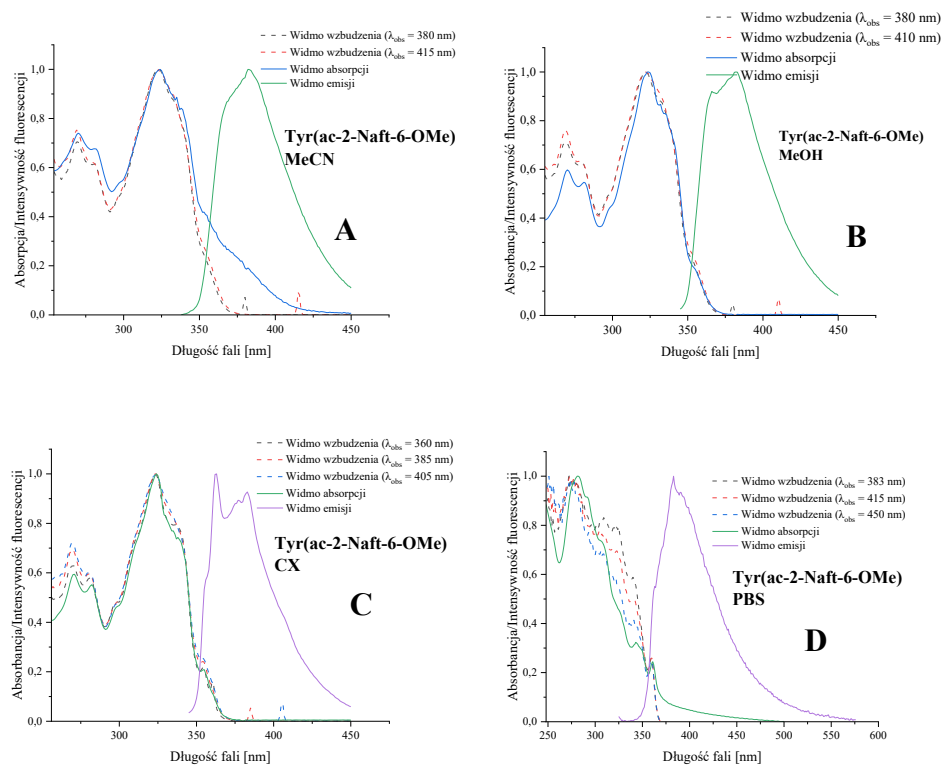
Rysunek 92. Znormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(acPh-O-Ph) zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.



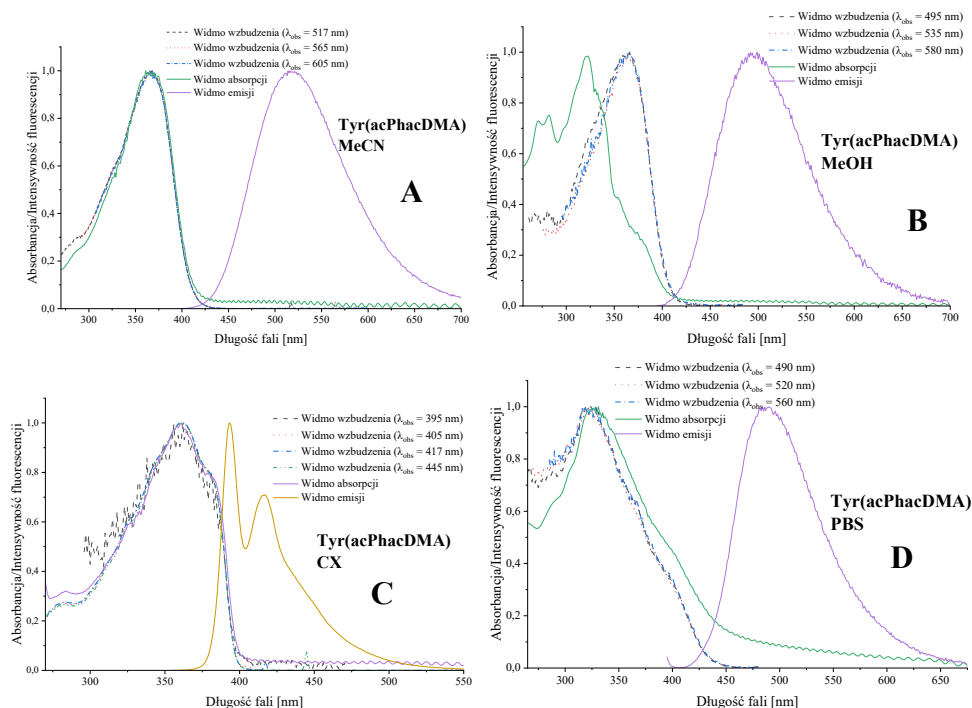
Rysunek 93. Znormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(acPh-4-NO₂) zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.



Rysunek 94. Znormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(ac-2-Naft) zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.



Rysunek 95. Znormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.



Rysunek 96. Znormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(acPhacDMA) zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.

Poza analizą stacjonarną fluorescencji wykonałam również pomiary rozdzielone w czasie, co pozwoliło określić czasy życia stanów wzbudzonych, a tym samym ocenić dynamikę procesów relaksacji niewidocznych w widmach stacjonarnych.

Tabela 3. Czasy zaniku fluorescencji asymetrycznych acetylenowych pochodnych tyrozyny.

Związek	Rozpuszczalnik	τ_i [ns]	α_i [%]	χ_R^2
Tyr(acPh)	MeCN	1,235	100,00	0,732
	MeOH	1,245	100,00	0,721
	CX	1,148	100,00	0,783
	PBS	1,359	100,00	1,045
Tyr(acPh-4-OMe)	MeCN	1,207	100,00	0,719
	MeOH	1,229	100,00	0,657
		1,231	24,06	0,658
		1,229	75,94	
	CX	1,158	100,00	0,886
	PBS	1,263	100,00	1,495
		1,213	99,34	1,040
		4,163	0,66	
		1,253	93,79	
		0,163	5,01	
		6,460	1,20	

Tyr(acDMA)	MeCN	1,406	100,00	2,723
		1,355	99,47	0,839
		7,697	0,53	
	MeOH	1,385	100,00	2,460
		1,344	99,49	0,863
		7,104	0,51	
	CX	1,149	100,00	2,648
		1,109	99,54	0,764
		6,866	0,46	
	PBS	1,671	100,00	3,667
		10,549	0,54	0,979
		1,604	99,46	
Tyr(acPh-4-CHO)	MeCN	1,690	100,00	1,569
		1,527	99,03	0,920
		8,591	0,97	
	MeOH	1,976	100,00	3,106
		1,871	99,25	0,897
		9,468	0,75	
	CX	1,184	100,00	2,305
		1,121	99,72	1,043
		8,438	0,28	
	PBS	1,975	100,00	3,043
		1,929	99,41	0,914
		11,091	0,59	
Tyr(acPh-O-Ph)	MeCN	1,111	100,00	0,776
	MeOH	1,142	100,00	0,909
	CX	1,050	100,00	0,785
	PBS	1,165	100,00	5,478
		1,117	99,36	1,048
		10,089	0,64	
Tyr(acPh-4-NO₂)	MeCN	0,596	100,00	1,135
	MeOH	0,142	100,00	3,555
		0,281	55,85	1,432
		0,042	44,15	
		0,184	53,56	0,683
		0,034	30,46	
		1,447	15,99	
	CX	1,525	100,00	1,457
		1,331	97,13	0,959
		5,806	2,87	
	PBS	1,160	100,00	12,436
		0,200	89,31	2,209
		1,911	10,69	
		0,105	85,97	1,062
		0,769	11,65	
		3,005	2,38	

Tyr(ac-2-Naft)	MeCN	5,220	100,00	1,405
		3,971	50,91	0,837
		6,058	49,09	
	MeOH	6,131	100,00	2,438
		4, 0508	47,89	0,897
		7,210	51,11	
	CX	7,488	100,00	2,297
		3,301	27,57	0,869
		8,057	72,43	
	PBS	5,218	100,00	3,240
		3,071	49,86	0,835
		6,148	50,14	
Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)	MeCN	5,399	100,00	1,377
		6,001	63,93	0,851
		3,700	36,07	
	MeOH	5, 98	100,00	1,201
		6,348	77,96	0,940
		3,968	22,04	
	CX	5,265	100,00	1,830
		6,213	49,64	0,922
		3,803	50,36	
	PBS	4,748	100,00	26,447
		1,638	84,16	1,561
		8,237	15,84	
		1,293	75,57	0,937
		5,011	20,07	
Tyr(acPhacDMA)	MeCN	2,434	100,00	0,877
		5,803	100,00	1,248
	MeOH	6,508	59,03	0,841
		4,338	40,97	
	CX	0,868	100,00	0,722
	PBS	2,468	100,00	13,689
		0,944	86,87	2,309
		4,945	13,13	
		0,469	75,05	1,007
		2,311	22,74	
BocTyrOMe	MeCN	1,404	100,00	5,788
		1,170	98,01	1,103
		4,869	1,99	
	MeOH	1,873	100,00	1,446
		1,734	95,66	1,184
		3,321	4,34	
	CX	2,924	100,00	2,645
		2,700	97,99	1,138
		8,088	2,01	
	PBS	1,963	100,00	2,267
		1,649	92,13	1,150
		3,484	7,87	

Czasy zaniku fluorescencji zmierzyłam w czterech rozpuszczalnikach różniących się polarnością i zdolnością do tworzenia wiązań wodorowych, analogicznie jak w przypadku pomiarów stacjonarnych. Zaobserwowałam zaniki fluorescencji zarówno homogeniczne, jaki i heterogeniczne w zależności od środowiska, jak i podstawnika, który został wprowadzony asymetrycznie do łańcucha bocznego tyrozyny (Tabela 3).

Analiza uzyskanych czasów życia fluorescencji wskazuje, że badane pochodne tyrozyny można podzielić na dwie główne grupy w zależności od charakteru zaniku fluorescencji. W przypadku pochodnych zawierających podstawnik fenyłowy oraz fenoksyfenyłowy obserwowane zaniki mają głównie charakter jednorodny (monoeksponencjalny) we wszystkich zastosowanych rozpuszczalnikach, a wartości czasów życia mieszczą się w zakresie ok. 1,0 - 1,5 ns. Sugeruje to dominację pojedynczego procesu emisyjnego oraz stosunkowo niewielki wpływ heterogeniczności środowiskowej.

W przeciwieństwie do nich pozostałe pochodne wykazują wyraźnie heterogeniczny charakter zaniku fluorescencji, co przejawia się koniecznością zastosowania modeli wieloeksponencjalnych. W układach tych obserwuje się współistnienie krótkich ($\approx 0,5 - 2$ ns) oraz dłuższych komponentów ($\approx 3 - 12$ ns), przy czym ich względne udziały zależą zarówno od struktury podstawników, jak i rodzaju rozpuszczalnika. Taki rozkład czasów życia wskazuje na obecność wielu konkurencyjnych ścieżek dezaktywacji wzbudzonego stanu oraz współistnienie różnych form emitujących, różniących się stopniem stabilizacji solwatacyjnej i prawdopodobnie geometrią strukturalną. Interpretację tę wspierają również wyniki analizy widm absorpcji, fluorescencji oraz wzbudzenia, wskazujące na obecność więcej niż jednego indywiduum absorbującego i emitującego w części badanych układów.

Warto zaznaczyć, że wieloskładnikowe zaniki fluorescencji dla pochodnych Tyr są zjawiskiem typowym i były wcześniej opisywane w literaturze.^{177,178}

Zaobserwowano wyraźny wpływ środowiska na dynamikę zaniku fluorescencji. W rozpuszczalnikach polarnych i protycznych (MeOH oraz PBS) obserwuje się zwiększoną heterogeniczność zaniku oraz wzrost udziału dłuższych komponentów czasowych. Może to wynikać ze stabilizacji stanów wzbudzonych o większym stopniu separacji ładunku oraz z intensywnych oddziaływań solwatacyjnych, w tym tworzenia wiązań wodorowych. Z kolei w MeCN, będącym rozpuszczalnikiem aprotycznym, obserwuje się bardziej jednorodne zaniki fluorescencji, co sugeruje ograniczenie efektów solwatacyjnych. W rozpuszczalniku niepolarnym brak silnych oddziaływań elektrostatycznych sprzyja natomiast dominacji stanów lokalnych, jednak jednocześnie

może prowadzić do zwiększonej heterogeniczności związanej z tendencją do tworzenia agregatów molekularnych.

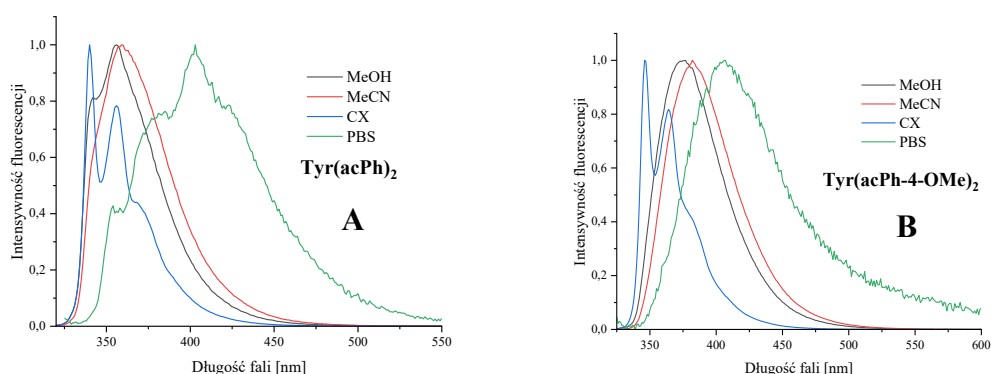
W porównaniu z układem referencyjnym BocTyrOMe, który wykazuje krótkie czasy życia ($\sim 1,1 - 1,9$ ns) z niewielkim udziałem składników długoczasowych, większość modyfikowanych pochodnych charakteryzuje się wydłużeniem czasu życia fluorescencji oraz zwiększoną heterogenicznością zaniku. Najbardziej wyraźne wydłużenie czasów życia (o około 2 - 3 ns względem BocTyrOMe) obserwuje się dla pochodnych Tyr(ac-2-Naft) oraz Tyr(ac-2-Naft-6-OMe), co wskazuje na istotny wpływ rozszerzenia układu π oraz zwiększenia delokalizacji elektronowej. Z kolei podstawnik dimetyloaminowy oraz grupy silnie elektronowo-akceptorowe (np. NO_2 , CHO) prowadzą do zwiększenia udziału długich komponentów czasowych, co może być związane z powstawaniem stanów o częściowym charakterze charge-transfer (ICT/CT) oraz zwiększoną heterogenicznością strukturalną badanych układów.

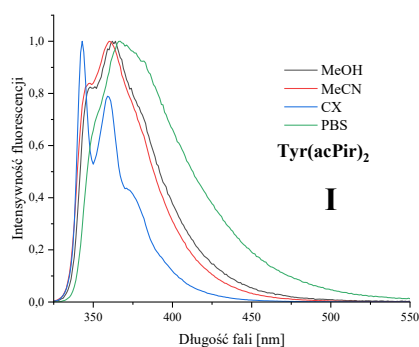
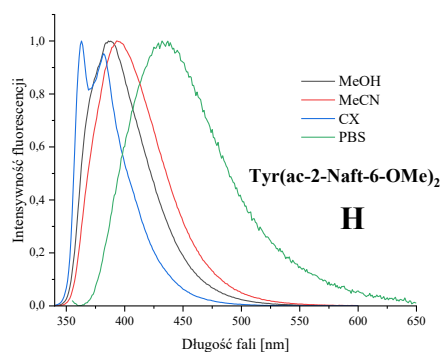
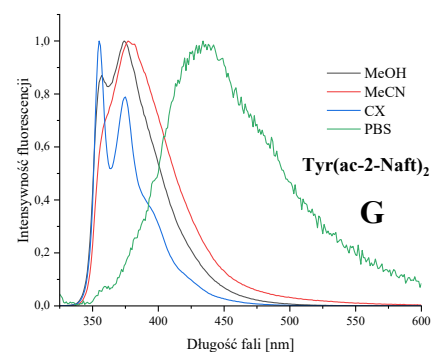
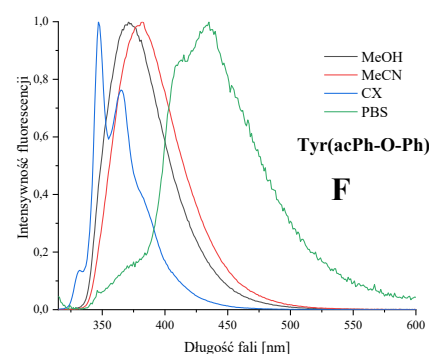
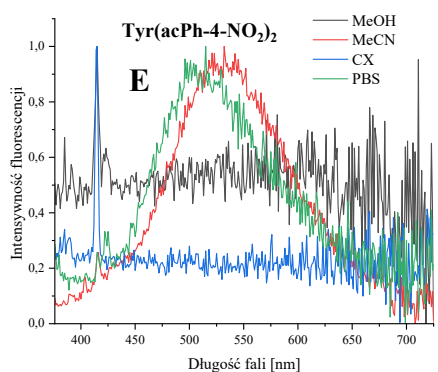
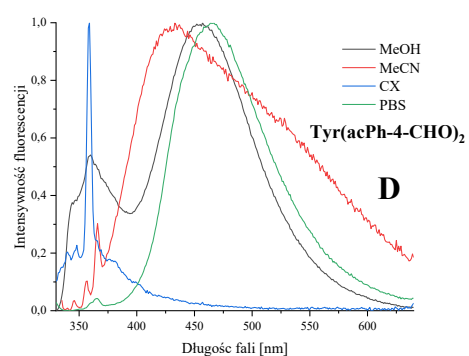
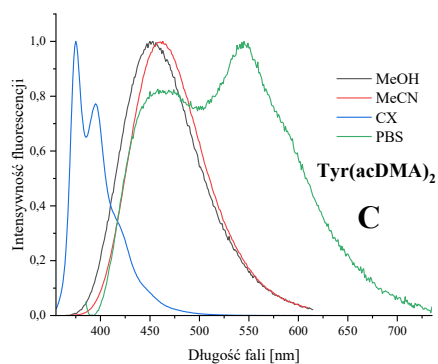
Dodatkowych informacji na temat heterogeniczności badanych układów dostarcza prezentowane wcześniej, porównanie widm wzbudzenia fluorescencji z odpowiadającymi im widmami absorpcji. W przypadku wybranych związków (m.in. Tyr(acDMA) w PBS (Rysunek 90: D), Tyr(acPh-4-CHO) w MeCN, MeOH i CX (Rysunek 91: A, B, C), Tyr(acPh-O-Ph) w PBS (Rysunek 92: D), Tyr(acPh-4- NO_2) w MeOH, CX i PBS (Rysunek 93: B, C, D) oraz Tyr(acPhacDMA) w MeOH (Rysunek 96: B)) nie obserwuje się pełnego pokrycia obu widm. Brak zgodności pomiędzy widmami absorpcji i wzbudzenia wskazuje na obecność w stanie podstawowym wielu współistniejących form molekularnych, różniących się efektywnością wzbudzenia oraz dalszą dynamiką relaksacji. W konsekwencji selektywne wzbudzanie poszczególnych populacji prowadzi do obserwacji zróżnicowanych ścieżek dezaktywacji wzbudzonego stanu, co pozostaje zgodne z wieloskładnikowym charakterem zaniku fluorescencji obserwowanym w pomiarach czasowo-rozdzielczych.

Ponadto, obserwowane przesunięcia długofalowe pasm absorpcji względem widm wzbudzenia mogą wskazywać na obecność niefluoryzujących lub słabo fluoryzujących konformerów w stanie podstawowym, które charakteryzują się odmiennym rozkładem ładunku w cząsteczce. Takie zróżnicowanie populacji w stanie podstawowym bezpośrednio przekłada się na heterogeniczność stanów wzbudzonych, manifestującą się w postaci wieloeksponencjalnych zaników fluorescencji.

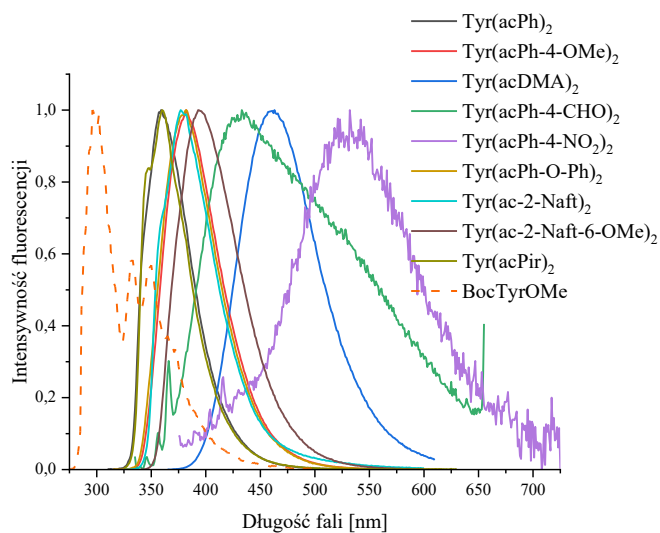
3.4. Właściwości fotofizyczne pochodnych symetrycznych

Zakres widm emisyjnych (Rysunek 97, 98) symetrycznych analogów aminokwasów niebiałkowych z fragmentem tyrozyny zawierających wiązanie potrójne jest różnorodny i wyraźnie zależny od rodzaju podstawnika oraz od charakteru rozpuszczalnika. W przypadku pochodnych Tyr(acPh)₂ oraz Tyr(acPir)₂ (Rysunek 97: A, I) długofalowa część widma nie przekracza 550 nm w żadnym z analizowanych środowisk, a w rozpuszczalnikach MeOH, MeCN oraz CX jest przesunięta o ok. 75 nm w stronę fal krótkich. Najbardziej długofalowym przesunięciem krawędzi widma emisji, nieco powyżej 700 nm, charakteryzuje się pochodna zawierające dodatkowo w podstawniku fenylowym grupę elektronodonorową - Tyr(acDMA)₂ oraz elektronoakceptorową - Tyr(acPh-4-NO₂)₂ (Rysunek 97: C, E). Przy czym w tym pierwszym przypadku dotyczy to wyłącznie środowiska wodnego. Rozpuszczalnik wykazuje najmniejszy wpływ na położenie pasma emisji pochodnej Tyr(acPir)₂ (Rysunek 97: I). Dla pozostałych pochodnych wyraźnie obserwuje się trend przesuwania krawędzi emisji ku dłuższym falom wraz ze wzrostem polarności otoczenia. Efekt ten jest szczególnie widoczny w rozpuszczalniku PBS, dla którego we wszystkich przypadkach odnotowano największe przesunięcie batochromowe. Wyjątek stanowi pochodna Tyr(Ph-4-CHO)₂, dla której najbardziej długofalowe przesunięcie krawędzi widma zaobserwowano w rozpuszczalniku MeCN (Rysunek 97: D). Wspólną cechą wszystkich omawianych widm emisji jest rozmywanie struktury oscylacyjnej w rozpuszczalnikach polarnych (Rysunek 97).

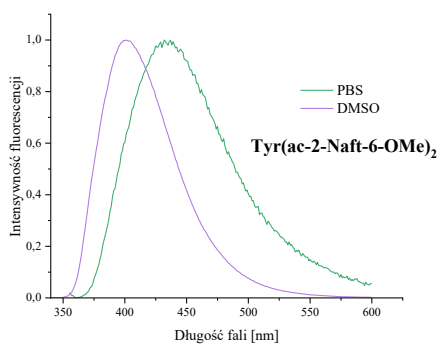




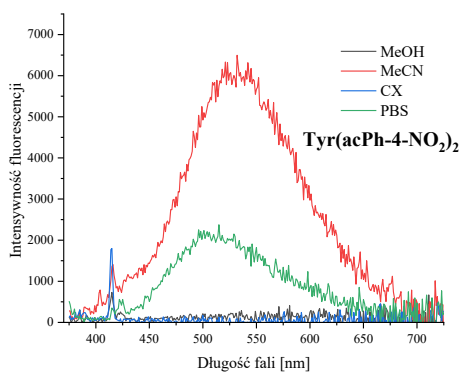
Rysunek 97. Znormalizowane widma emisji symetrycznych acetylenowych pochodnych tyrozyny zmierzone w MeOH, MeCN, CX, PBS.



Rysunek 98. Zestawienie znormalizowanych widm emisji pochodnych symetrycznych zmierzonych w MeCN.



Rysunek 99. Znormalizowane widma emisji wybranej symetrycznej acetylenowej pochodnej tyrozyny zmierzone w PBS i DMSO.



Rysunek 100. Widma emisji Tyr(acPh-4-NO₂)₂ zmierzone w MeOH, MeCN, CX, PBS.

Maksima widm emisji wyznaczone dla pochodnych symetrycznych mieszczą się w zakresie od 340 nm (dla pochodnej Tyr(acPh)₂; widmo zmierzone w CX) do 545 nm (dla pochodnej Tyr(acDMA)₂; widmo zmierzone w PBS) (Tabela 4). Zauważa się wyraźny wpływ polarności rozpuszczalnika na położenie maksimów widm emisji. W większości przypadków wzrost polarności rozpuszczalnika powoduje przesunięcie maksimów widm emisji w stronę dłuższych fal, analogicznie jak dla omawianych wcześniej długofalowych krawędzi (Rysunek 97, Tabela 4).

W celu oceny wpływu dodatku DMSO do buforu PBS na położenie widma emisyjnego wykonałam dla wybranej pochodnej (Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂) dodatkowe pomiary w DMSO. Zestawienie porównawcze widm zaprezentowano na Rysunku 99. Widoczne jest wyraźnie większe batochromowe przesunięcie maksimum fluorescencji w PBS z dodatkiem DMSO niż w czystym DMSO, co wskazuje na silniejszą stabilizację stanu wzbudzonego w tym środowisku, prawdopodobnie wynikającą z oddziaływań z wodą i jonami obecnymi w buforze.

W przypadku pochodnej Tyr(acPh-4-CHO)₂ na widmie fluorescencji obserwowane są dwa pasma emisji, co sugeruje obecność co najmniej dwóch fluorescencyjnych form w stanie wzbudzonym (Rysunek 97: D). Interpretację tę wspierają również dalsze badania, obejmujące niepełną zgodność widm wzbudzenia z widmami absorpcji oraz dwuwykładniczy charakter zaniku fluorescencji.

Wartości przesunięcia Stokesa są zróżnicowane i uzależnione od polarności otoczenia. Największa wartość przesunięcia Stokesa została wyznaczona dla pochodnej symetrycznej Tyr(acPh-4-NO₂)₂ i wyniosła ponad 9000 cm⁻¹ w MeCN (Tabela 4). Najniższą wartością przesunięciem Stokesa równą 2412 cm⁻¹ wyznaczono dla Tyr(ac-2-Naft)₂.

W przypadku pochodnej Tyr(acPh-4-NO₂)₂ środowisko wpływa nie tylko znacząco na zakres i położenie maksimów oraz przesunięcie Stokesa, ale także na intensywność fluorescencji. Zauważalne jest obniżenie intensywności fluorescencji tej pochodnej w MeOH, CX, PBS (Rysunek 100).

Wartości wydajności kwantowej fluorescencji były na ogół wysokie i w większości przypadków przekraczały 40 %. Niższe wydajności kwantowe fluorescencji wyznaczono dla Tyr(acPh-4-OMe)₂ w PBS (QY = 7 %), Tyr(acPh-4-CHO)₂ w PBS (QY = 6 %), w CX (<1 %, związek praktycznie nie fluoryzuje), Tyr(acDMA)₂ w PBS (QY = 7 %) oraz Tyr(ac-2-Naft)₂ w PBS (10 %) (Tabela 4). Szczególnie silne wygaszenie fluorescencji obserwowano dla pochodnej Tyr(acPh-4-NO₂)₂, dla której wydajności kwantowe

fluorescencji w MeOH, CX i PBS były znikome. Warto natomiast zauważyć, że w przypadku pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂ parametr ten wynosił 100 % we wszystkich zbadanych rozpuszczalnikach, a dla pochodnej Tyr(ac-2-Naft)₂ był maksymalny w rozpuszczalniku polarnym protycznym i niepolarnym, a w rozpuszczalniku polarnym aprotycznym był tylko o 2 % mniejszy (Tabela 4).

Jasność świecenia osiągnęła maksymalnie około 80000 (dla pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂, wartość wyznaczona w PBS). W większości przypadków przekraczała 10000, przy czym dla pochodnej Tyr(ac-2-Naft)₂ wynosiła ponad 40000 w MeCN, MeOH i CX. Najniższe wartości jasności świecenia odnotowano dla pochodnej Tyr(acPh-4-NO₂)₂ (89 w MeOH, 967 w PBS oraz 6 w CX) oraz dla pochodnej Tyr(acPh-4-CHO)₂ (385 w PBS oraz 24 w CX) (Tabela 4). Podstawniki wprowadzone asymetrycznie o charakterze elektronodonorowym (acDMA, ac-2-Naft-6-OMe) korespondują z wyższymi wydajnościami kwantowymi fluorescencji, a podstawniki elektronoakceptorowe (acPh-4-NO₂, acPh-4-CHO) powodują batochromowe przesuwanie krawędzi widma emisji.

W przeciwieństwie do pochodnych asymetrycznych, dla których bardziej wyraźna względem widm absorpcyjnych struktura oscylacyjna widm fluorescencji była obserwowana w większości badanych rozpuszczalników, w przypadku omawianych pochodnych efekt ten występował wyłącznie w cykloheksanie. Może to wynikać zarówno z mniejszego poszerzenia pasm emisyjnych i słabszych oddziaływań solwatacyjnych w niepolarnym środowisku, jak i z ograniczenia relaksacji geometrycznej w stanie wzbudzonym.

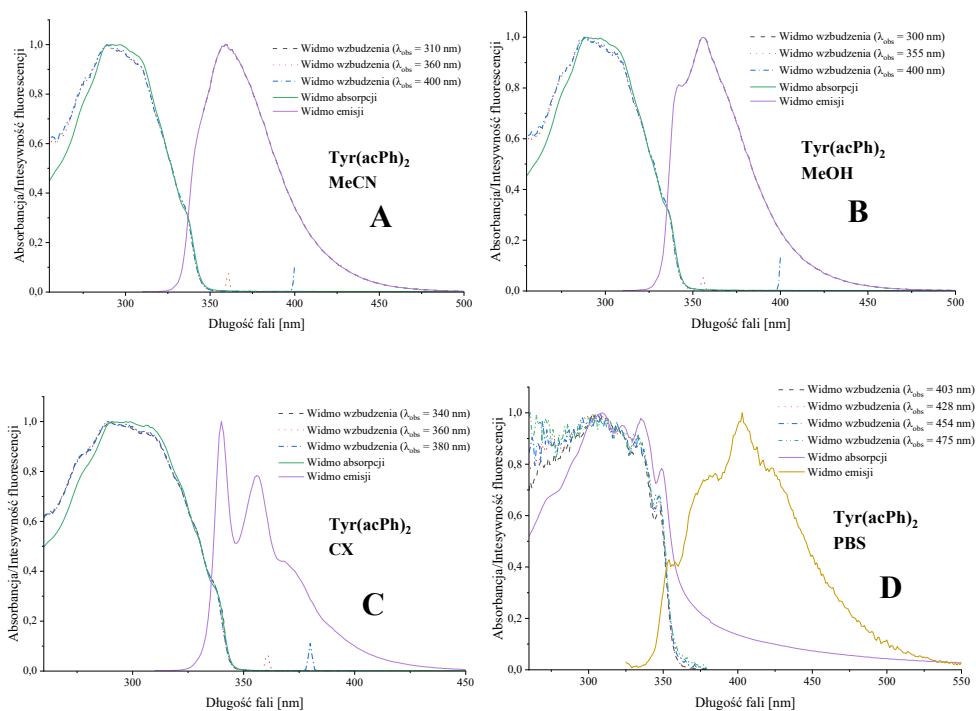
Tabela 4. Właściwości spektralne i fotofizyczne symetrycznych acetylenowych pochodnych tyrozyny.

Związek	Rozpuszalnik	$\lambda_{\text{abs max}}$ [nm]	$\lambda_{\text{em max}}$ [nm]	ϵ [dm ³ /mol · cm]	Przesunięcie Stokesa [cm ⁻¹]	QY	Jasność $\epsilon \times \text{QY}$
Tyr(acPh) ₂	MeCN	292	359	29920	6391	0,58	17355
	MeOH	289	356	29990	6512	0,32	9598
	CX	297	340	27350	4258	0,38	10393
	PBS	309/335	403	19560/19140	5037	0,46	8803
Tyr(acPh-4-OMe) ₂	MeCN	302	382	30450	6935	0,56	17052
	MeOH	302	377	30450	6587	0,48	14616
	CX	303	346	26390	4102	0,55	14513
	PBS	357	406	16430	3381	0,11	1807
Tyr(acDMA) ₂	MeCN	340	463	42600	7814	0,79	33656
	MeOH	338	450	41790	7364	0,23	9611
	CX	336	375	39890	3095	0,97	38690
	PBS	354	545	11080	9900	0,07	776
Tyr(acPir) ₂	MeCN	309	360	30420	4585	0,41	12470
	MeOH	311	364	31240	4682	0,13	4061
	CX	310	343	29930	3103	0,46	13767
	PBS	311	367	28130	4906	0,15	4220
Tyr(acPh-4-CHO) ₂	MeCN	337	433	54170	6579	0,017	1083
	MeOH	336	457	47020	7880	0,055	2821
	CX	338	359	12130	1731	0,002	24
	PBS	345	464	6420	7434	0,06	385
Tyr(acPh-O-Ph) ₂	MeCN	302	382	45780	6935	0,64	29300
	MeOH	303	371	48490	6049	0,45	21821
	CX	309	347	50880	3544	0,66	33583
	PBS	308	435	20380	9479	0,12	2446
Tyr(acPh-4-NO ₂) ₂	MeCN	352	532	34430	9612	0,07	2410
	MeOH	350	415	34420	4475	0,0025	86
	CX	351	415	3550	4394	0,0018	6
	PBS	370	515	19330	7610	0,05	967
Tyr(ac-2-Naft) ₂	MeCN	327	377	46620	4056	0,98	45686
	MeOH	325	374	23560	4031	1	23563
	CX	327	355	22920	2412	1	22922
	PBS	334	434	27040	6898	0,1	2704
Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) ₂	MeCN	326	393	53790	5229	1	53795
	MeOH	325	386	56310	4660	1	56308
	CX	326	363	49300	3127	1	49304
	PBS	334	432	79280	5002	1	79278

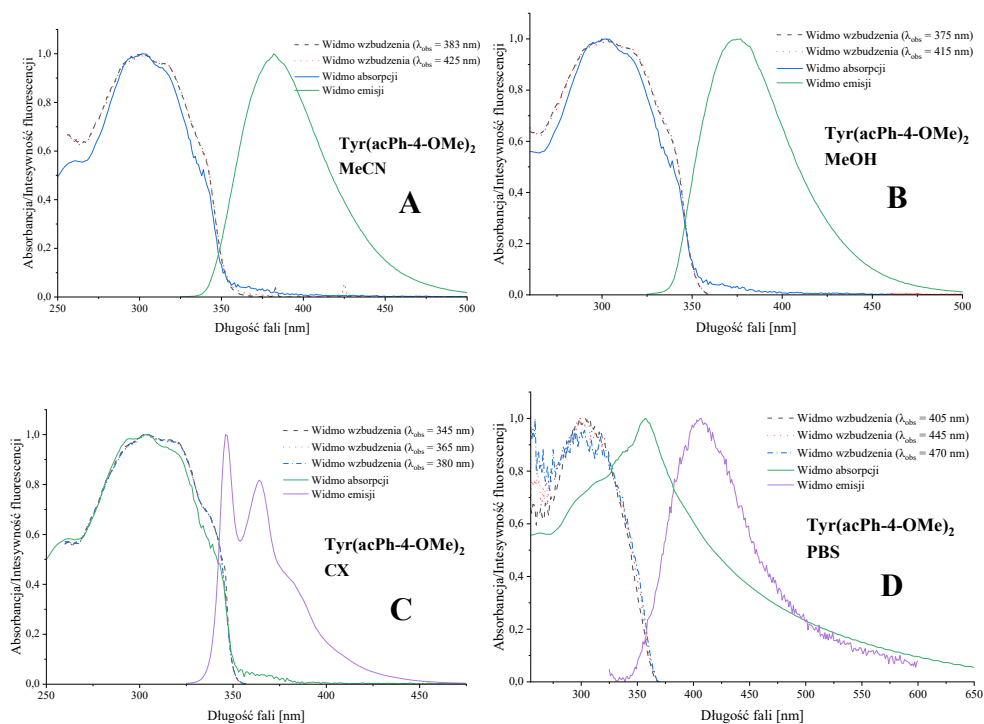
Podobnie jak w przypadku asymetrycznych acetylenowych pochodnych tyrozyny, w celu pogłębionej analizy stanu wzbudzonego oraz weryfikacji jednorodności źródła emisji zmierzyłam także widma wzbudzenia wszystkich pochodnych symetrycznych analogów aminokwasów niebiałkowych z fragmentem tyrozyny zawierających wiązanie

potrójne we wszystkich analizowanych rozpuszczalnikach dla różnych długości fali obserwacji. Widma wzbudzenia pochodnych Tyr(acPh)₂, Tyr(acDMA)₂, Tyr(acPir)₂, Tyr(Ph-O-Ph)₂, Tyr(ac-2-Naft)₂ oraz Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂, niezależnie od długości fali obserwacji emisji, praktycznie pokrywają się z odpowiadającymi im widmami absorpcyjnymi, co wskazuje, że emisja pochodzi od tej samej formy związku odpowiedzialnej za absorpcję promieniowania (Rysunek 101, 103, 104, 106, 107, 108). Dla obydwóch pochodnych zawierających podstawnik naftylowy nie obserwuje się na widmie wzbudzenia zarejestrowanym w roztworze wodnym 'ogona' widocznego na analogicznym widmie absorpcji (Rysunek 82: G, H, Rysunek 107: D, Rysunek 108: D). Może to sugerować, że w tych warunkach powstają dodatkowe formy absorbujące w obszarze długofalowym, które jednak ulegają bezpromienistej relaksacji. Jeszcze intensywniej jest to widoczne w przypadku pochodnej Tyr(acPh-4-OMe)₂ (Rysunek 102: A, B, C), dla której widma wzbudzenia pokrywają się z odpowiednimi widmami absorpcyjnymi w rozpuszczalnikach MeCN, MeOH i CX, jednak w roztworze wodnym widma wzbudzenia korespondują tylko z krótkofalowym pasmem absorpcji (Rysunek 102: D). Brak odpowiadającego pasma długofalowego na widmie wzbudzenia sugeruje, że zarejestrowana emisja pochodzi od formy absorbującej promieniowanie poniżej 375 nm. Dla pochodnej Tyr(acPh-4-CHO)₂ (Rysunek 105: A) widma wzbudzenia w rozpuszczalniku polarnym aprotycznym (MeCN) pokrywają się z odpowiadającymi im widmem absorpcyjnym. Natomiast w rozpuszczalnikach polarnych protycznych obserwuje się zmiany położenia widm wzbudzenia zależne od długości fali obserwacji (Rysunek 105: B, D). Widma wzbudzenia rejestrowane przy krótkofalowej obserwacji emisji są przesunięte hipsochromowo względem widm absorpcyjnych, podczas gdy widma rejestrowane przy obserwacji długofalowej nakładają się na widma absorpcji. Wskazuje to, że emisja krótko- i długofalowa może pochodzić od różnych form emitujących. Obecność dodatkowej formy w tych warunkach może być związana z tworzeniem wiązań wodorowych pomiędzy grupą formylową związku a grupą hydroksylową rozpuszczalnika. Analiza widm wzbudzenia tej pochodnej w rozpuszczalniku niepolarnym jest utrudniona ze względu na niską intensywność fluorescencji (Rysunek 105: C). Widoczny jest jednak trend hipsochromowego przesuwania się widm wzbudzenia względem widm absorpcji. Oznacza to, że wzbudzenie prowadzące do emisji odpowiada przejściom o wyższej energii niż te związane z długofalową częścią widma absorpcyjnego. Może to sugerować obecność w stanie podstawowym dodatkowych form absorbujących w zakresie długofalowym,

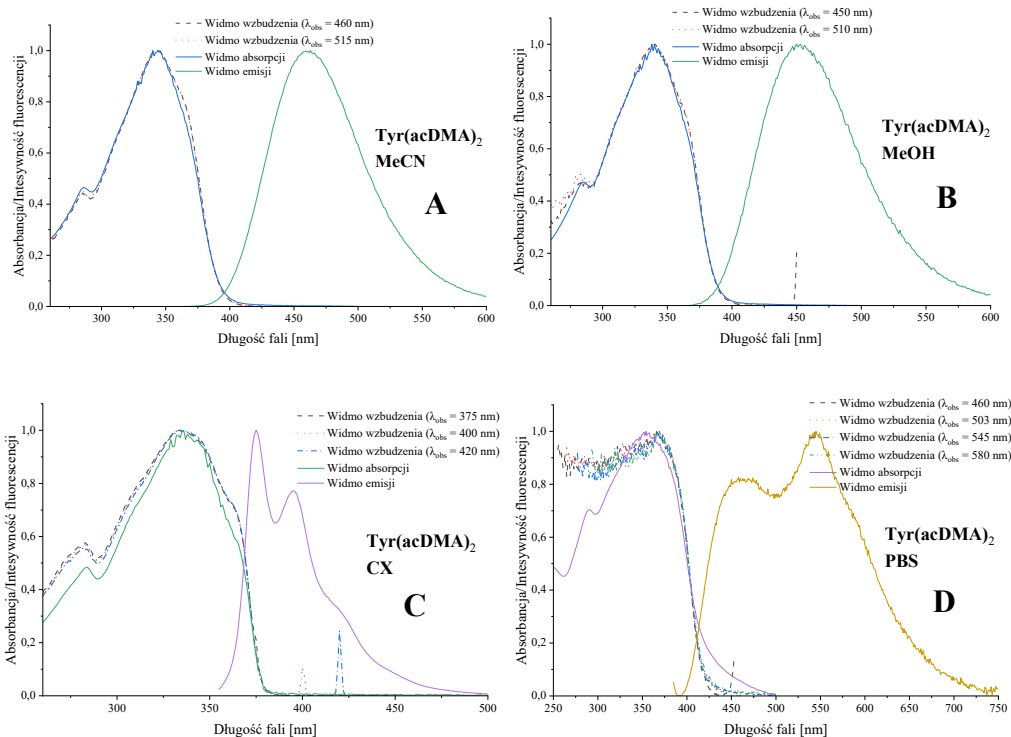
powstających na skutek oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy cząsteczkami związku, które jednak nie wykazują fluorescencji.



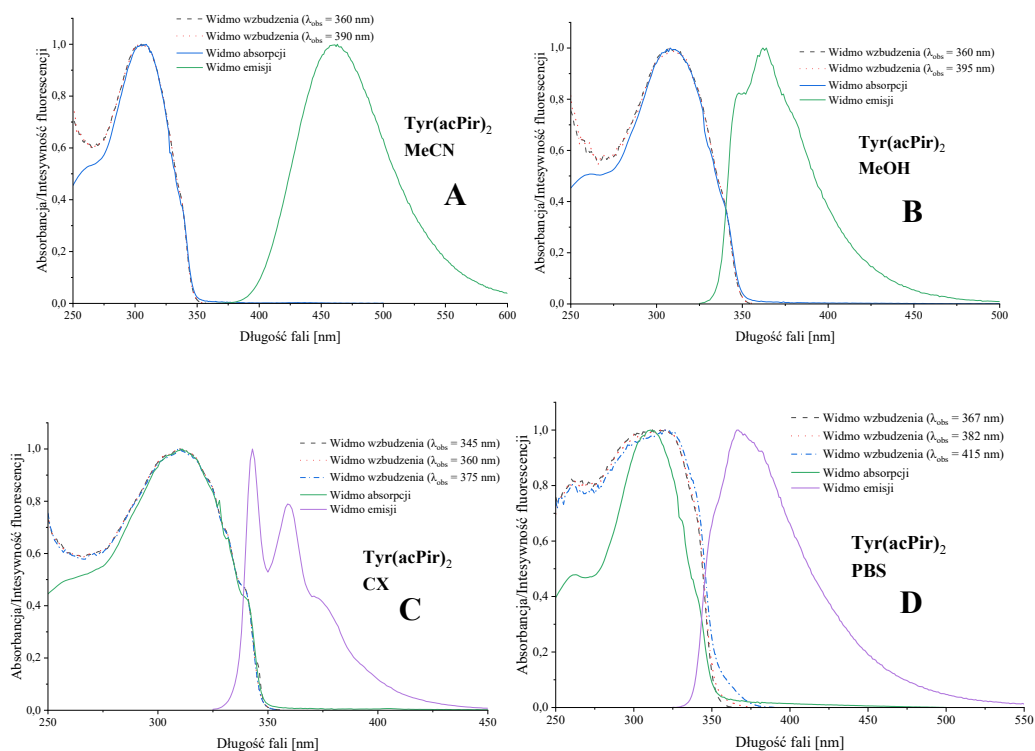
Rysunek 101. Znormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia $\text{Tyr}(\text{acPh})_2$ zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.



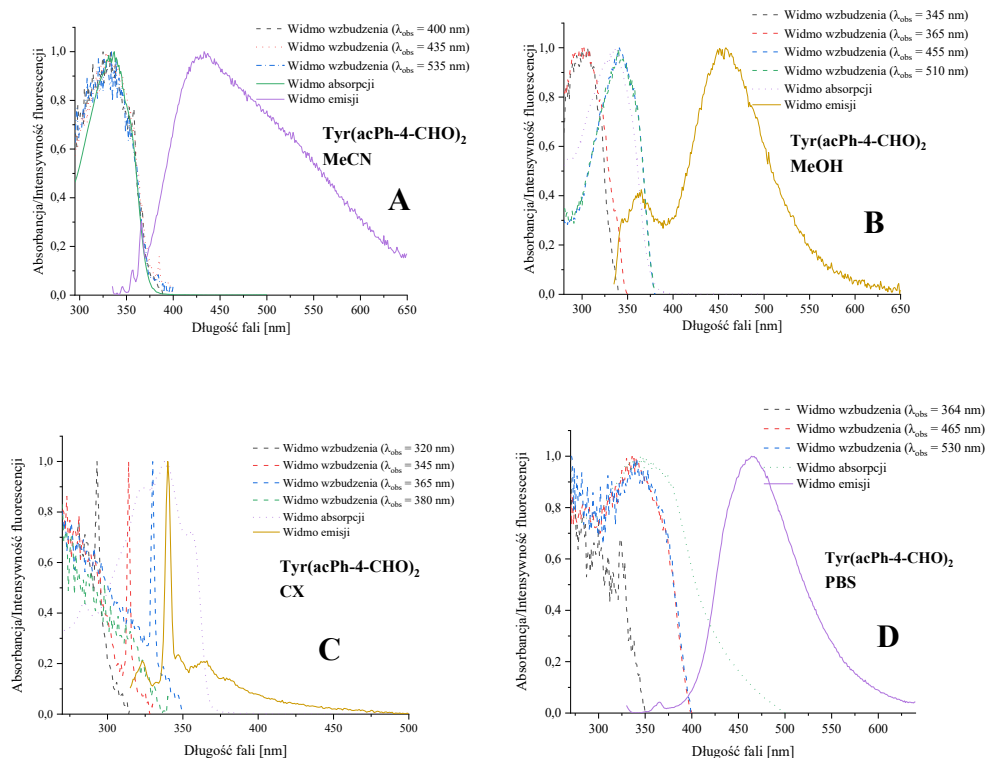
Rysunek 102. Znormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia $\text{Tyr}(\text{acPh-4-OMe})_2$ zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.



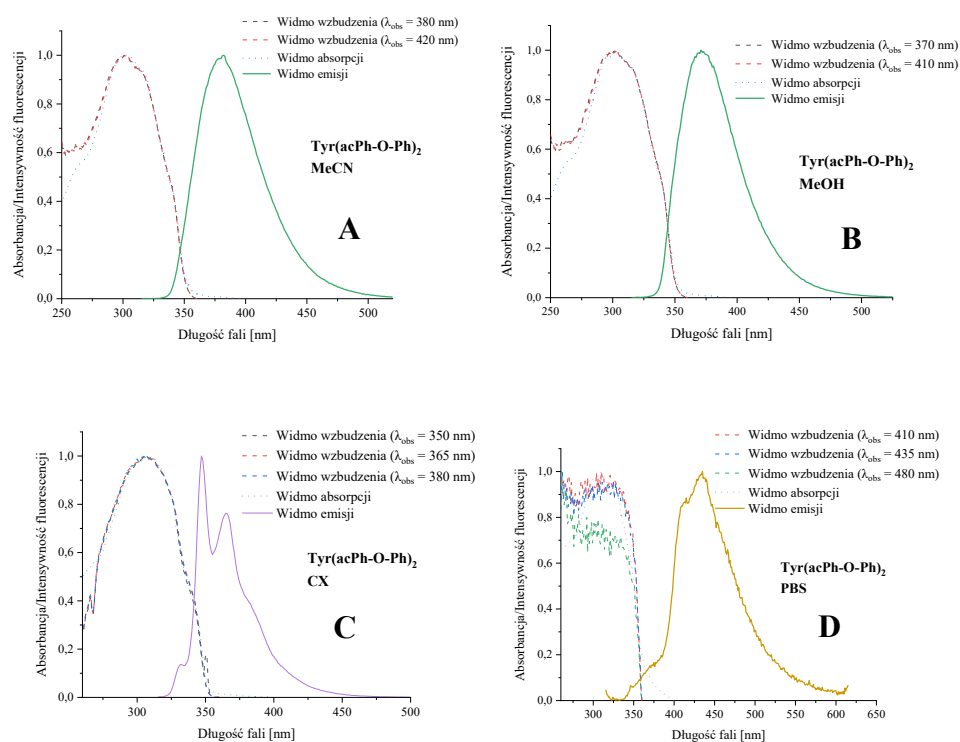
Rysunek 103. Znormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia $\text{Tyr}(\text{acDMA})_2$ zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.



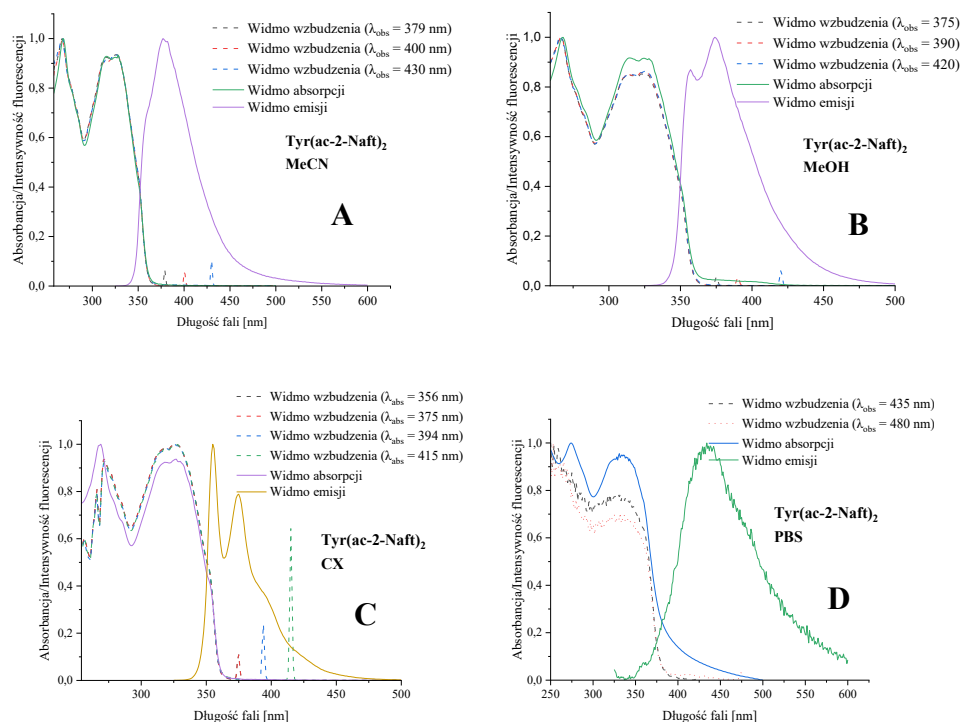
Rysunek 104. Znormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia $\text{Tyr}(\text{acPir})_2$ zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.



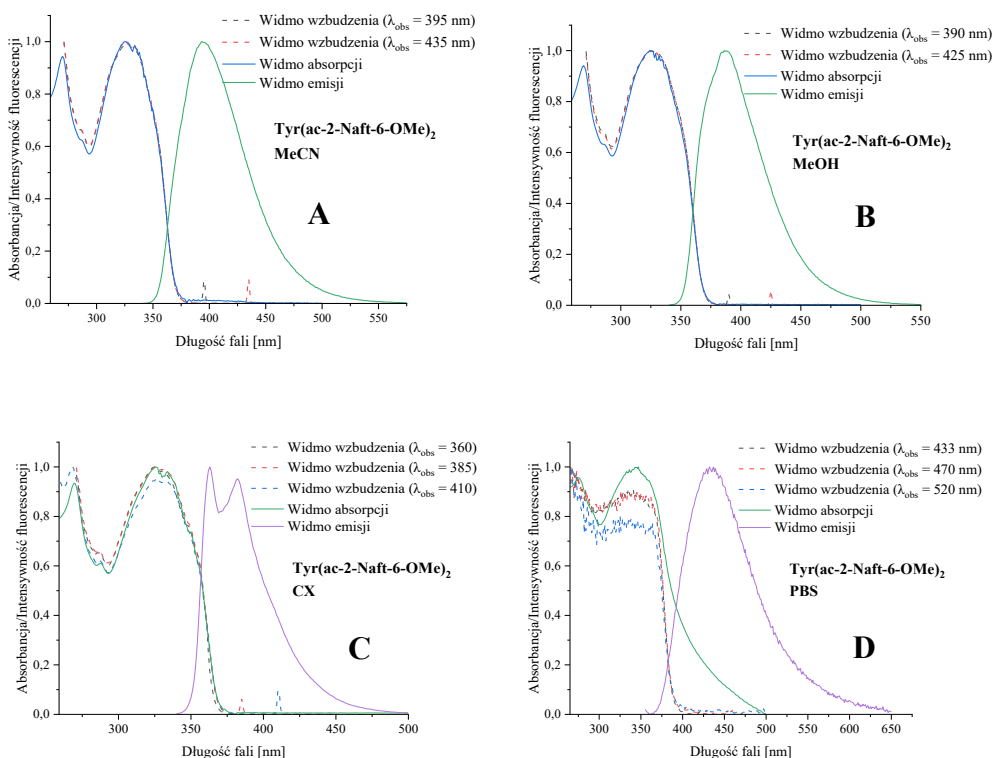
Rysunek 105. Znormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia $\text{Tyr}(\text{acPh-4-CHO})_2$ zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.



Rysunek 106. Znormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia $\text{Tyr}(\text{acPh-O-Ph})_2$ zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.



Rysunek 107. Znormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(ac-2-Naft)₂ zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.



Rysunek 108. Znormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂ zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.

Uzupełnieniem badań stacjonarnych fluorescencji były wykonane przez mnie eksperymenty czasowo-rozdzielcze, dostarczające informacji o czasach życia stanów wzbudzonych oraz o przebiegu procesów relaksacyjnych niewyłaniających się z widm stacjonarnych.

Tabela 5. Czasy zaniku fluorescencji symetrycznych acetylenowych pochodnych tyrozyny.

Związek	Rozpuszczalnik	τ_i [ns]	α_i [%]	χ_R^2
Tyr(acPh) ₂	MeCN	2,730	100,00	0,956
	MeOH	3,160	100,00	0,898
	CX	2,390	100,00	0,911
	PBS	2,511	100,00	6,778
		1,807	94,25	1,091
		6,203	5,75	
Tyr(acPh-4-OMe) ₂	MeCN	2,692	100,00	0,856
	MeOH	2,257	100,00	0,811
	CX	1,897	100,00	0,996
	PBS	2,698	100,00	1,841
		2,426	96,80	0,853
		6,671	3,20	
Tyr(acDMA) ₂	MeCN	3,092	100,00	1,014
	MeOH	1,036	100,00	2,311
		2,451	2,85	0,996
		0,961	97,15	
	CX	1,536	100,00	0,977
	PBS	3,433	100,00	5,485
		2,972	97,00	1,225
		10,749	3,00	
		3,194	72,23	0,968
		0,618	26,25	
		12,796	1,52	
Tyr(acPir) ₂	MeCN	3,488	100,00	0,840
	MeOH	1,144	100,00	1,180
		1,12	99,64	0,863
		4,078	0,36	
	CX	2,389	100,00	0,889
	PBS	1,507	100,00	3,400
		1,404	99,05	0,785
		6,325	0,95	

Tyr(acPh-4-CHO)₂	MeCN	1,555	100,00	2,990
		1,034	95,52	1,108
		4,597	4,48	
	MeOH	1,225	100,00	4,124
		1,080	98,73	0,877
		5,689	1,27	
	CX	2,642	100,00	8,816
		1,823	97,77	1,043
		10,804	2,23	
	PBS	4,092	100,00	11,881
		7,643	15,67	1,618
		1,999	84,33	
		1,443	40,42	1,047
		4,630	45,03	
		14,213	14,55	
Tyr(acPh-O-Ph)₂	MeCN	2,815	100,00	0,782
	MeOH	2,357	100,00	0,821
	CX	1,703	100,00	1,119
		1,575	91,79	0,759
		2,581	8,21	
	PBS	2,913	100,00	7,522
		1,823	94,16	1,100
		6,792	5,84	
		1,547	87,22	0,770
		4,564	12,57	
		19,291	0,21	
Tyr(acPh-4-NO₂)₂	MeCN	2,859	100,00	1,368
		2,625	91,73	0,874
		4,424	8,27	
	MeOH	1,329	100,00	1,559
		1,238	99,33	0,833
		3,904	0,67	
	CX	2,100	100,00	1,497
		1,931	96,99	0,896
		4,465	3,01	
	PBS	1,609	100,00	1,161
		1,540	99,57	1,076
		56,100	0,43	

Tyr(ac-2-Naft)₂	MeCN	3,013	100,00	1,073
	MeOH	3,459	100,00	1,038
	CX	2,531	100,00	1,647
		2,364	96,73	0,856
		5,265	3,27	
	PBS	2,757	100,00	7,961
		6,039	10,64	1,236
		1,561	89,36	
		3,351	18,71	0,815
		1,104	79,32	
		11,588	1,97	
Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂	MeCN	2,631	100,00	0,773
	MeOH	2,461	100,00	0,775
	CX	5,265	100,00	1,830
		6,213	49,64	0,922
		3,803	50,36	
	PBS	4,755	100,00	11,919
		8,994	34,43	1,841
		2,002	65,57	
		4,952	22,34	1,119
		15,974	2,15	
		1,584	75,50	
BocTyrOMe	MeCN	1,404	100,00	5,788
		1,170	98,01	1,103
		4,869	1,99	
	MeOH	1,873	100,00	1,446
		1,734	95,66	1,184
		3,321	4,34	
	CX	2,924	100,00	2,645
		2,700	97,99	1,138
		8,088	2,01	
	PBS	1,963	100,00	2,267
		1,649	92,13	1,150
		3,484	7,87	

Czasy zaniku fluorescencji zmierzyłam w czterech rozpuszczalnikach różniących się polarnością i zdolnością do tworzenia wiązań wodorowych, analogicznie jak w przypadku pomiarów stacjonarnych oraz pochodnych asymetrycznych. Zaobserwowałam zarówno monoeksponeńcjale, jak i heterogeniczne zaniki fluorescencji, zależne od struktury podstawników oraz środowiska rozpuszczalnika (Tabela 5).

W porównaniu z pochodnymi asymetrycznymi, pochodne symetryczne wykazują na ogół bardziej jednorodny charakter zaniku fluorescencji oraz węższy rozkład czasów życia. Może to wskazywać na mniejszą heterogeniczność populacji emitujących, prawdopodobnie wynikającą z bardziej uporządkowanej struktury układu oraz mniejszego zróżnicowania możliwych form konformacyjnych. W większości analizowanych przypadków dominują pojedyncze lub dwuskładnikowe zaniki o relatywnie wąskim zakresie czasów życia, zwykle w przedziale 1,5 - 3,5 ns, co wskazuje na bardziej jednorodny charakter emisji oraz mniejszą heterogeniczność badanych układów. Wprowadzenie symetrycznego podstawienia prawdopodobnie ogranicza liczbę możliwych konfiguracji strukturalnych oraz zmniejsza zróżnicowanie środowisk emitujących. W konsekwencji obserwuje się bardziej skondensowany rozkład czasów życia oraz uproszczenie charakteru zaniku fluorescencji. Jednorodne zaniki fluorescencji obserwuje się szczególnie dla pochodnych Tyr(acPh)₂ oraz Tyr(acPh-4-OMe)₂ w rozpuszczalnikach MeCN, MeOH oraz CX (Tabela 5). W przypadku pozostałych układów przeważanie pojedynczego procesu emisyjnego występuje głównie w acetonitrylu, co wskazuje na wpływ środowiska na stabilizację dominującej populacji emitującej. W pozostałych przypadkach obserwuje się zaniki heterogeniczne, wskazujące na współistnienie kilku populacji emitujących o różnej dynamice relaksacji. Zjawisko to może wynikać z obecności różnych form molekularnych oraz ich odmiennej stabilizacji zależnej od środowiska, a także w niektórych układach z tworzenia słabych asocjatów międzycząsteczkowych w roztworze. W przypadku układów zawierających podstawniki elektronodonorowe lub elektronoakceptorowe, takie jak grupy dimetyloaminowe (DMA) oraz nitrowe (NO₂), w warunkach polarnych (zwłaszcza w PBS) obserwuje się bardziej złożony charakter zaniku fluorescencji, któremu w niektórych przypadkach towarzyszy zwiększony udział dłuższych składowych czasowych (Tabela 5).

Nie obserwuje się jednak jednoznacznej zależności pomiędzy charakterem zaniku fluorescencji a rodzajem podstawnika, co wskazuje, że dynamika relaksacji wzbudzonego stanu jest wynikiem współdziałania efektów strukturalnych i środowiskowych.

W porównaniu z układem referencyjnym BocTyrOMe czasy zaniku fluorescencji badanych pochodnych są wydłużone nawet o 2 - 6 ns, co wskazuje na istotny wpływ modyfikacji strukturalnej w pozycjach 3 i 5 pierścienia fenyłowego tyrozyny na dynamikę relaksacji wzbudzonego stanu.

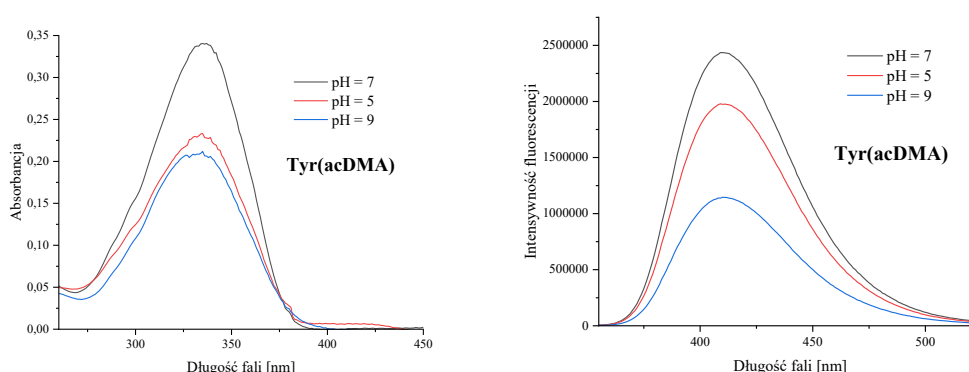
3.5. Wpływ zmian pH na widma absorpcji i emisji wybranych pochodnych asymetrycznych i symetrycznych

Wybrane pochodne, takie jak: Tyr(acDMA), Tyr(acDMA)₂, Tyr(acPir)₂, Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) oraz Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂, zbadalam pod kątem wpływu pH na położenie maksimów oraz zakres widm absorpcji i emisji.

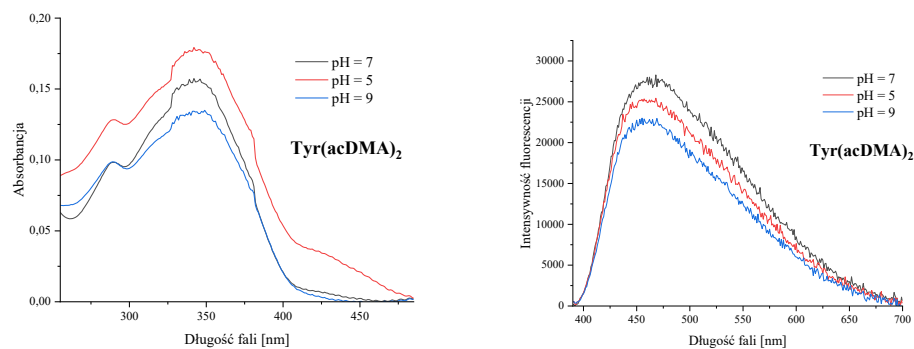
Zmiany pH stanowią istotny parametr fizjologiczny. Ocena odpowiedzi fluorescencyjnej badanych związków na zmiany pH pozwoliła określić zarówno stabilność ich właściwości spektroskopowych w różnych warunkach środowiskowych, jak i ich potencjalną przydatność jako znaczników fluorescencyjnych umożliwiających monitorowanie procesów komórkowych oraz mikrośrodowiska biologicznego w sposób czuły, nieniszczący i przewidywalny.

Związki przebadalam w pH równym 5 i 9, które jest reprezentatywne dla warunków fizjologicznych. Dla pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂ rozszerzyłam badany zakres pH do 2 i 12, co pozwoliło zweryfikować wpływ skrajnych zmian środowiska na jej właściwości spektroskopowe.

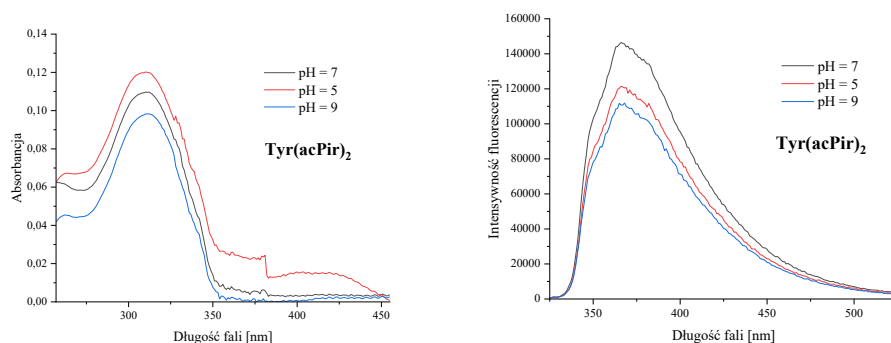
W celu uzyskania pH zasadowego wykorzystałam 1 M roztwór NaOH, a pH kwasowego 0,25 mM roztwór HCl. Widma zmierzyłam w wodzie z dodatkiem 25 % DMSO. Kontrolę stanowiła próbka rozpuszczonego związku bez dodatku kwasu czy zasady (pH = 7). Stężenia poszczególnych próbek badawczych oraz kontrolnych, warunki przygotowywania i przechowywania były identyczne.



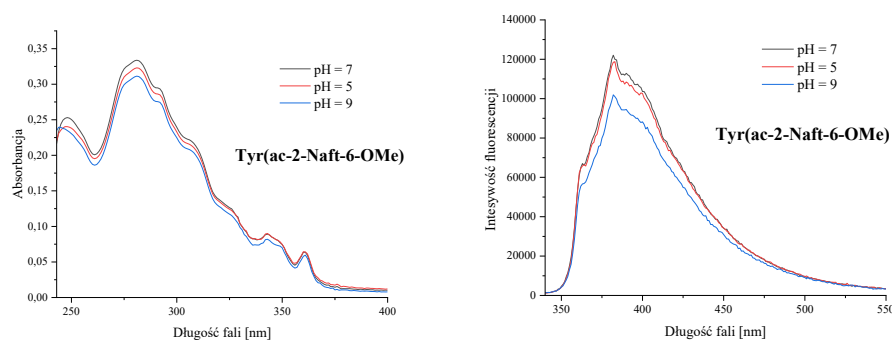
Rysunek 109. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(acDMA) w roztworze wodnym (z dodatkiem 25 % DMSO) o pH = 7, 5 oraz 9.



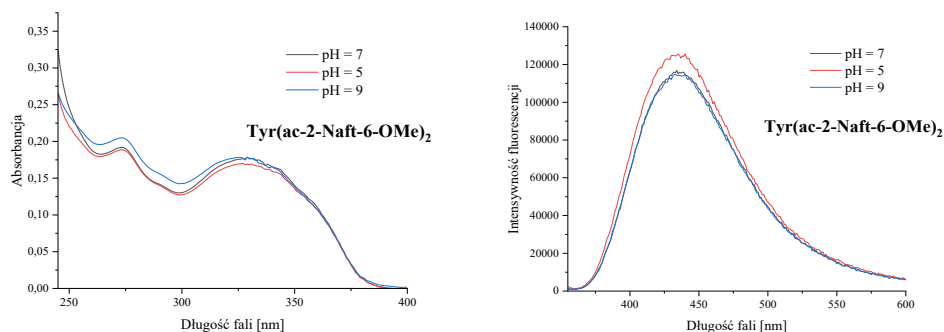
Rysunek 110. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(acDMA)₂ w roztworze wodnym (z dodatkiem 25 % DMSO) o pH = 7, 5 oraz 9.



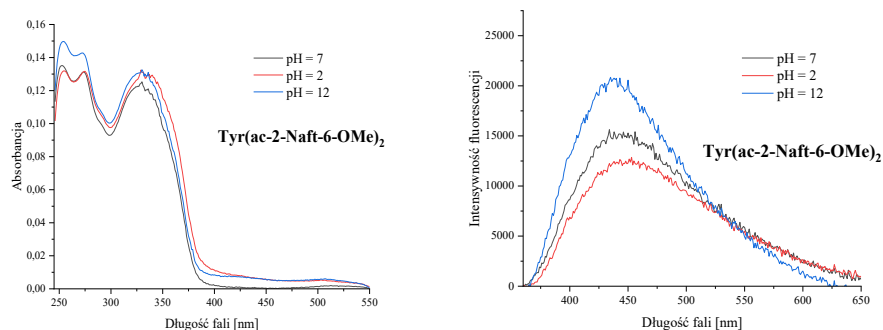
Rysunek 111. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(acPir)₂ w roztworze wodnym (z dodatkiem 25 % DMSO) o pH = 7, 5 oraz 9. Widoczny uskok sygnału na widmie absorpcji wynika z błędu korekcji filtrów wewnętrznych aparatu pomiarowego.



Rysunek 112. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) w roztworze wodnym (z dodatkiem 25 % DMSO) o pH = 7, 5 oraz 9.



Rysunek 113. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂ w roztworze wodnym (z dodatkiem 25 % DMSO) o pH = 7, 5 oraz 9.



Rysunek 114. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂ w roztworze wodnym (z dodatkiem 25 % DMSO) o pH = 7, 2 oraz 12.

Badania nie wykazały znaczącego wpływu zmian pH na położenie maksimum widm absorpcji przebadanych pochodnych (Rysunek 109 - 114). Zauważane są tylko niewielkie zmiany w intensywności pasm w przypadku pochodnych Tyr(acDMA), Tyr(acDMA)₂, Tyr(acPir)₂. Tendencja zmian nie jest jednorodna. Najwyższą absorbancję obserwuje się w kwasowym pH dla pochodnych symetrycznych (Tyr(acDMA)₂ oraz Tyr(acPir)₂; Rysunek 110, 111) oraz w neutralnym pH dla pochodnej asymetrycznej (Tyr(acDMA); Rysunek 109). Dla Tyr(acDMA)₂ oraz Tyr(acPir)₂ widoczne jest także powstawanie nowego pasma długofalowego w roztworze o pH równym 5 (Rysunek 110, 111). Pochodna Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂ w przypadku pH 2 i 12 charakteryzowała się niewielkim wzrostem absorbancji (Rysunek 114). Dla pozostałych przypadków wpływ pH na charakterystykę spektralną jest marginalny (Rysunek 112 - 114).

Zmiany pH również nie wpłynęły wyraźnie na położenie maksimum widm emisji, natomiast widoczny jest ich niewielki wpływ na intensywność fluorescencji (Rysunek 109 - 114). W większości przypadków intensywność fluorescencji malała wraz ze

wzrostem pH, co najbardziej zauważalne jest na widmach emisji związku Tyr(acDMA) (Rysunek 109). Na widmach pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂ największą intensywnością fluorescencji charakteryzował się roztwór o pH = 12 (Rysunek 114). Dla tego związku intensywność fluorescencji po znaczącym obniżeniu pH nie uległa drastycznej zmianie w porównaniu do próbki kontrolnej (o pH = 7) (Rysunek 114).

Istotne jest, że we wszystkich badanych roztworach o zmiennym pH obserwowano fluorescencję, co potwierdza stabilność i uniwersalność właściwości emisyjnych analizowanych związków. Dodatkowo brak istotnych zmian położenia maksimów absorpcji i emisji przy jednoczesnych zmianach intensywności fluorescencji wskazuje, że w badanym zakresie pH nie dochodzi do znaczącej zmiany charakteru stanu emitującego, a zmianom ulega przede wszystkim efektywność procesu emisji.

3.6. Wpływ obecności reduktora i utleniacza na widma absorpcji i emisji wybranych pochodnych asymetrycznych i symetrycznych

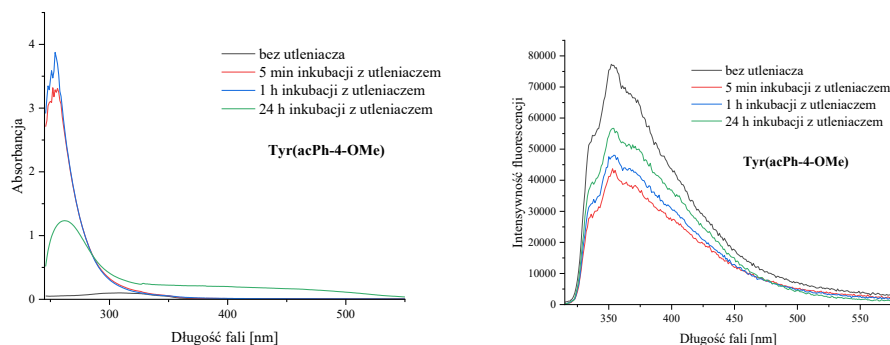
Biorąc pod uwagę korzystne właściwości fotofizyczne oraz potencjalną możliwość zastosowania badanych pochodnych jako znaczników fluorescencyjnych w układach biologicznych, wybrane związki poddano analizie wrażliwości na obecność utleniacza i reduktora. Środowisko komórkowe charakteryzuje się dynamiczną równowagą procesów utleniania i redukcji, odgrywającą kluczową rolę w regulacji wielu szlaków metabolicznych oraz rozwoju stanów patologicznych. Ocena zmian sygnału fluorescencyjnego badanych pochodnych w warunkach oksydacyjnych i redukcyjnych pozwoliła określić ich wrażliwość na zmiany stanu redoks oraz potencjalną przydatność do monitorowania procesów biologicznych.

- **Badanie wpływu utleniacza na widma absorpcji i emisji**

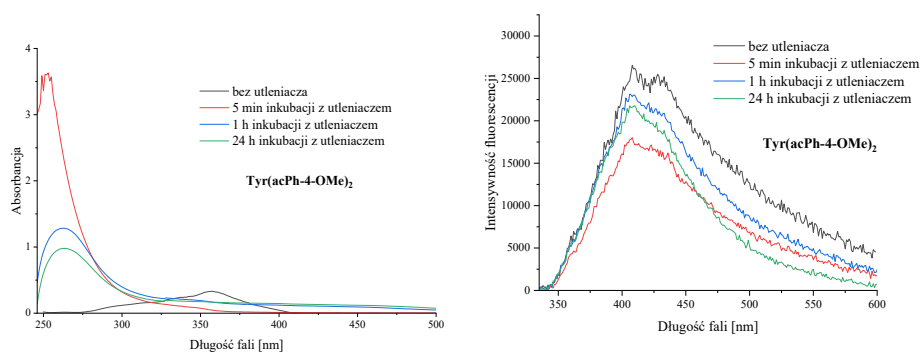
Weryfikację wpływu czynnika utleniającego na widma absorpcji i emisji przeprowadziłam dla pochodnych: Tyr(acPh-4-OMe), Tyr(acPh-4-OMe)₂, Tyr(ac-2-Naft-6-OMe), Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂.

Widma mierzyłam w środowisku odwzorowującym otoczenie fizjologiczne (PBS z dodatkiem 25% DMSO poprawiającym rozpuszczalność wybranych pochodnych). Jako modelowy utleniacz został wykorzystany nadtlenek wodoru (H₂O₂), a jego stężenie we wszystkich badanych próbkach wynosiło 1,6 M. Dla każdego z wybranych związków pomiary wykonywałam po czasie 5 min, 60 min oraz 24 h od

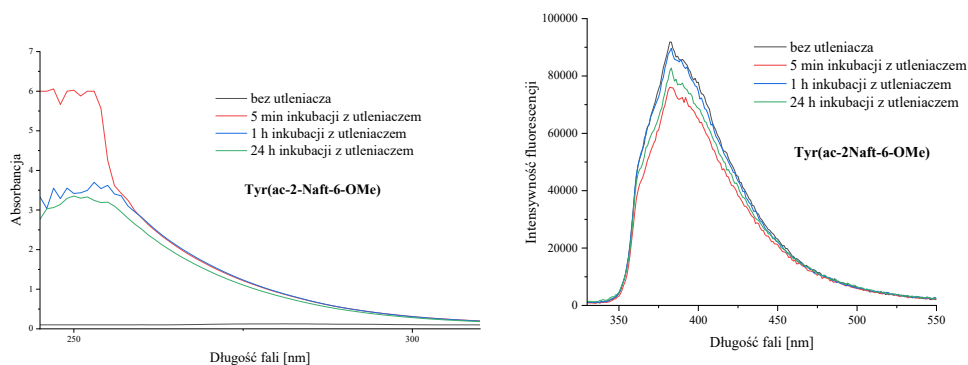
momentu dodania utleniacza do badanych układów. Próbkę badawczą oraz kontrolne inkubowałam w temperaturze od 38 do 40 °C. Kontrolę stanowiła próbka rozpuszczonego związku bez dodatku utleniacza. Stężenia poszczególnych próbek badawczych oraz kontrolnych, warunki przygotowywania i przechowywania były identyczne.



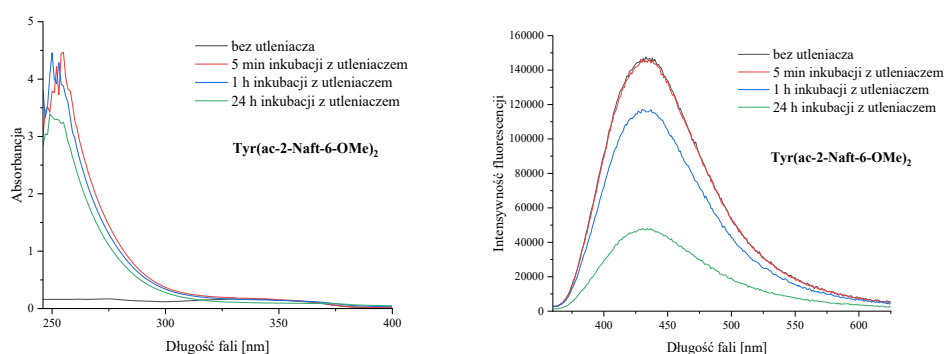
Rysunek 115. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(acPh-4-OMe) w roztworze buforowanym (PBS) z dodatkiem DMSO, w obecności utleniacza, zarejestrowane po określonym czasie.



Rysunek 116. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(acPh-4-OMe)₂ w roztworze buforowanym (PBS) z dodatkiem DMSO, w obecności utleniacza, zarejestrowane po określonym czasie.



Rysunek 117. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) w roztworze buforowanym (PBS) z dodatkiem DMSO, w obecności utleniacza, zarejestrowane po określonym czasie.



Rysunek 118. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂ w roztworze buforowanym (PBS) z dodatkiem DMSO, w obecności utleniacza, zarejestrowane po określonym czasie.

Widma absorpcji wszystkich zbadanych pochodnych (Rysunek 115 - 118) wykazują bardzo podobny profil zmian w obecności utleniacza. Maksima widm absorpcji w każdym przypadku przesunęły się hipsochromowo względem kontroli. Dodatkowo intensywność absorpcji znacznie wzrosła. Znaczące zmiany na widmach absorpcji były widoczne już po 5 minutach inkubacji, a wydłużanie czasu traktowania próbek utleniaczem powodowało już tylko spadek absorbancji (Rysunek 115 - 118).

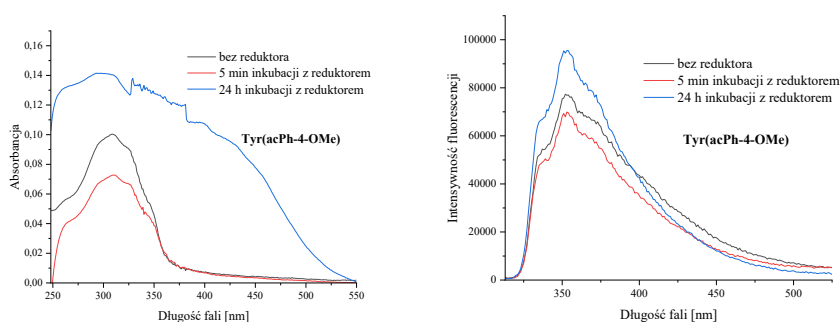
Widma emisji (Rysunek 115 - 118) charakteryzują się znacznie mniejszą wrażliwością na wpływ utleniacza. Położenie maksimów emisji zbadanych pochodnych nie uległo zmianie nawet po 24 h inkubacji z utleniaczem. Widoczne zmiany intensywności wskazują jednak, że chociaż energia stanu wzbudzonego jest stabilna, efektywność fluorescencji może ulegać częściowej modulacji pod wpływem utleniacza, wynikiem

czego jest osłabienie intensywności fluorescencji pochodzącej od formy nieutlenionej badanego związku. Najbardziej widoczne jest to w przypadku pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂ (Rysunek 118), dla której intensywność fluorescencji po 24 h zmniejszyła się o około 70 %. W przypadku pochodnych Tyr(acPh-4-OMe) i Tyr(acPh-4-OMe)₂ (Rysunek 115 i 116) widmo emisji po 24 h zmniejszyło swoją intensywność o około 25 %, a dla pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) o nieco ponad 10 % (Rysunek 117). Warto podkreślić, że we wszystkich analizowanych przypadkach nawet po najdłuższym okresie inkubacji profil emisji był niezmienny, a jej intensywność była rejestrowalna.

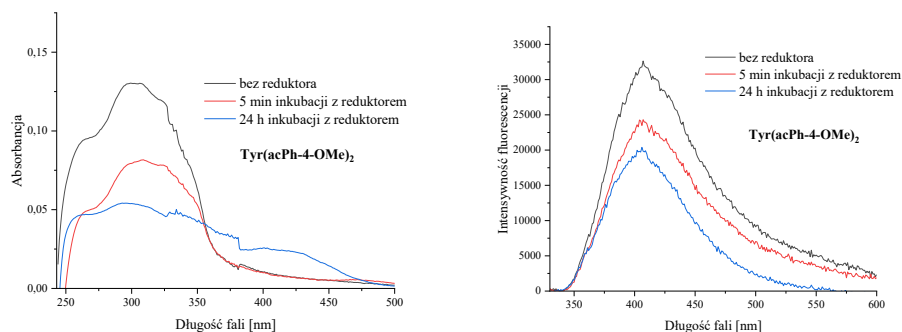
- **Badanie wpływu reduktora na widma absorpcji i emisji**

Weryfikacja wpływu czynnika redukującego na widma absorpcji i emisji przeprowadziłam dla pochodnych: Tyr(acPh-4-OMe), Tyr(acPh-4-OMe)₂, Tyr(ac-2-Naft-6-OMe), Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂.

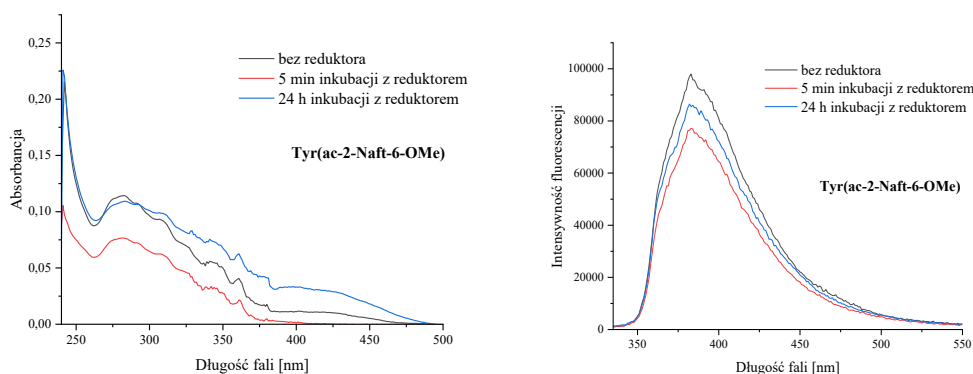
Widma zostały zmierzone w środowisku odwzorowującym otoczenie fizjologiczne (PBS z dodatkiem 25% DMSO). Jako modelowy reduktor wykorzystałam H₂S generowany na skutek hydrolizy Na₂S o stężeniu 1×10^{-5} M. Rzeczywiste stężenie reduktora w badanych układach wyznaczyłam za pomocą metody Ellmana używając odczynnika DNTB i dokonując pomiaru absorbancji powstającego TNB przy długości fali równej 412 nm. Wyznaczone w ten sposób stężenie molowe reduktora w badanych próbkach wyniosło $1,65 \times 10^{-4}$ M. Próbkki badane oraz kontrolne zawierały identyczne stężenia rozpuszczonych związków i były inkubowane w temperaturze około 38 - 40 °C. Kontrolę stanowiła próbka badanego związku bez dodatku reduktora. Warunki przygotowania i przechowywania wszystkich próbek były jednakowe. Widma absorpcji i emisji rejestrowano po 5 min oraz po 24 h od dodania reduktora.



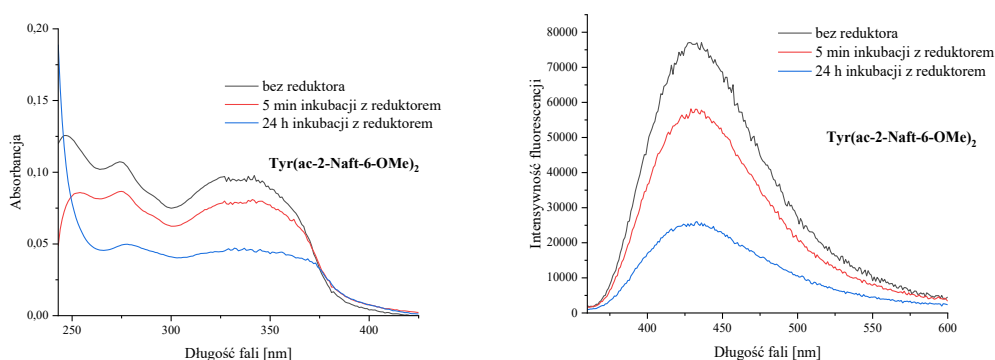
Rysunek 119. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(acPh-4-OMe) w roztworze buforowanym (PBS) z dodatkiem DMSO, w obecności reduktora, zarejestrowane po określonym czasie.



Rysunek 120. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej $\text{Tyr}(\text{acPh-4-OMe})_2$ w roztworze buforowanym (PBS) z dodatkiem DMSO, w obecności reduktora, zarejestrowane po określonym czasie.



Rysunek 121. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej $\text{Tyr}(\text{ac-2-Naft-6-OMe})$ w roztworze buforowanym (PBS) z dodatkiem DMSO, w obecności reduktora, zarejestrowane po określonym czasie.



Rysunek 122. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej $\text{Tyr}(\text{ac-2-Naft-6-OMe})_2$ w roztworze buforowanym (PBS) z dodatkiem DMSO, w obecności reduktora, zarejestrowane po określonym czasie.

Maksima oraz zakres widm absorpcji (Rysunek 119 - 122) badanych pochodnych w większości przypadków zmieniają się w niewielkim stopniu. Zauważalne zmiany w intensywności widm absorpcji oraz ich zakresie widoczne są dla pochodnej asymetrycznej i symetrycznej podstawionej aniozolem (Rysunek 119 i 120). Dla pozostałych związków wpływ reduktora ogranicza się do modulacji intensywności absorpcji, natomiast położenie maksimum widma pozostaje niezmienione. Zauważalna jest jednak różna tendencja tych zmian między poszczególnymi związkami. W przypadku pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂ widoczny jest spadek (Rysunek 122), a dla pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) wzrost absorbancji po 24 h traktowania próbki reduktorem (Rysunek 121).

Maksima widm emisji (Rysunek 119 - 122) nie uległy przesunięciu nawet po 24 h inkubacji próbki w warunkach redukcyjnych. Zauważalnie zmienia się natomiast intensywność fluorescencji. Największe obniżenie intensywności fluorescencji po 24 h inkubacji o około 70 % zaobserwowano dla Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂ (Rysunek 122). W przypadku Tyr(acPh-4-OMe)₂ (Rysunek 120) intensywność fluorescencji zmniejszyła się o około 40 %, a dla Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) o 10 % (Rysunek 121). Spośród zbadanych pochodnych wyjątek stanowi związek Tyr(acPh-4-OMe) (Rysunek 119), gdzie intensywność fluorescencji po dobie była wyższa niż dla próbki kontrolnej o 20 %.

Podobnie jak w przypadku działania utleniacza, we wszystkich analizowanych próbkach zawierających reduktor nawet po najdłuższym okresie inkubacji obserwowano fluorescencję o zachowanym profilu emisji. Brak istotnych zmian położenia pasm emisyjnych wskazuje, że obecność reduktora nie prowadzi do powstawania nowych dominujących form emitujących, a zmianom może ulegać jedynie intensywność fluorescencji.

We wszystkich badanych układach, zarówno w obecności utleniacza, jak i reduktora, fluorescencja pozostawała wyraźnie mierzalna nawet po 24 h inkubacji. Zachowanie położenia pasm emisji wskazuje, że właściwości emisyjne badanych związków pozostają stabilne, a emisja pochodzi od tego samego układu emitującego niezależnie od warunków oksydacyjno-redukcyjnych.

4. Fotostabilność

Jednym z kluczowych parametrów determinujących przydatność nowych związków fluorescencyjnych w zastosowaniach analitycznych i obrazowych jest ich fotostabilność. Ekspozycja na promieniowanie wzbudzające może prowadzić do zmian właściwości emisyjnych, w szczególności do obniżenia intensywności fluorescencji lub degradacji fluoroforu. Z tego względu istotne jest określenie trwałości i powtarzalności odpowiedzi optycznej badanych związków po ekspozycji na wiązkę wzbudzającą oraz ocena, czy ich profil emisyjny pozostaje niezmienny w czasie, co pozwala zweryfikować ich potencjał aplikacyjny.

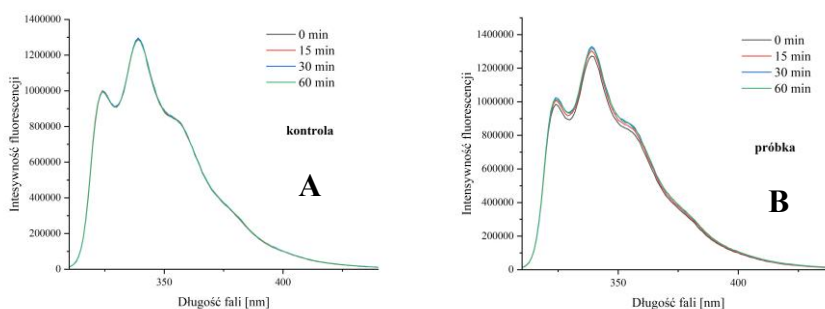
Z tego powodu przebadalam fotostabilność dla 17 z 19 otrzymanych pochodnych. Ze względu na ograniczoną ilość uzyskanych pochodnych Tyr(acPir) oraz Tyr(acPhacDMA) nie przeprowadziłam badań ich fotostabilności.

Próbki badawcze oraz odpowiadające im próbki kontrolne przygotowałam o identycznym stężeniu w MeCN. Badane próbki ekspozycje na promieniowanie UV w określonej temperaturze, natomiast próbki kontrolne przechowywałam w identycznych warunkach, z wyłączeniem ekspozycji na promieniowanie UV ($\lambda = 365$ nm). Widma emisji próbek badawczych rejestrowałam na początku eksperymentu oraz po 15, 30 i 60 minutach ekspozycji na światło UV. Widma emisji próbek kontrolnych rejestrowałam w analogicznych jednostkach czasowych. Dodatkowo analizy metodą RP-HPLC wykonałam dla próbek badanych i kontrolnych w czasie 0 oraz po 60 minutach trwania eksperymentu, co umożliwiło ocenę ewentualnej fotodegradacji związków.

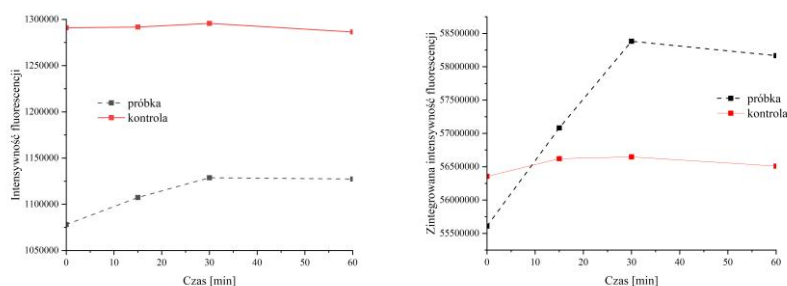
Szczegółowy wpływ badanych warunków na fluorescencję widoczny jest na rysunkach 124, 127, 130, 133, 136, 139, 142, 145, 148, 151, 154, 157, 160, 163, 166, 169, 172.

Pochodne asymetryczne

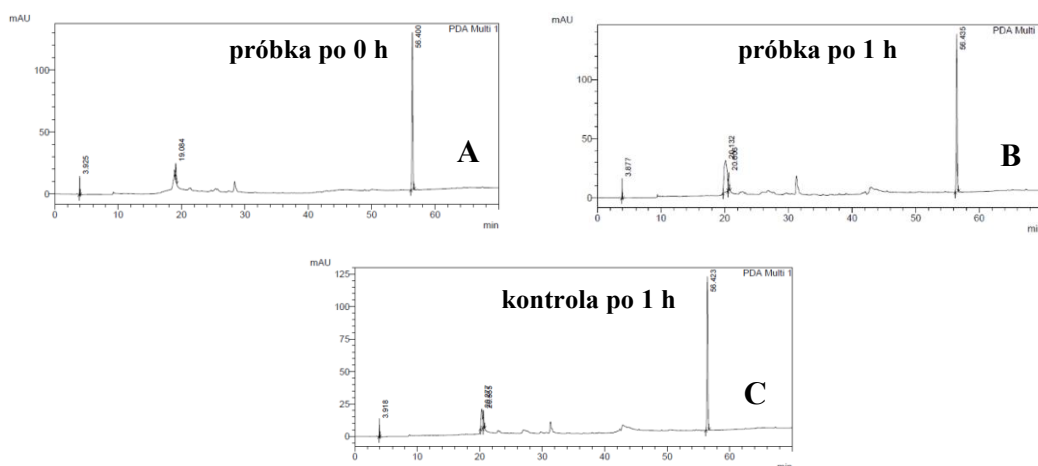
- Tyr(acPh)



Rysunek 123. Widma emisji pochodnej Tyr(acPh) zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.

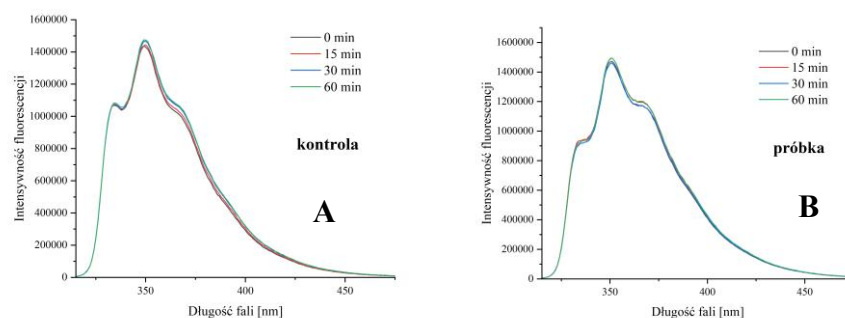


Rysunek 124. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{em}^{max}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acPh).

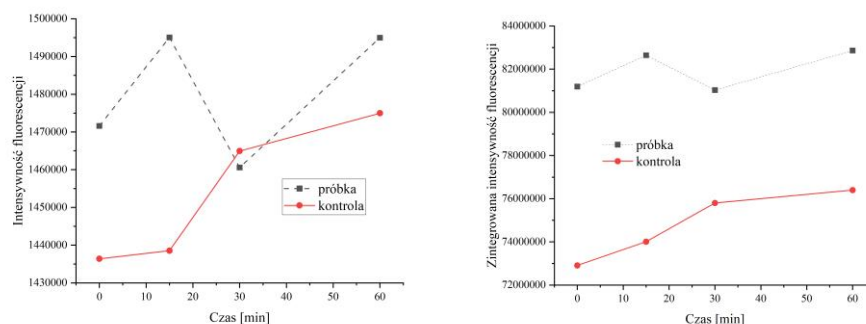


Rysunek 125. Chromatogramy z RP-HPLC (układ A, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acPh); A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.

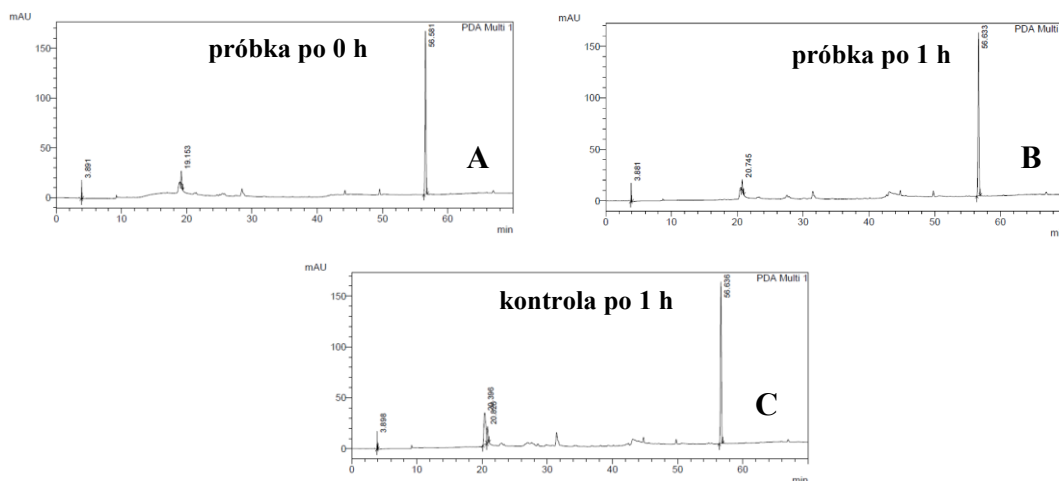
- Tyr(acPh-4-OMe)



Rysunek 126. Widma emisji pochodnej Tyr(acPh-4-OMe) zarejestrowane po określonym czasie nasświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.

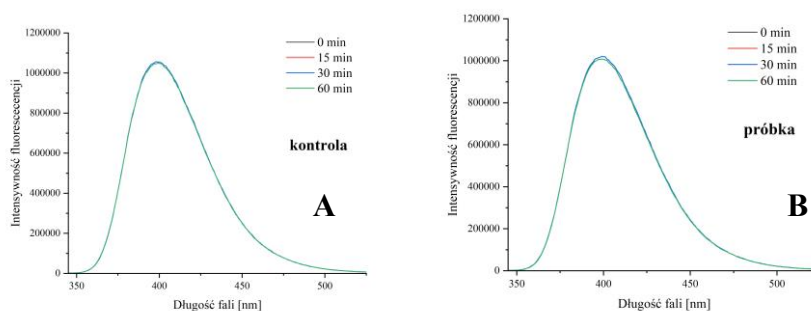


Rysunek 127. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{em}^{max}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acPh-4-OMe).

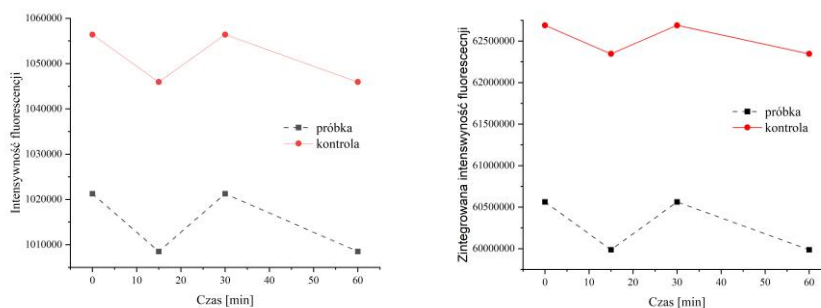


Rysunek 128. Chromatogramy z RP-HPLC (układ A, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acPh-4-OMe); A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h nasświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.

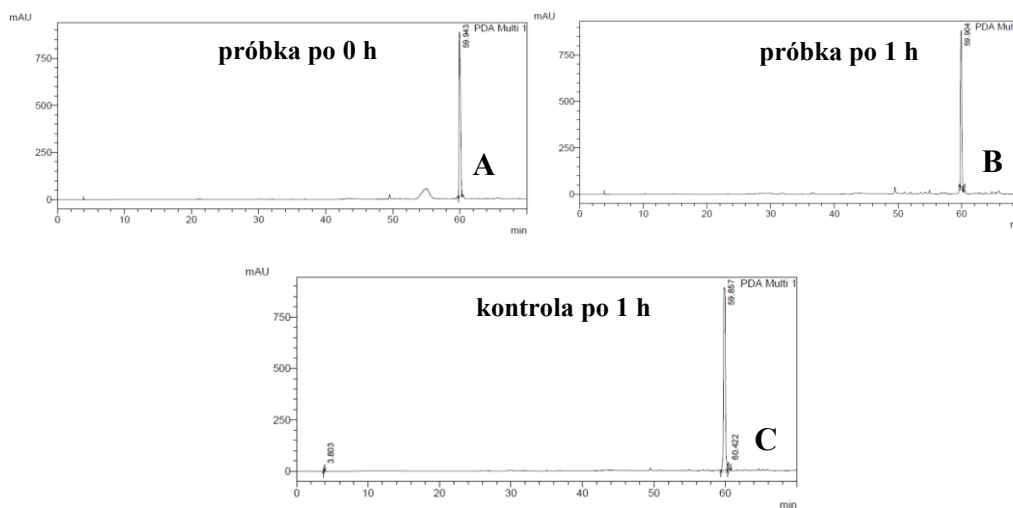
- Tyr(acDMA)



Rysunek 129. Widma emisji pochodnej Tyr(acDMA) zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.

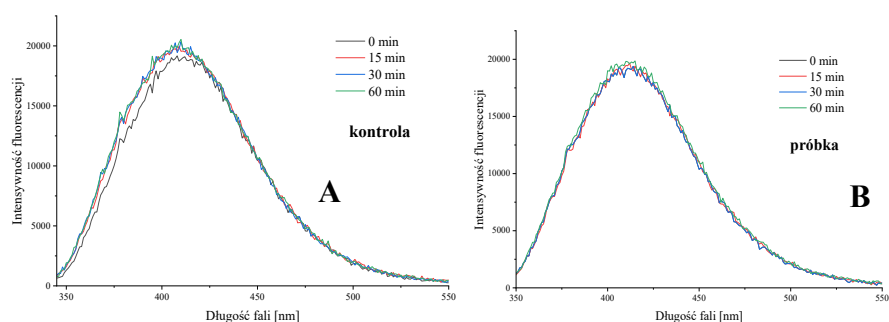


Rysunek 130. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{em}^{max}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acDMA).

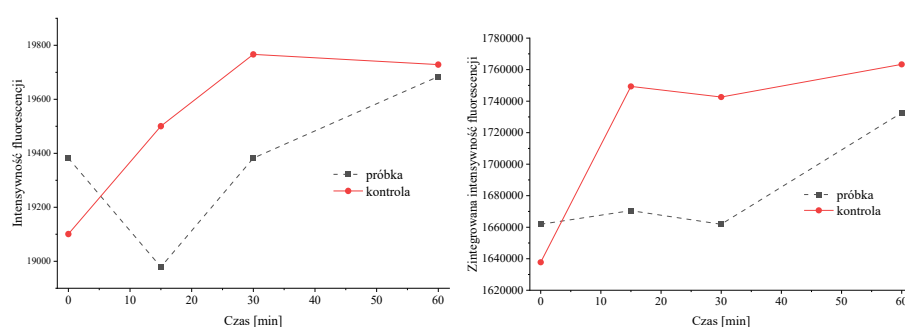


Rysunek 131. Chromatogramy z RP-HPLC (układ C, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acDMA); A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.

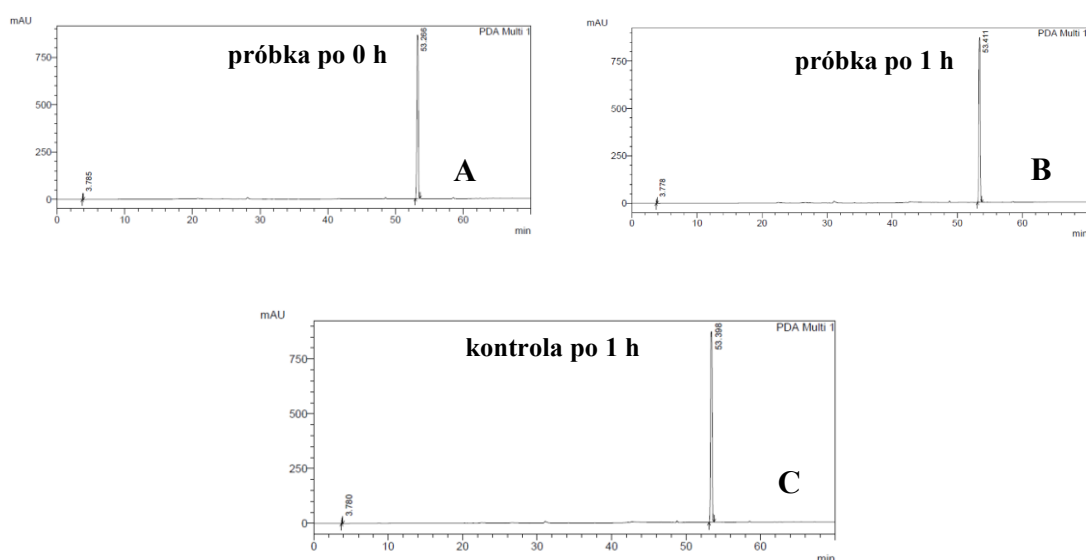
- Tyr(acPh-4-CHO)



Rysunek 132. Widma emisji pochodnej Tyr(acPh-4-CHO) zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.

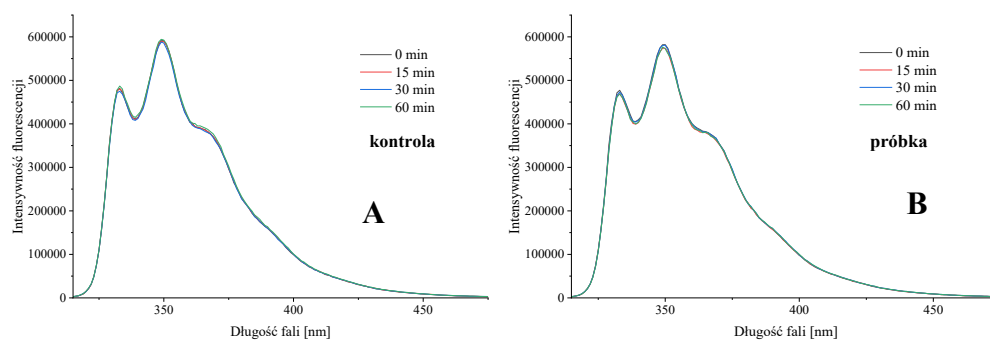


Rysunek 133. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{em}^{max}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acPh-4-CHO).

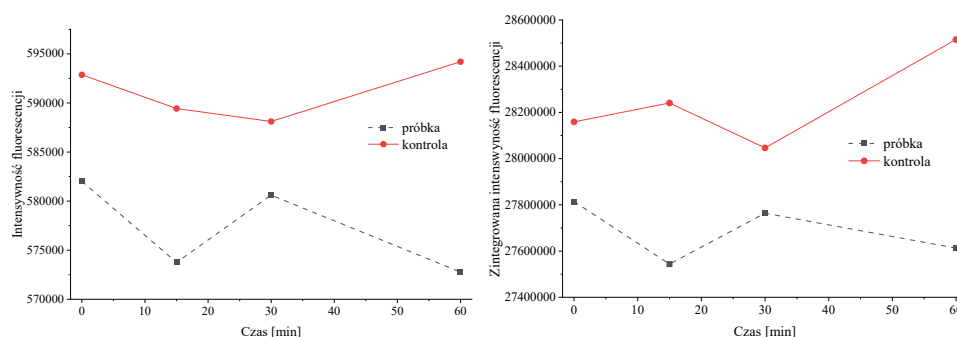


Rysunek 134. Chromatogramy z RP-HPLC (układ A, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acPh-4-CHO); A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.

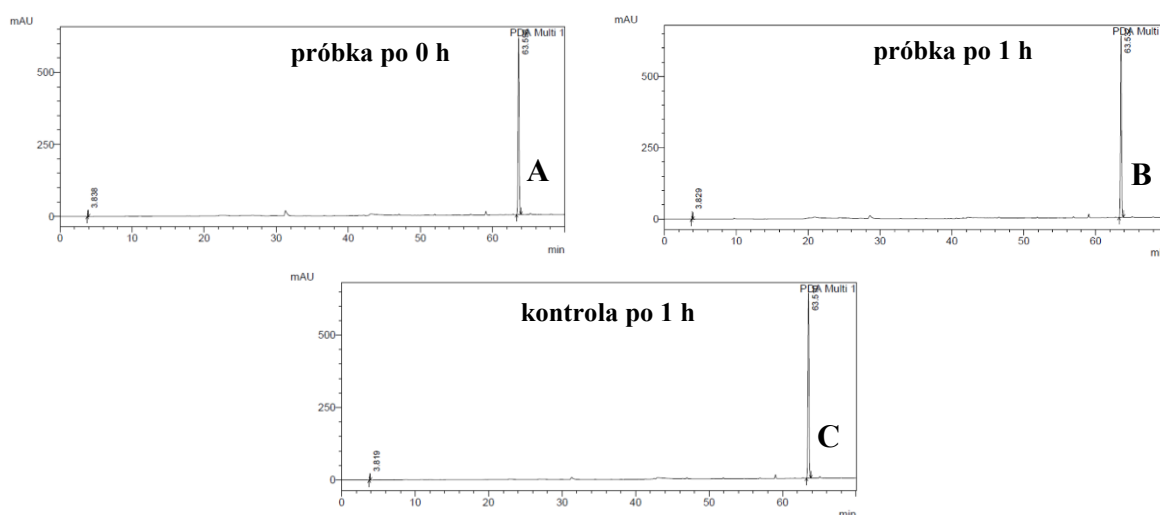
- Tyr(acPh-O-Ph)



Rysunek 135. Widma emisji pochodnej Tyr(acPh-O-Ph) zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.

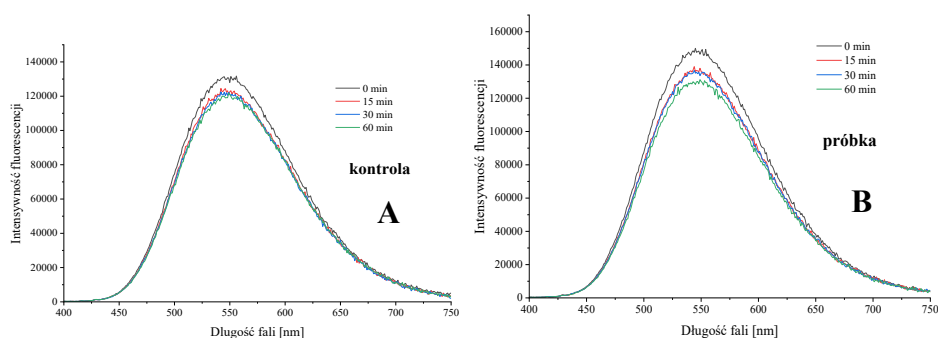


Rysunek 136. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{em}^{max}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acPh-O-Ph).

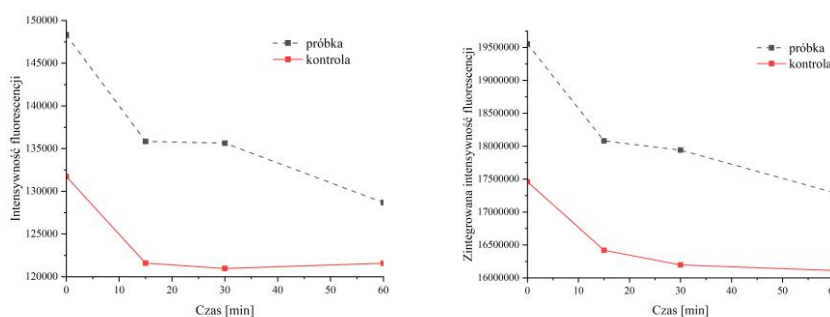


Rysunek 137. Chromatogramy z RP-HPLC (układ A, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acPh-O-Ph); A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.

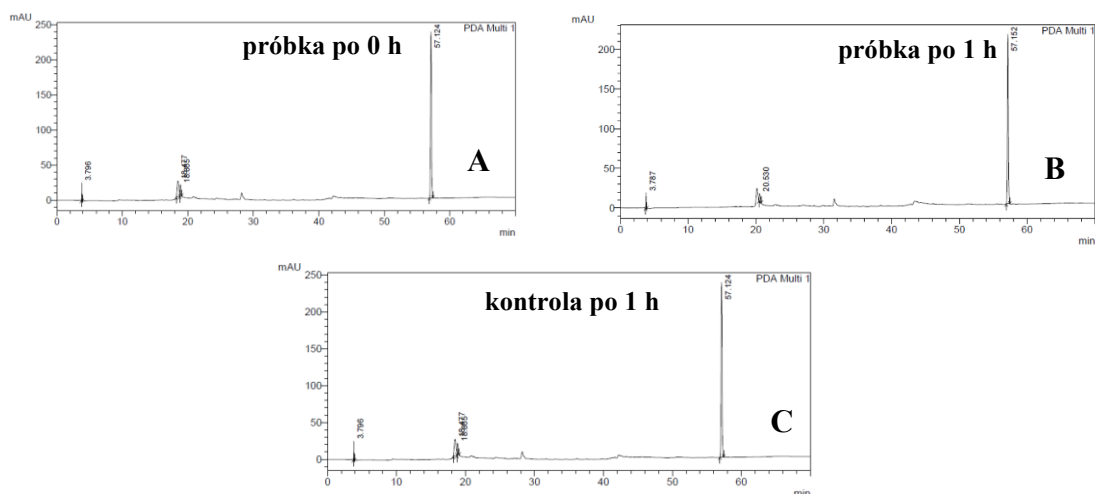
- Tyr(acPh-4-NO₂)



Rysunek 138. Widma emisji pochodnej Tyr(acPh-4-NO₂) zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.

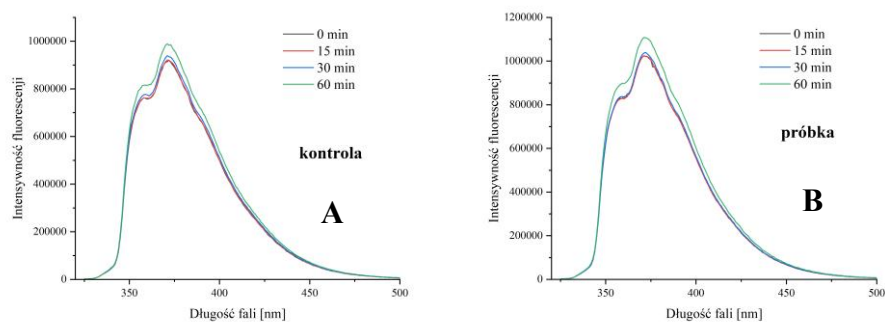


Rysunek 139. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{em}^{max}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acPh-4-NO₂).

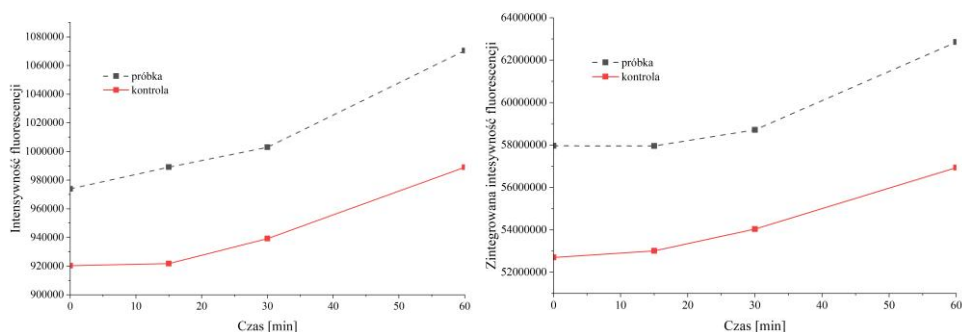


Rysunek 140. Chromatogramy z RP-HPLC (układ A, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acPh-4-NO₂); A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.

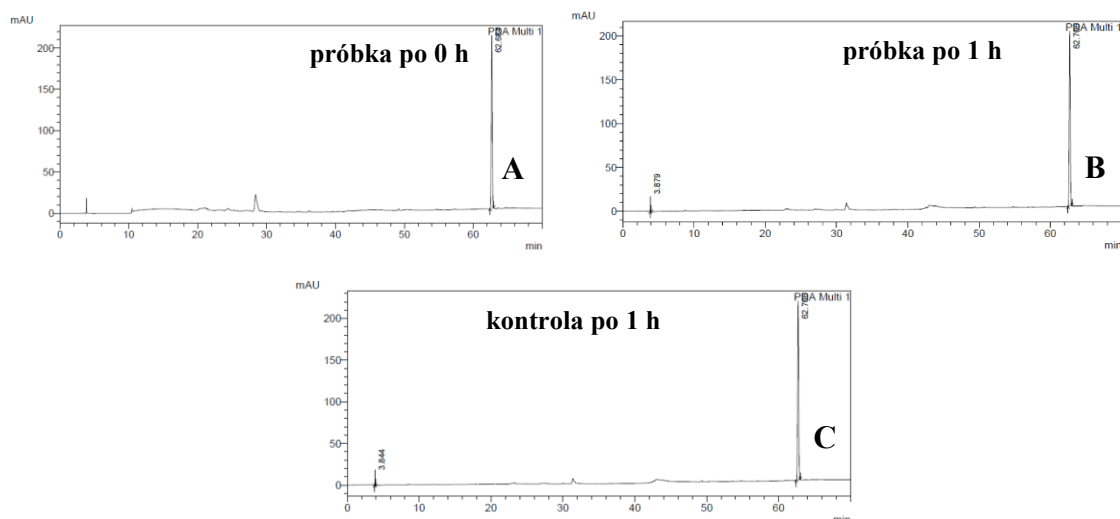
- Tyr(ac-2-Naft)



Rysunek 141. Widma emisji pochodnej Tyr(ac-2-Naft) zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.

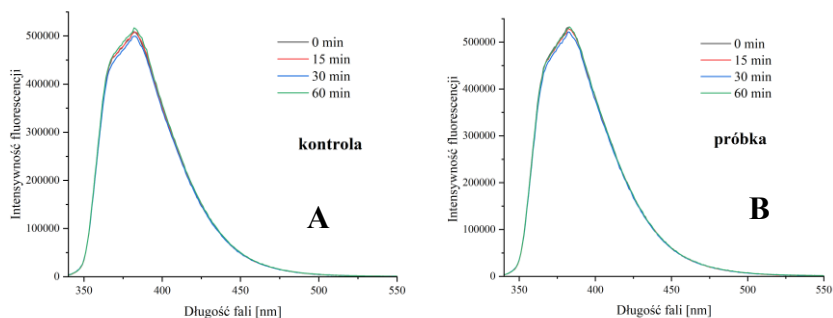


Rysunek 142. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{em}^{max}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(ac-2-Naft).

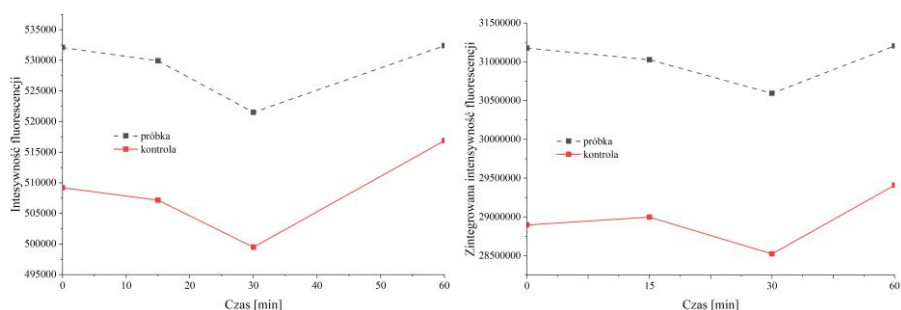


Rysunek 143. Chromatogramy z RP-HPLC (układ A, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(ac-2-Naft); A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.

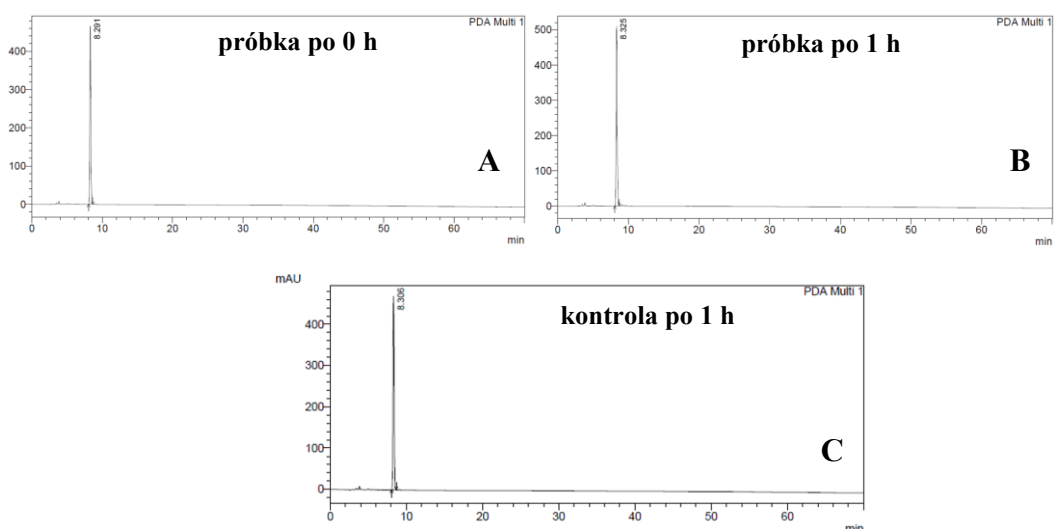
- Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)



Rysunek 144. Widma emisji pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.



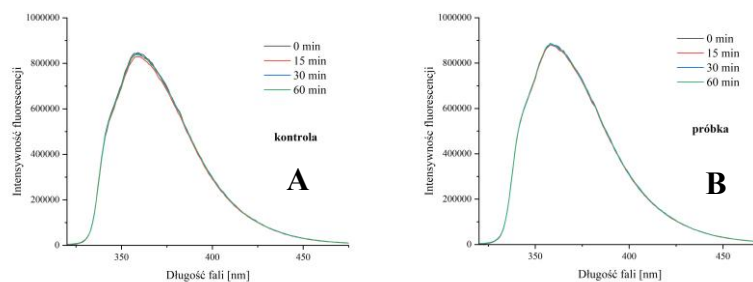
Rysunek 145. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{em}^{max}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe).



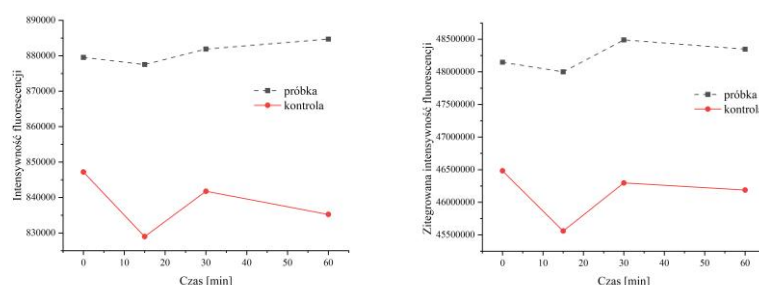
Rysunek 146. Chromatogramy z RP-HPLC (układ B, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe); A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.

Pochodne symetryczne

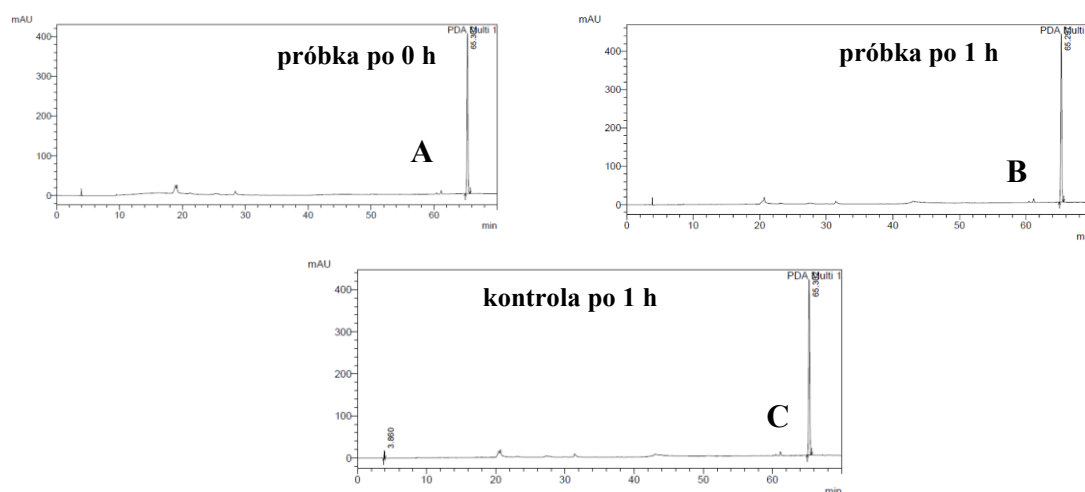
- Tyr(acPh)₂



Rysunek 147. Widma emisji pochodnej Tyr(acPh)₂ zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.

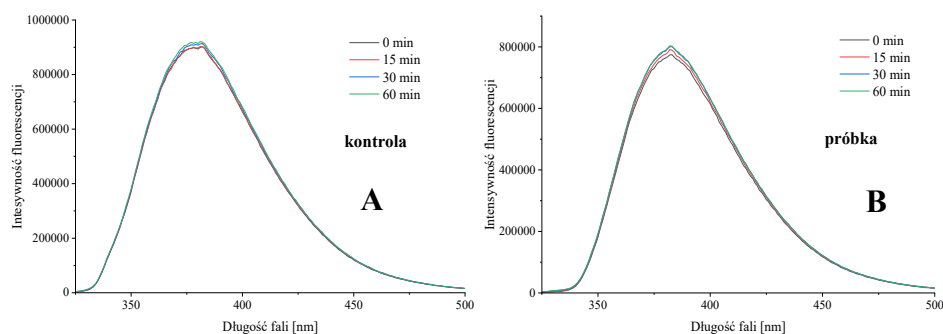


Rysunek 148. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{em}^{max}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acPh)₂.

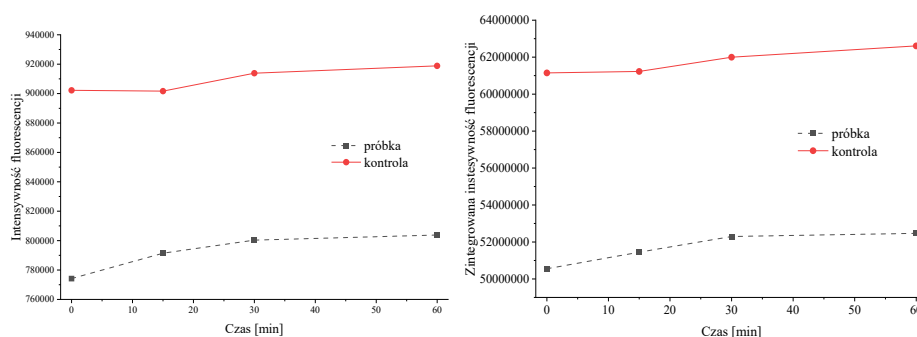


Rysunek 149. Chromatogramy z RP-HPLC (układ A, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acPh)₂; A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.

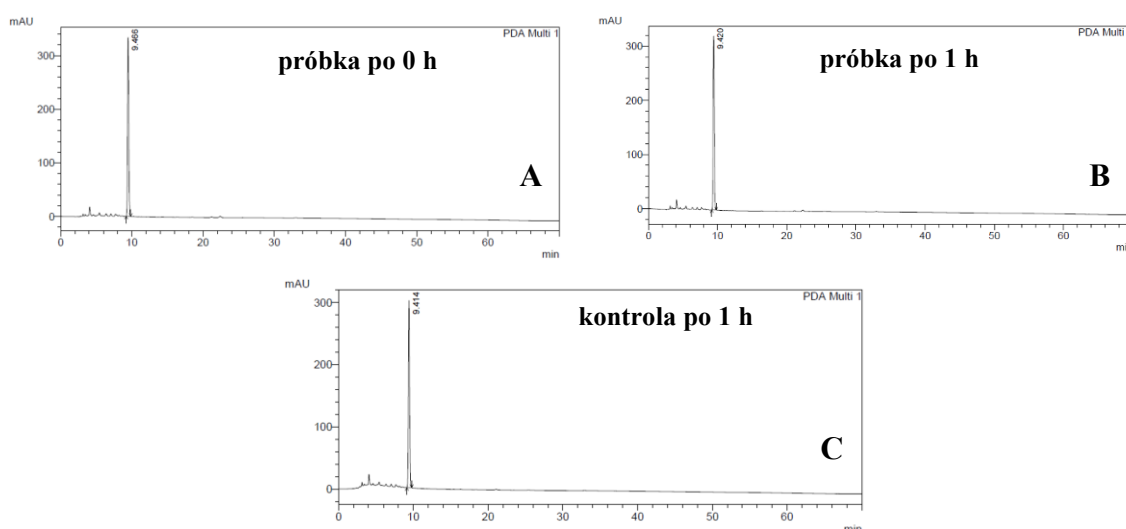
- Tyr(acPh-4-OMe)₂



Rysunek 150. Widma emisji pochodnej Tyr(acPh-4-OMe)₂ zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.

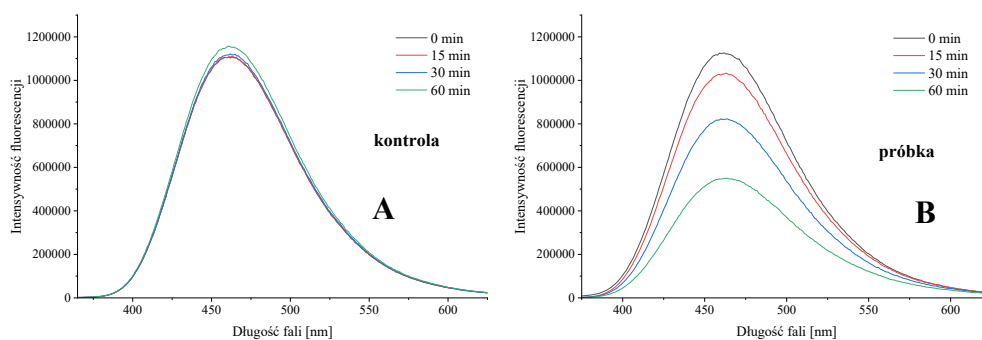


Rysunek 151. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{em}^{max}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acPh-4-OMe)₂.

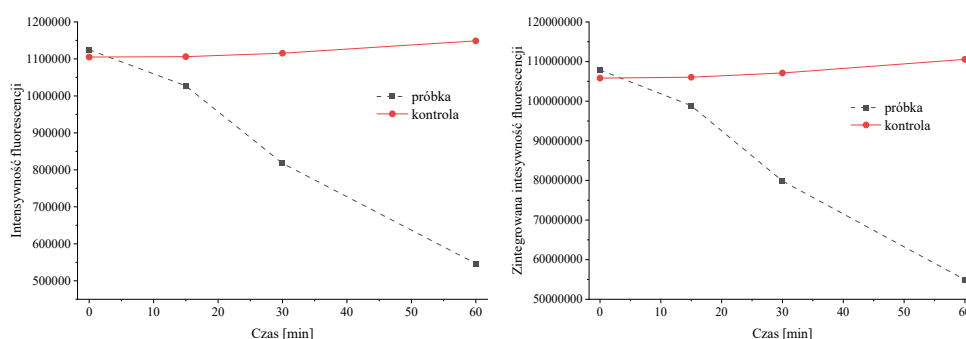


Rysunek 152. Chromatogramy z RP-HPLC (układ B, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acPh-4-OMe)₂; A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.

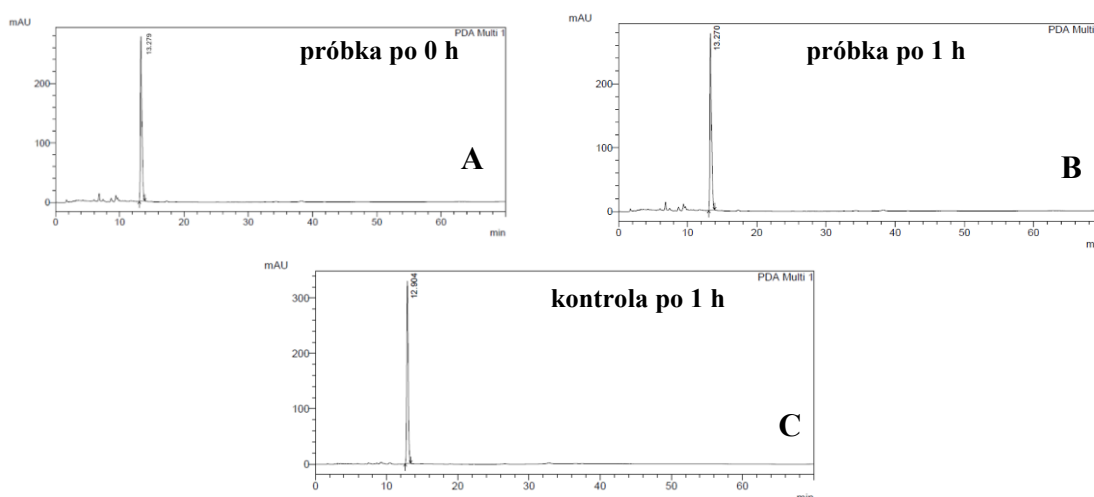
- Tyr(acDMA)₂



Rysunek 153. Widma emisji pochodnej Tyr(acDMA)₂ zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.

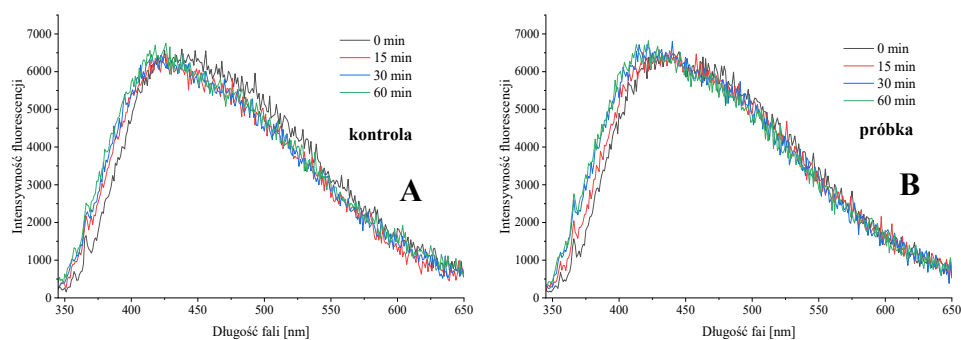


Rysunek 154. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{em}^{max}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acDMA)₂.

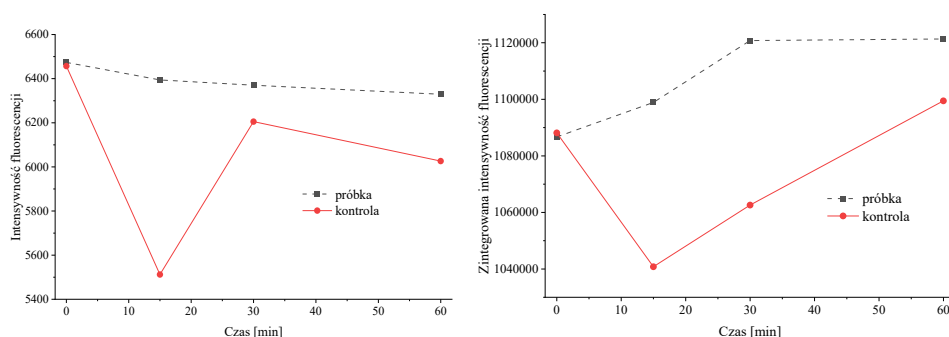


Rysunek 155. Chromatogramy z RP-HPLC (układ D, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acDMA)₂; A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.

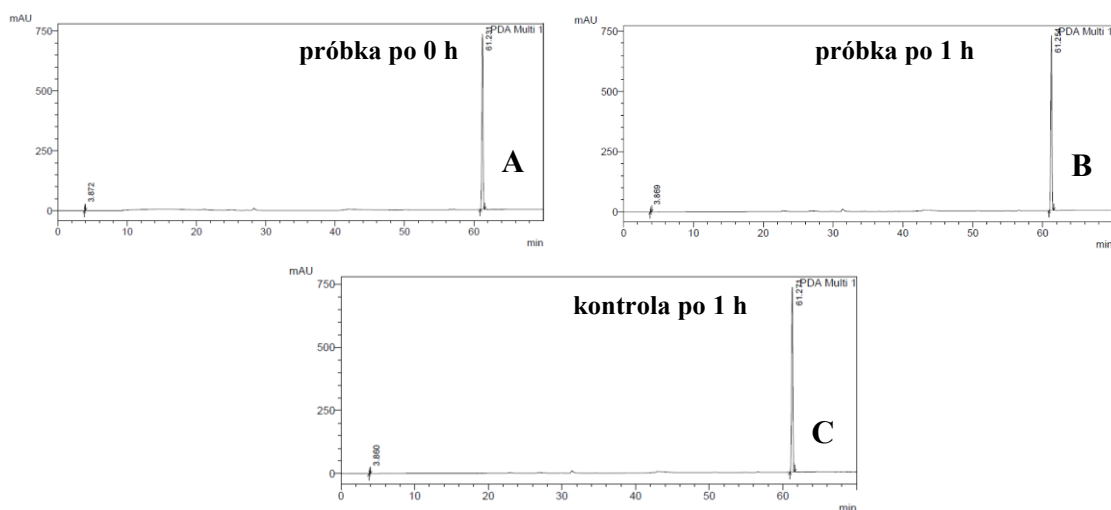
- Tyr(acPh-4-CHO)₂



Rysunek 156. Widma emisji pochodnej Tyr(acPh-4-CHO)₂ zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.

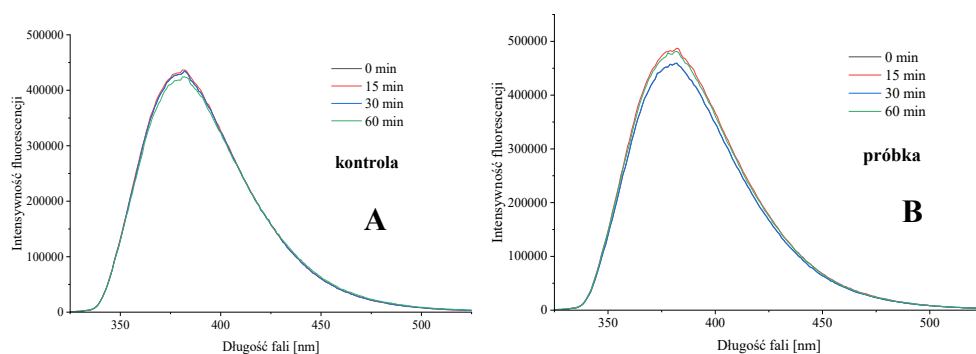


Rysunek 157. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{em}^{max}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acPh-4-CHO)₂.

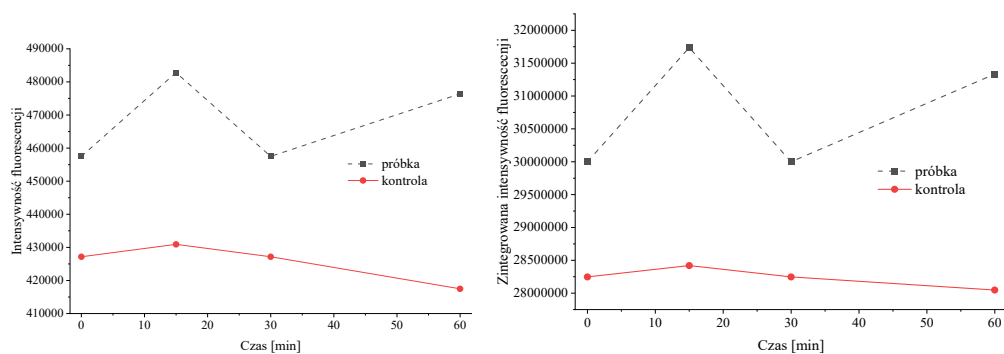


Rysunek 158. Chromatogramy z RP-HPLC (układ A, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acPh-4-CHO)₂; A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.

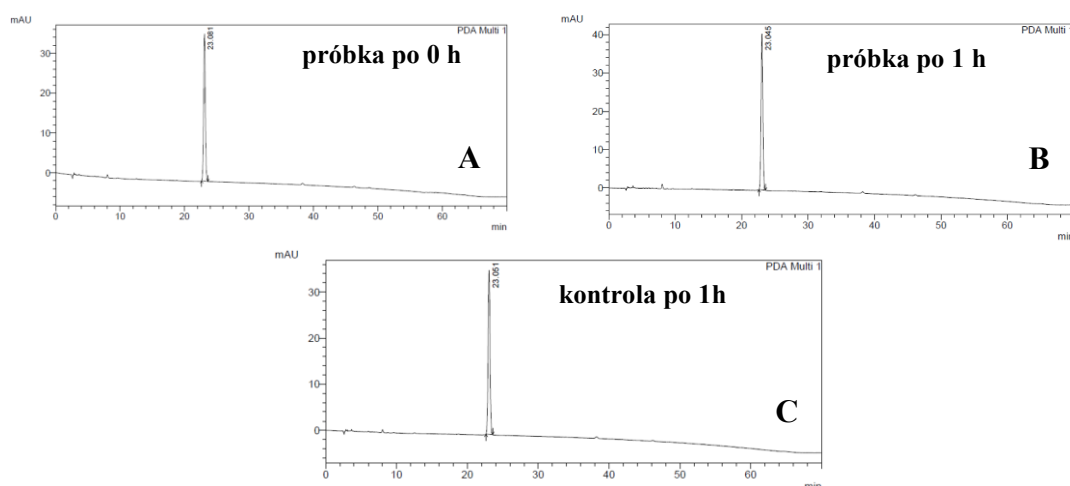
- Tyr(acPh-O-Ph)₂



Rysunek 159. Widma emisji pochodnej Tyr(acPh-O-Ph)₂ zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.

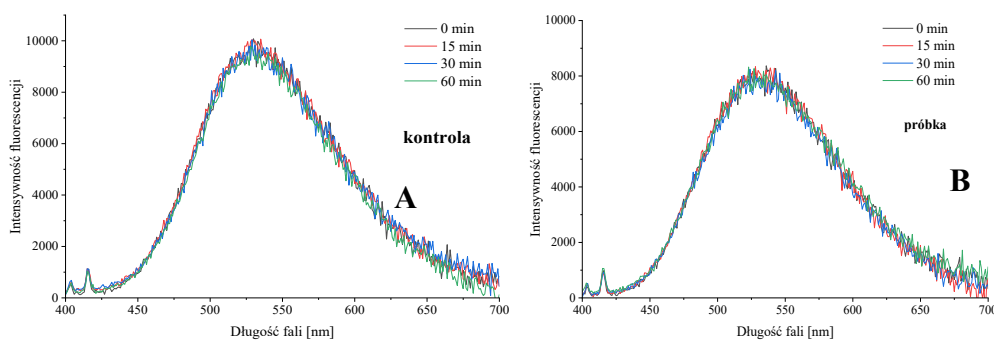


Rysunek 160. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{em}^{max}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acPh-O-Ph)₂.

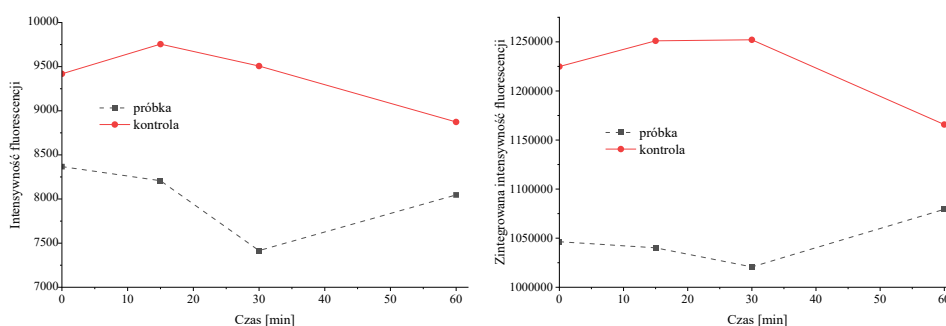


Rysunek 161. Chromatogramy z RP-HPLC (układ B, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acPh-O-Ph)₂; A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.

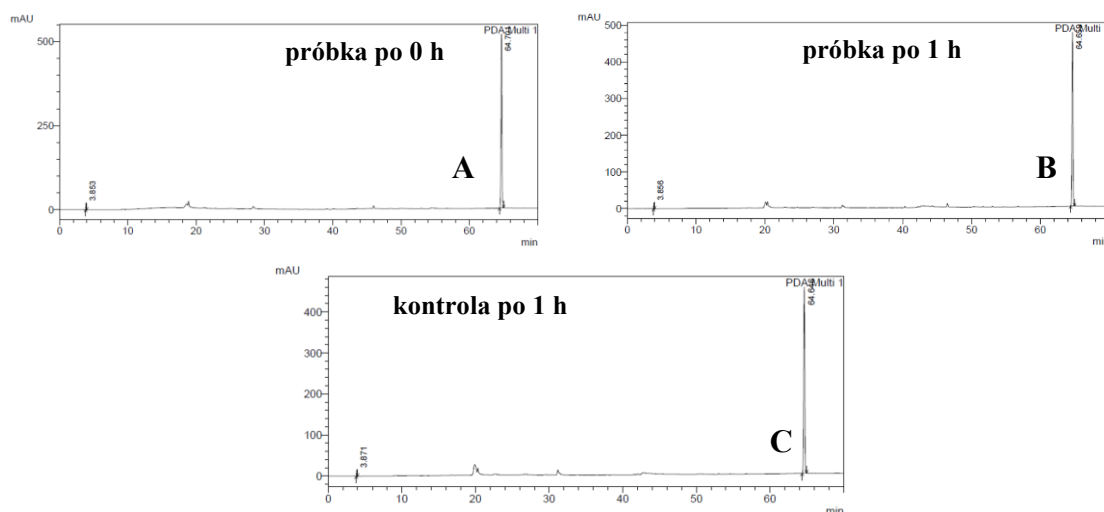
- **Tyr(acPh-4-NO₂)₂**



Rysunek 162. Widma emisji pochodnej Tyr(acPh-4-NO₂)₂ zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.

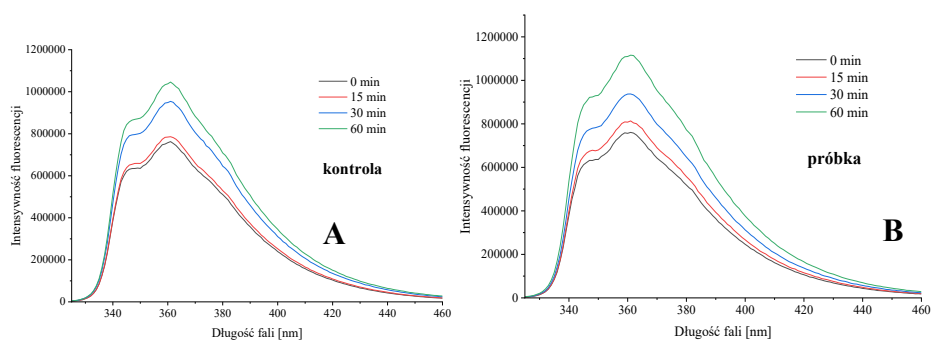


Rysunek 163. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{em}^{max}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acPh-4-NO₂)₂.

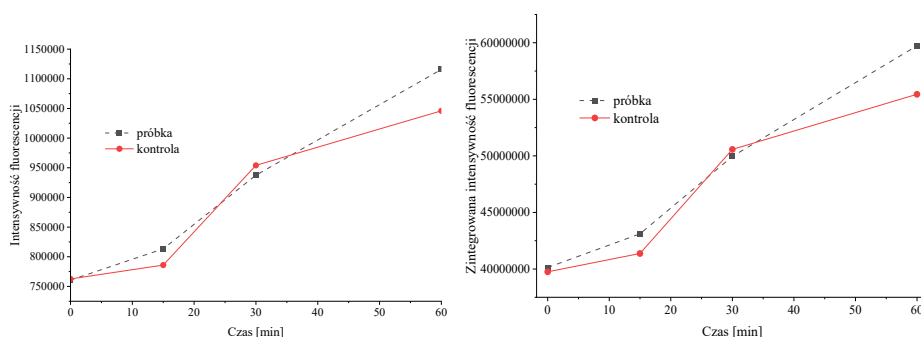


Rysunek 164. Chromatogramy z RP-HPLC (układ A, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acPh-4-NO)₂; A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.

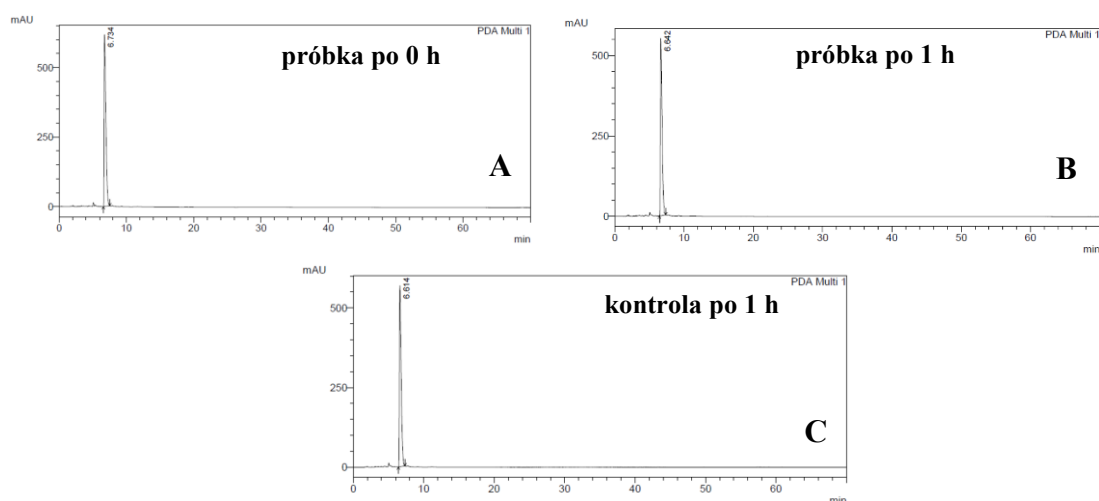
- Tyr(acPir)₂



Rysunek 165. Widma emisji pochodnej Tyr(acPir)₂ zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.

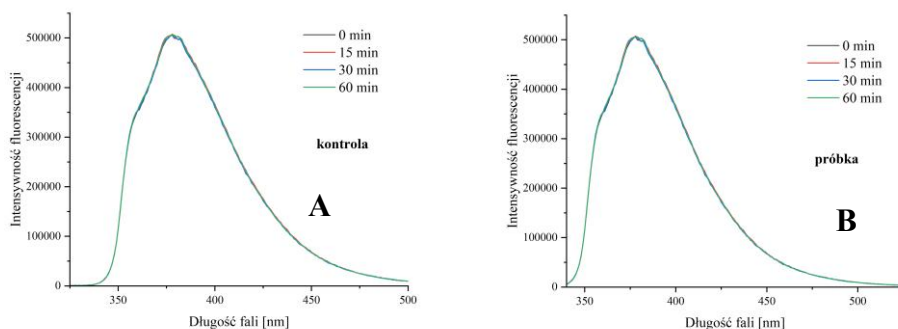


Rysunek 166. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{em}^{max}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acPir)₂.

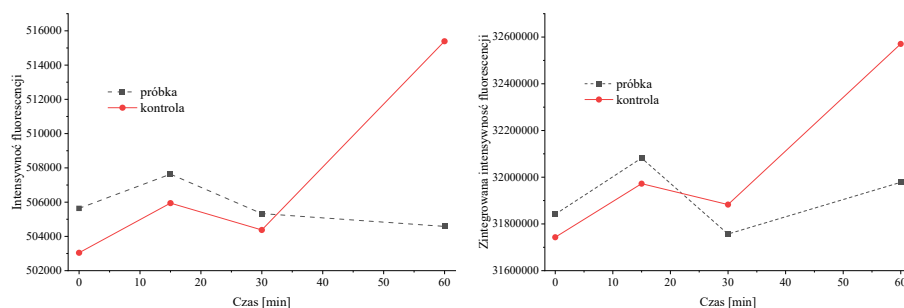


Rysunek 167. Chromatogramy z RP-HPLC (układ D, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acPir)₂; A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.

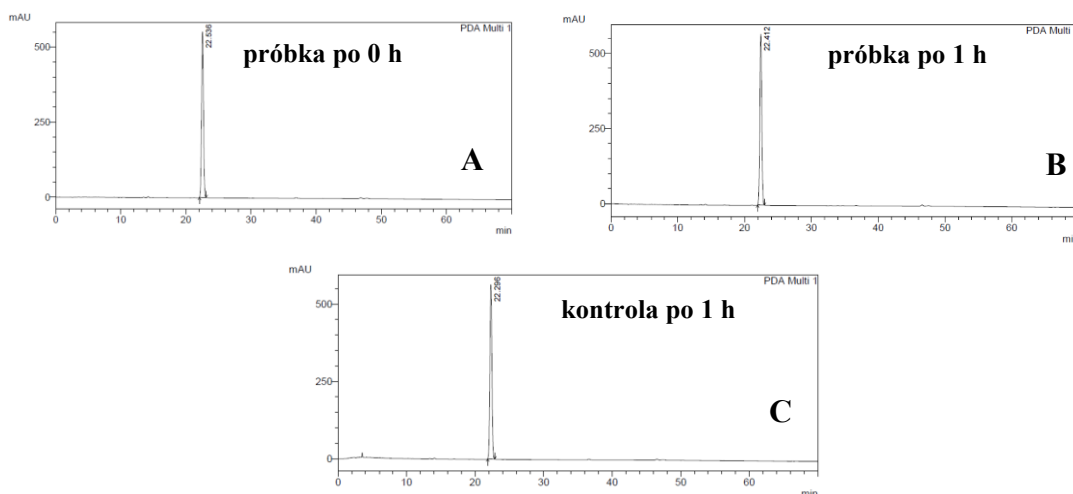
- Tyr(ac-2-Naft)₂



Rysunek 168. Widma emisji pochodnej Tyr(ac-2-Naft)₂ zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.

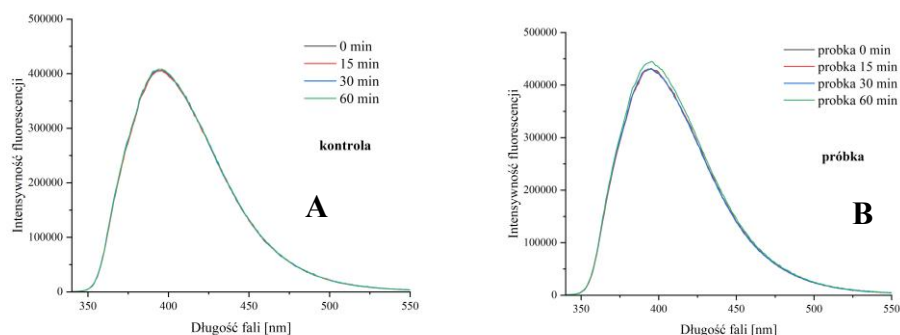


Rysunek 169. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{em}^{max}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(ac-2-Naft)₂.

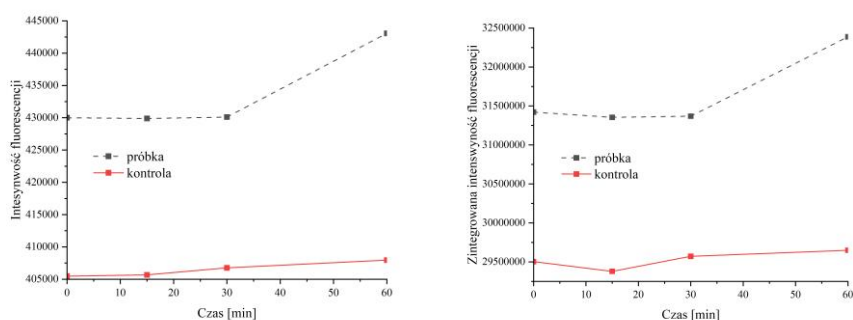


Rysunek 170. Chromatogramy z RP-HPLC (układ B, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(ac-2-Naft)₂; A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.

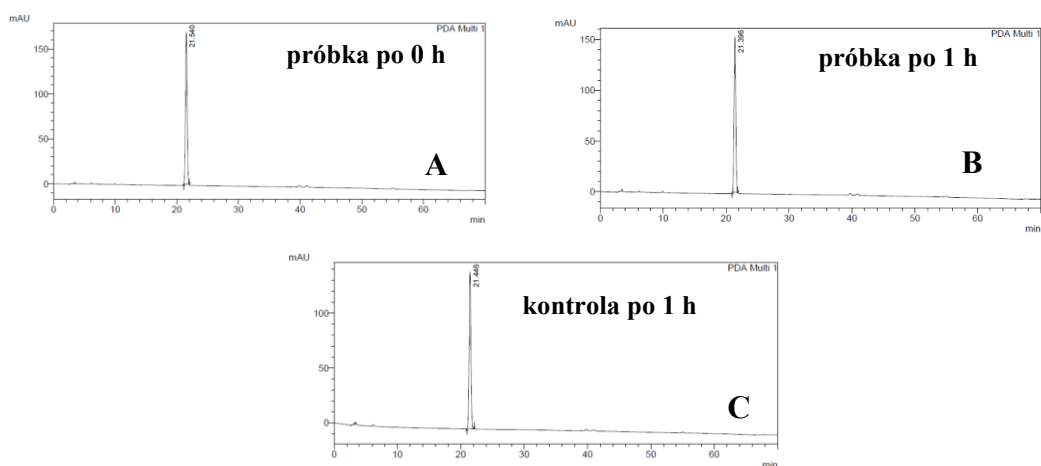
- Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂



Rysunek 171. Widma emisji pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂ zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.



Rysunek 172. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{em}^{max}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂.



Rysunek 173. Chromatogramy z RP-HPLC (układ B, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂; A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.

Przeprowadzone badania fotostabilności obejmowały rejestrację widm emisji próbek badawczych oraz kontrolnych w odstępach czasowych 0, 15, 30 i 60 minut, a także analizę homogeniczności za pomocą RP-HPLC po 0 h oraz po 1 h trwania eksperymentu (Rysunek 123 - 173). W większości przypadków otrzymane widma fluorescencji nie wykazywały istotnych zmian w profilu widm emisji ani intensywności fluorescencji w badanym zakresie. Wyjątek stanowi pochodna Tyr(acDMA)₂ oraz Tyr(acPir)₂. Dla pierwszej z wymienionych pochodnych widoczny był spadek intensywności fluorescencji o 45 % po 60 min (Rysunek 153 - 154). Otrzymane wyniki jednoznacznie wskazują, że pochodna zawierająca dwie grupy dimetyloanilinowe ulega stopniowej utracie intensywności fluorescencji pod wpływem naświetlania światłem UV. W miarę wydłużania czasu ekspozycji rejestrowano wyraźne zmniejszanie intensywności fluorescencji, jednak bez istotnych zmian położenia maksimum emisji ani kształtu pasma. Sugeruje to, że pod wpływem promieniowania UV zachodzi stopniowa fotodegradacja fluoroforu, nieprowadząca jednak do powstawania nowych dominujących form emitujących. Zachowanie profilu emisyjnego wskazuje, że charakter stanu emitującego pozostaje zasadniczo niezmienny. Widma fluorescencji dla próbki kontrolnej nie ulegają zmianie w kolejnych odcinkach czasowych, oznacza to, że zmiany widoczne dla próbki badawczej są wynikiem działania światła UV. Brak zmian warunków środowiskowych podczas prowadzenia doświadczenia pozwala wykluczyć wpływ zmian polarności otoczenia, procesów protonacji/deprotonacji oraz istotnych zmian konformacyjnych, które mogłyby prowadzić do przesunięcia pasm emisji lub zmiany charakteru stanu emitującego. Zastosowany rozpuszczalnik - acetonitryl jest fotochemicznie stabilny, jednak nie hamuje procesów rodnikowych ani fotooksydacyjnych, co może sprzyjać degradacji fluoroforu pod wpływem promieniowania UV. Dodatkowo MeCN nie absorbuje istotnie promieniowania w stosowanym zakresie UV, dzięki czemu energia promieniowania oddziałuje bezpośrednio z badanymi cząsteczkami, potencjalnie intensyfikując procesy fotochemiczne.

Jednym z prawdopodobnych mechanizmów odpowiedzialnych za obserwowany spadek intensywności fluorescencji mogą być procesy fotooksydacyjne zachodzące w obrębie podstawnika dimetyloaminowego (DMA). Obecność grupy aminowej zwiększa podatność układu na utlenianie, co może obniżać fotostabilność pochodnej. Istotne jest, że dla pochodnej asymetrycznej Tyr(acDMA) (Rysunek 129 - 130) nie obserwowano obniżenia fotostabilności nawet po 60 min naświetlania. Może to

wskazywać, że obecność dwóch grup DMA zwiększa podatność układu na procesy prowadzące do fotodegradacji oraz powstawania populacji niefluorescencyjnych produktów. Wprowadzenie drugiej grupy elektronodonorowej prawdopodobnie wpływa również na zmianę rozkładu gęstości elektronowej i reaktywności wzbudzonego układu. Odmienne właściwości obserwowano dla pochodnej Tyr(acPir)₂ (Rysunek 165 oraz 166). Widma emisji rejestrowane po kolejnych okresach naświetlania wykazywały wzrost intensywności fluorescencji przy jednoczesnym braku istotnych zmian położenia maksimum emisji. Otrzymane wyniki mogą sugerować wystąpienie procesu fotoaktywacji, w wyniku którego dochodzi do ograniczenia ruchów rotacyjnych w cząsteczce, a tym samym zmniejszenia udziału procesów bezpromienistej dezaktywacji stanu wzbudzonego. Należy jednak uwzględnić również inne możliwe przyczyny obserwowanego efektu. Pierścień pirydynowy może uczestniczyć w oddziaływaniach z obecnymi w układzie śladowymi ilościami wody lub innych zanieczyszczeń protonodonorowych, co potencjalnie może wpływać na właściwości emisyjne związku. Nie można również wykluczyć ograniczonej rozpuszczalności badanej pochodnej, prowadzącej do zmian efektywnego stężenia związku w trakcie eksperymentu. Istotne jest jednak, że analogiczne zmiany obserwowano zarówno dla próbki badawczej, jak i kontrolnej, co wskazuje, że efekt ten nie wynika bezpośrednio z działania promieniowania UV.

W przypadku obu pochodnych Tyr(acDMA)₂ oraz Tyr(acPir)₂ konieczne jest rozszerzenie badań o pomiary czasów zaniku fluorescencji, wykonanie widm mas, widm UV-Vis, wykonanie pomiarów w obecności N₂ i O₂ oraz kontrolę zawartości wody w wykorzystanych rozpuszczalnikach do badań, które z czasem mogą chłonać ją z powietrza.

Dane jednoznacznie potwierdzają fotostabilność niemal wszystkich badanych pochodnych w analizowanym czasie. Profil emisji pozostał niezmienny we wszystkich przypadkach, a nawet pochodna Tyr(acDMA)₂, wykazująca najmniejszą odporność na światło UV, zachowała rejestrowalną fluorescencję nawet po 60 minutach ekspozycji.

Warto podkreślić, że analiza RP-HPLC (Rysunek 125, 128, 131, 134, 137, 140, 143, 146, 149, 152, 155, 158, 161, 164, 167, 170, 173) nie wykazała obecności produktów fotodegradacji po naświetlaniu wszystkich badanych próbek. Otrzymane wyniki sugerują zatem, że obserwowane w dwóch przypadkach zmiany intensywności fluorescencji mają przede wszystkim charakter fotofizyczny i nie są związane z istotnym rozpadem chemicznym badanych pochodnych.

5. Badanie żywotności wybranych linii komórkowych

W niniejszej pracy przeprowadziłam ocenę wpływu otrzymanych acetylenowych pochodnych tyrozyny na żywotność wybranych linii komórkowych. Analizę wykonałam z wykorzystaniem ludzkich linii komórkowych: keratynocytów (HaCaT) oraz komórek nowotworowych piersi (MCF-7) i prostaty (PC-3). Zastosowanie zarówno linii komórek prawidłowych (model komórek nienowotworowych; komórki HaCaT), jak i nowotworowych, umożliwiło wstępną ocenę selektywności działania badanych związków oraz określenie ich potencjału aplikacyjnego.

Badania wykonałam na Wydziale Biologii, w Katedrze Biologii i Genetyki Medycznej, w Pracowni Sygnalizacji Wewnątrzkomórkowej, we współpracy z dr Aleksandrą Hać.

a) Prowadzenie hodowli komórkowych

Linie komórkową HaCaT (keratynocyty; komórki prawidłowe) zakupiono w banku komórek CLS (ang. *Cell Lines Service GmbH*), natomiast linie komórek nowotworowych MCF-7 (komórki raka piersi) oraz PC-3 (komórki raka prostaty) pozyskano z banku komórek ATCC (ang. *American Type Culture Collection*). Do hodowli komórek użyłam podłoża DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; hodowla komórek linii HaCaT) oraz RPMI 1640 (nazwana na cześć ang. *Roswell Park Memorial Institute*; hodowla komórek linii MCF-7 i PC-3). Pożywkę suplementowałam 50 ml płodowej surowicy bydlęcej (ang. *Foetal Bovine Serum*; FBS) na 500 ml pożywki, mieszaniną antybiotyków penicyliny i streptomycyny (kupowane jako roztwór 100x stężony (10000 jednostek/ml penicyliny i 10 mg/ml streptomycyny w 0,9 % NaCl), dodawane do stężenia 1x), jałowym 200 mM roztworem *L*-glutaminy (dodawanym do stężenia końcowego 2 mM do pożywki RPMI 1640 i 4 mM do pożywki DMEM). Pożywkę i płodową surowicę bydlęcą zakupiono w firmie Corning (Nowy Jork, USA), natomiast roztwór *L*-glutaminy i antybiotyków w firmie Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Izrael). Komórki hodowano w temperaturze 37 °C w atmosferze wysyczonej 5 % CO₂.

b) Test MTT

Ocenę wpływu badanych związków na żywotność komórek prawidłowych oraz nowotworowych przeprowadziłam z wykorzystaniem testu MTT (bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowy). Zastosowana metoda wykorzystuje

zdolność metabolicznie aktywnych komórek do enzymatycznej redukcji soli tetrazolowej MTT do nierozpuszczalnego formazanu, zachodzącej przy udziale mitochondrialnych dehydrogenaz. Ilość powstającego produktu jest proporcjonalna do liczby żywych komórek. Po zakończeniu reakcji formazan rozpuszcza się w odpowiednim rozpuszczalniku, a absorbancję mierzy się spektrofotometrycznie przy długości fali 570 nm (z korekcją tła). Uzyskane wyniki umożliwiają ilościową ocenę wpływu badanych związków na żywotność badanych linii komórkowych, a porównanie rezultatów uzyskanych dla różnych linii komórkowych pozwala na określenie ich potencjalnej selektywności wobec komórek zdrowych i nowotworowych oraz nakreślenie ich potencjału aplikacyjnego.

Do badań wpływu wybranej puli związków na żywotność komórek wykorzystałam linie komórkowe: HaCaT, MCF-7 oraz PC-3. Jako kontrolę negatywną zastosowałam komórki traktowane samym rozpuszczalnikiem (DMSO), a kontrolę pozytywną stanowiły komórki traktowane puromycyną w stężeniach 1, 2,5 oraz 5 $\mu\text{g/ml}$. Jako odnośnik wykorzystałam związek BocTyrOMe w stężeniach 1, 5 i 10 μM . Ze względu na niewielką ilość uzyskanych związków nie określałam cytotoksyczności pochodnych Tyr(acPir) oraz Tyr(acPhacDMA).

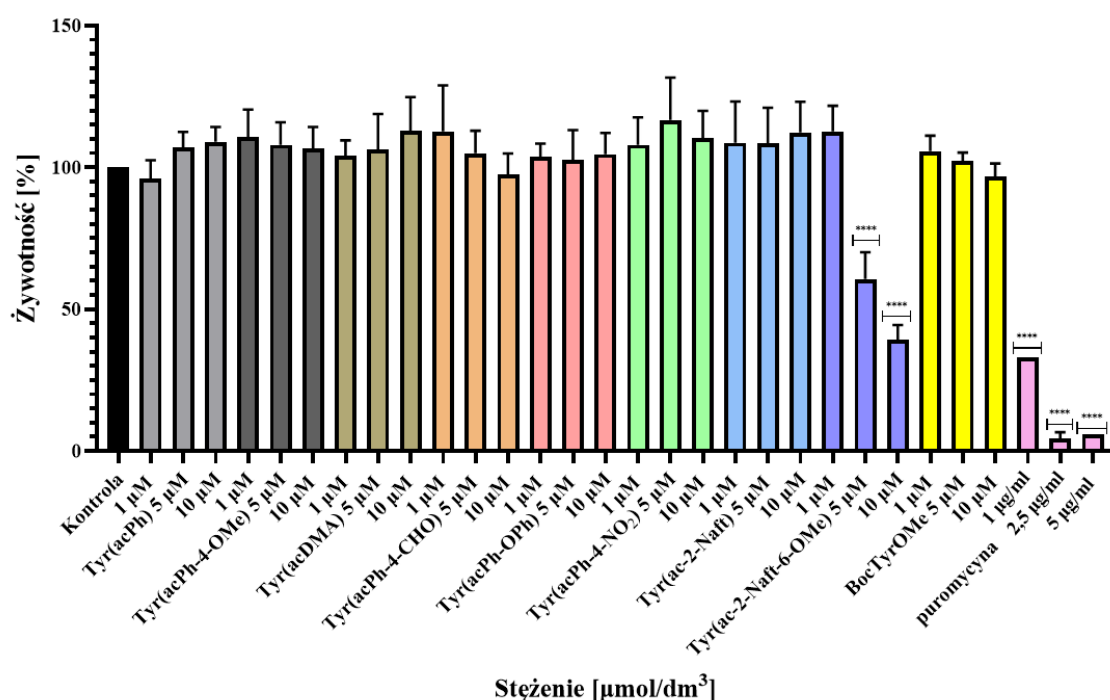
W celu przeprowadzenia testu MTT komórki wysiałam do 96-dółkowych płytek w gęstości 4×10^3 komórek/dółek (100 μl zawiesiny komórek w podłożu). Płytki inkubowałam przez 24 h w temperaturze 37 °C w atmosferze 5 % CO_2 , aby umożliwić adhezję komórek. Po 24 godzinach inkubacji podłoże hodowlane zastąpiłam świeżym, zawierającym badane związki w stężeniach: 1 μM , 5 μM , oraz 10 μM , przygotowanych z roztworów macierzystych otrzymanych przez rozpuszczenie związków w DMSO. We wszystkich wariantach eksperymentalnych inkubację prowadziłam przez 24 h. Po zakończeniu inkubacji do każdego dołka dodałam 30 μl roztworu MTT (3,33 mg/ml w buforze PBS, końcowe stężenie w dołku wynosiło 1 $\mu\text{g/ml}$), a następnie płytkę inkubowałam przez 3 h w 37 °C w atmosferze wysyczonej CO_2 o stężeniu 5 %. W tym czasie w żywych komórkach następowała redukcja MTT do nierozpuszczalnego w wodzie formazanu. Po inkubacji ostrożnie usunęłam podłoże, a powstały formazan rozpuściłam, dodając 100 μl DMSO do każdego z dołków. Zawartość każdego dołka mieszałam przez 10 minut, aż do całkowitego rozpuszczenia kryształów, a następnie mierzyłam absorbancję za pomocą spektrofotometru z czytnikiem płytek przy długości fali 570 nm, stosując korektę tła przy 660 nm. Badania zostały wykonane w minimum trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych, a każda próbka umieszczona była

w trzech dołkach jako powtórzenia techniczne. Do analizy statystycznej wyników badań komórkowych wykorzystano program GraphPad Prism 10.

Wyniki testów MTT wszystkich linii hodowlanych dla asymetrycznych (Rysunek 174 - 176) oraz dla symetrycznych (Rysunek 177 - 179) acetylenowych pochodnych tyrozyny zaprezentowano poniżej.

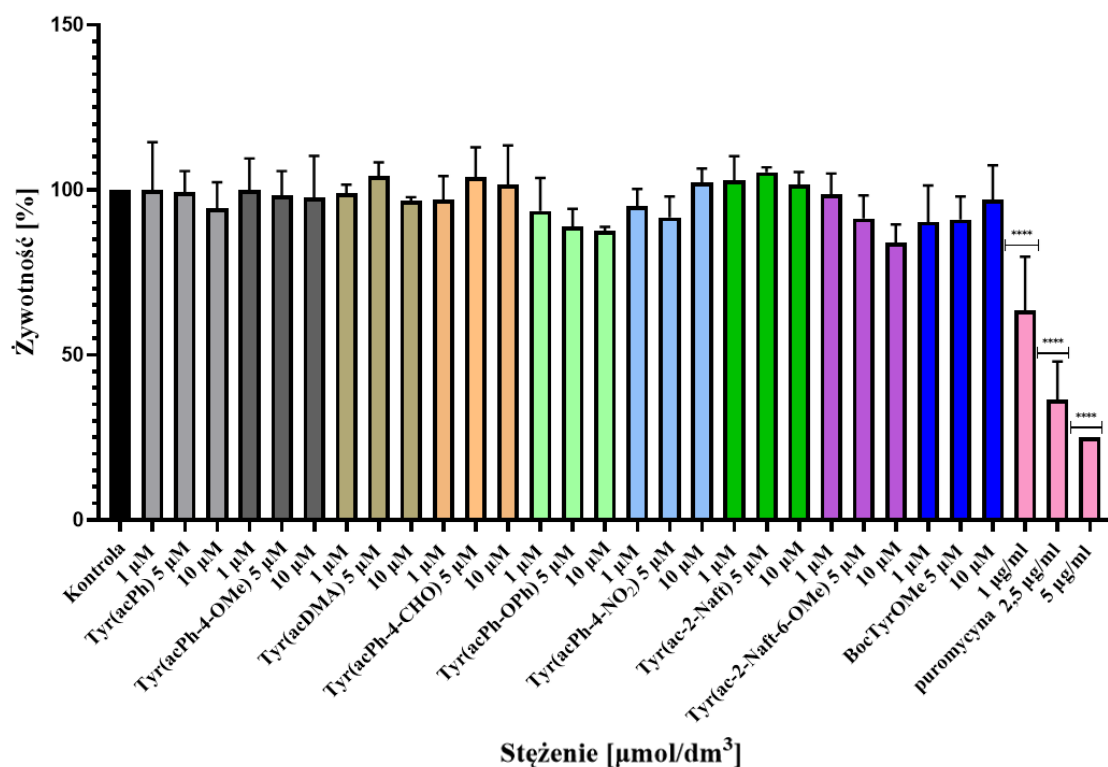
- **Pochodne asymetryczne**

Linia komórkowa HaCaT



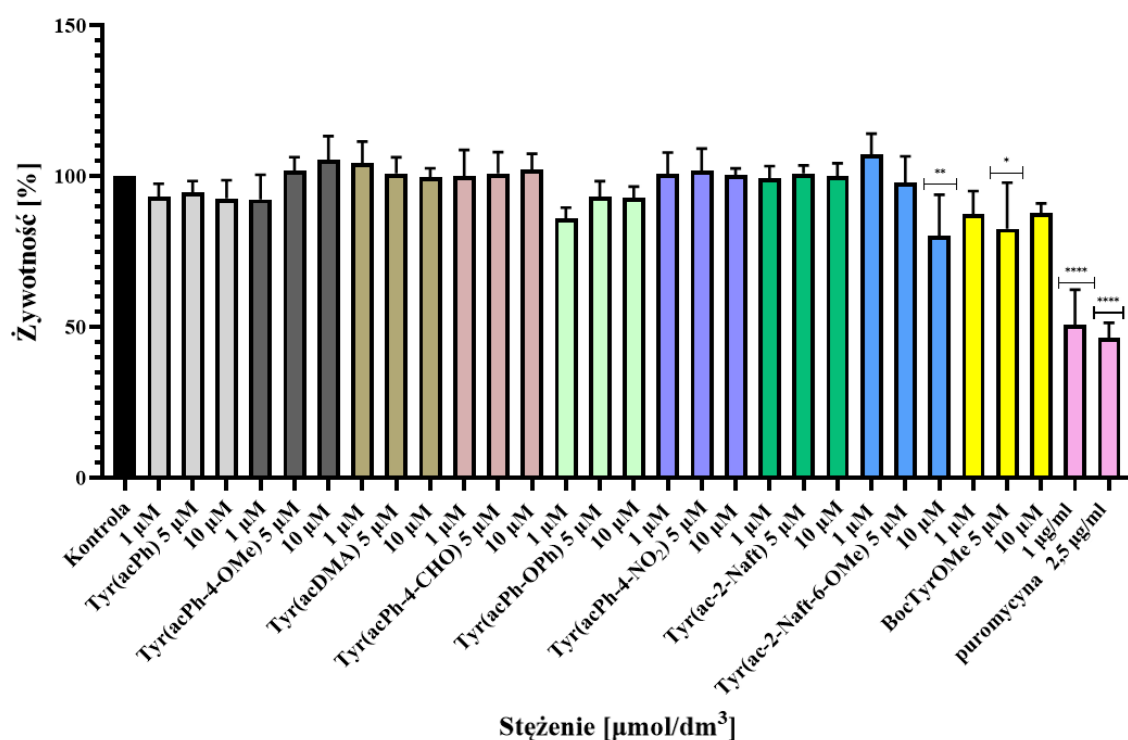
Rysunek 174. Wyniki testu MTT obrazujące zależność żywotności komórek z linii HaCaT od stężenia badanych asymetrycznych pochodnych tyrozyny względem kontroli negatywnej (0 μM, komórki poddane działaniu czystego nośnika DMSO przyjęto za 100 %) po 24h traktowania. Przetworzono wartość SEM co najmniej 3 niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna różnic określono za pomocą testu one-way ANOVA oraz testu wielokrotnych porównań Dunnetta (**** $p < 0,0001$); gdzie: * - różnica istotna statystycznie pomiędzy HaCaT traktowanymi wybranymi pochodnymi a kontrolą.

Linia komórkowa MCF-7



Rysunek 175. Wyniki testu MTT obrazujące zależność żywotności komórek z linii MCF-7 od stężenia badanych asymetrycznych pochodnych tyrozyny względem kontroli negatywnej (0 μM, komórki poddane działaniu czystego nośnika DMSO przyjęto za 100 %) po 24h traktowania. Przetawiono wartość SEM co najmniej 3 niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna różnic określono za pomocą testu one-way ANOVA oraz testu wielokrotnych porównań Dunnetta (**** $p < 0,0001$); gdzie: * - różnica istotna statystycznie pomiędzy MCF-7 traktowanymi wybranymi pochodnymi a kontrolą.

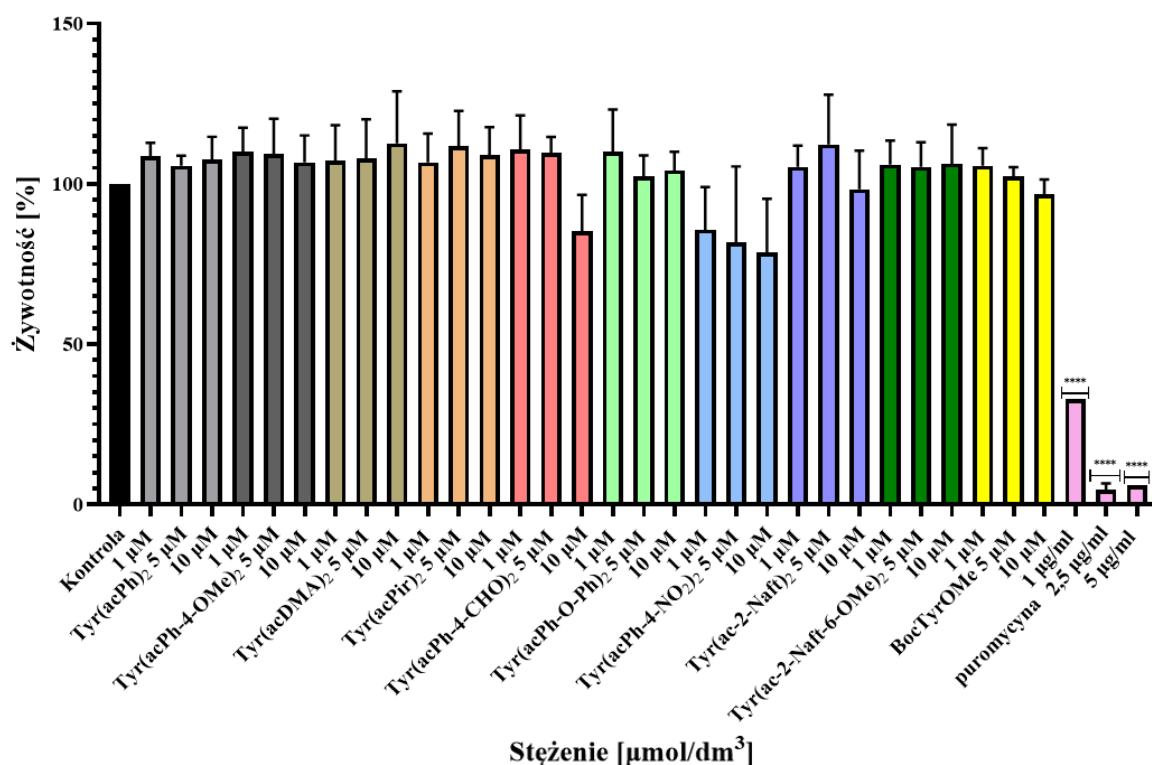
Linia komórkowa PC-3



Rysunek 176. Wyniki testu MTT obrazujące zależność żywotności komórek z linii PC-3 od stężenia badanych asymetrycznych pochodnych tyrozyny względem kontroli negatywnej (0 μM , komórki poddane działaniu czystego nośnika DMSO przyjęto za 100 %) po 24h traktowania. Przetawiono wartość SEM co najmniej 3 niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna różnic określono za pomocą testu one-way ANOVA oraz testu wielokrotnych porównań Dunnetta (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$); gdzie: * - różnica istotna statystycznie pomiędzy PC3 traktowanymi wybranymi pochodnymi a kontrolą.

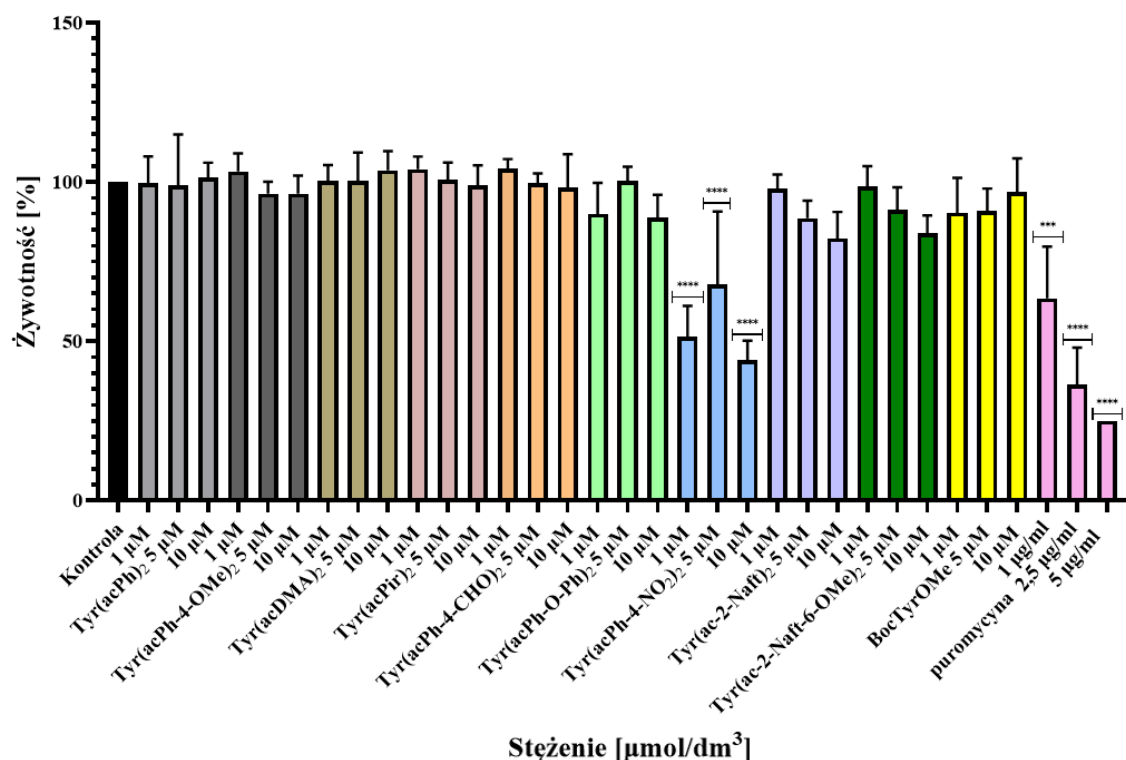
- Pochodne symetryczne

Linia komórkowa HaCaT



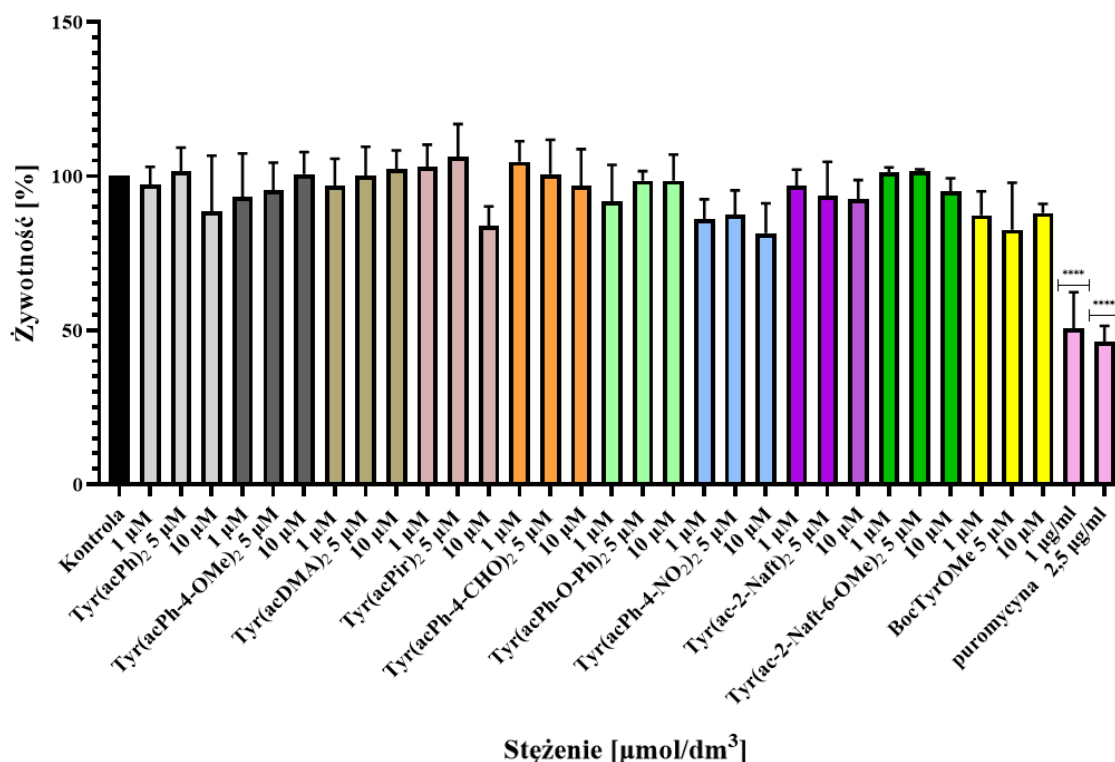
Rysunek 177. Wyniki testu MTT obrazujące zależność żywotności komórek z linii HaCaT od stężenia badanych symetrycznych pochodnych tyrozyny względem kontroli negatywnej (0 μM , komórki poddane działaniu czystego nośnika DMSO przyjęto za 100 %) po 24h traktowania. Przetawiono wartość SEM co najmniej 3 niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna różnic określono za pomocą testu one-way ANOVA oraz testu wielokrotnych porównań Dunnetta (**** $p < 0,0001$); gdzie: * - różnica istotna statystycznie pomiędzy HaCaT traktowanymi wybranymi pochodnymi a kontrolą.

Linia komórkowa MCF-7



Rysunek 178. Wyniki testu MTT obrazujące zależność żywotności komórek z linii MCF-7 od stężenia badanych symetrycznych pochodnych tyrozyny względem kontroli negatywnej (0 μM, komórki poddane działaniu czystego nośnika DMSO przyjęto za 100 %) po 24h traktowania. Przetawiono wartość SEM co najmniej 3 niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna różnic określono za pomocą testu one-way ANOVA oraz testu wielokrotnych porównań Dunnetta (**p<0,001, ***p<0,0001); gdzie: * - różnica istotna statystycznie pomiędzy MCF-7 traktowanymi wybranymi pochodnymi a kontrolą.

Linia komórkowa PC-3



Rysunek 179. Wyniki testu MTT obrazujące zależność żywotności komórek z linii PC-3 od stężenia badanych symetrycznych pochodnych tyrozyny względem kontroli negatywnej (0 μM, komórki poddane działaniu czystego nośnika DMSO przyjęto za 100 %) po 24h traktowania. Przetawiono wartość SEM co najmniej 3 niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna różnic określono za pomocą testu one-way ANOVA oraz testu wielokrotnych porównań Dunnetta (**** $p < 0,0001$); gdzie: * - różnica istotna statystycznie pomiędzy PC3 traktowanymi wybranymi pochodnymi a kontrolą.

Uzyskane wyniki wskazują, że większość badanych związków nie wykazuje istotnego wpływu na żywotność żadnej z analizowanych linii komórkowych w badanym zakresie stężeń. W przypadku komórek prawidłowych (linia HaCaT) spadek żywotności zaobserwowano jedynie dla pochodnej asymetrycznej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) (Rysunek 174) w stężeniach 5 i 10 μM. Pochodne asymetryczne nie wpływały znacząco na żywotność komórek raka piersi (linia MCF-7; Rysunek 175). W grupie pochodnych symetrycznych spadek żywotności komórek tej linii zauważalny był wyłącznie dla Tyr(acPh-4-NO₂)₂ (we wszystkich badanych stężeniach; Rysunek 178). Ponieważ w analogicznie traktowanych komórkach prawidłowych (HaCaT) nie wywoływała ona

istotnego statystycznie obniżenia żywotności, może to sugerować pewną selektywność jej działania w kierunku komórek nowotworowych piersi. Komórki raka prostaty (linia PC-3) wykazały wysoką odporność na działanie większości badanych pochodnych. Zauważono istotny statystycznie spadek żywotności w przypadku Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) (stężenie 10 μ M, Rysunek 176).

Ochroniony aminokwas BocTyrOMe użyty jako odnośnik w większości przypadków nie wykazywał działania cytotoksycznego wobec wszystkich testowanych linii komórkowych. Wyjątek stanowi zaobserwowane istotne statystycznie obniżenie żywotności komórek PC-3 (stężenie 5 μ M, Rysunek 176). Również większość z badanych asymetrycznych i symetrycznych analogów aminokwasów niebiałkowych zawierających fragment tyrozyny z wiązaniem potrójnym nie wpływały istotnie na żywotność komórek, co sugeruje brak efektu cytotoksycznego wynikającego z wprowadzonych modyfikacji strukturalnych.

Zgodnie z oczekiwaniami, puromycyna - kontrola pozytywna - wyraźnie obniżała żywotność komórek wszystkich badanych linii, potwierdzając prawidłowość przeprowadzenia testu.

6. Badanie zdolności do przenikania przez modelowe błony komórkowe oraz błony komórkowe komórek nowotworowych

Zdolność związków chemicznych do przenikania przez błony biologiczne stanowi jeden z kluczowych czynników determinujących ich potencjał aplikacyjny. Efektywna penetracja przez dwuwarstwą lipidową warunkuje biodostępność, możliwość dotarcia do miejsca działania oraz oddziaływanie z wewnątrzkomórkowymi celami molekularnymi. W niniejszym rozdziale przedstawiłam badania dotyczące zdolności otrzymanych acetylenowych pochodnych tyrozyny do przenikania przez modelowe błony komórkowe oraz błony komórkowe komórek nowotworowych. Analiza ta pozwoliła na ocenę właściwości transportowych badanych związków oraz określenie ich potencjalnej skuteczności w warunkach biologicznych.

Badania zdolności do oddziaływania i przenikania przez modelowe błony komórkowe, takie jak duże jednowarstwowe liposomy (LUV) oraz gigantyczne jednowarstwowe liposomy (GUV) zrealizowałam podczas stażu naukowego w Instytucie Chemii Fizycznej im. J. Heyrovskiego, Czeska Akademia Nauk. Badania były realizowane pod opieką prof. Martina Hofa, dr. Radka Šachla oraz dr. Petera Kapusty.

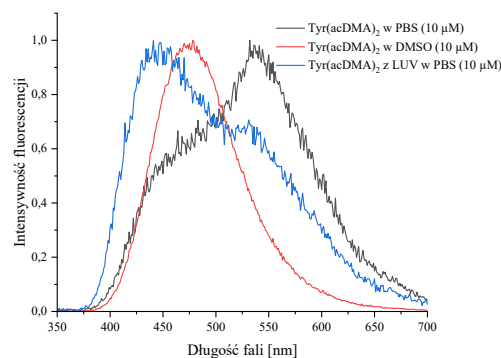
Badania wykonywałam na początkowym etapie realizacji pracy doktorskiej dlatego obejmowały tylko trzy pochodne: Tyr(acDMA)₂, Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) oraz Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂.

6.1. Badania z wykorzystaniem LUV

Liposomy przygotowałam metodą hydratacji cienkiego filmu lipidowego, a dalsze etapy obejmowały formowanie i homogenizację pęcherzyków lipidowych zgodnie z protokołem opracowanym w jednostce, w której realizowałam staż. Roztwór macierzysty POPC o stężeniu 0,12 mM rozpuściłam w chloroformie. Następnie, poprzez odparowanie chloroformu w eksykatorze pod zmniejszonym ciśnieniem przez jedną godzinę w temperaturze pokojowej, uzyskałam cienką warstwę lipidową. Do otrzymanego filmu lipidowego dodałam 400 µl buforu PBS, po czym próbkę intensywnie mieszałam przez 30 minut, aby utworzyć jednowarstwowe pęcherzyki lipidowe. W celu uzyskania jednorodnej populacji LUV, zawiesinę filtrowałam 20-krotnie przez membranę poliwęglanową o średnicy porów 50 nm (Whatman). Tak przygotowane liposomy charakteryzują się wysoką stabilnością koloidalną i są powszechnie stosowane jako modelowe układy błonowe lub nośniki substancji biologicznie czynnych w badaniach biofizycznych i farmaceutycznych.

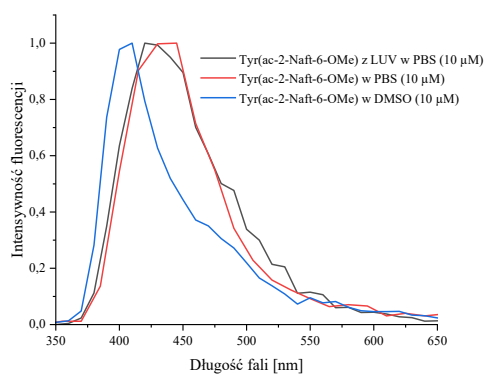
Kuwety wykorzystane do badania widm emisji przygotowałam poprzez pokrycie ich powierzchni BSA (ang. *Bovine Serum Albumin*, 2 mg/ml). Po kilku minutach naczynie pomiarowe przepłukałam wodą demineralizowaną i dodałam 50 µl otrzymanego roztworu z LUV oraz 40 µl roztworu PBS. Wybrane pochodne zostały rozpuszczone w DMSO i wprowadzane do układu pomiarowego tak, aby ich stężenie końcowe wyniosło 10 µM, a DMSO stanowiło 1 % objętości badanej próbki. Pomiar widm związków o tym samym stężeniu w czystym DMSO oraz w PBS bez dodatku LUV wykonałam porównawczo.

W celu weryfikacji oddziaływań wybranych związków z liposomami zmierzyłam widma emisji w PBS, w PBS z dodatkiem liposomów i w DMSO (Rysunek 180 - 182).



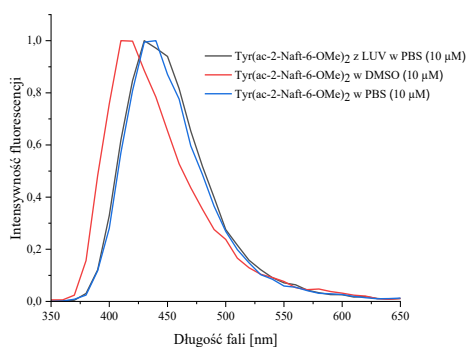
Rysunek 180. Widma emisji zarejestrowane dla Tyr(acDMA)₂ o stężeniu 10 μM w roztworze PBS, DMSO oraz w PBS z dodatkiem LUV.

Analiza widm emisji dla pochodnej Tyr(acDMA)₂ (Rysunek 180) wykazała, iż zarejestrowane widmo układu z liposomami (linia niebieska) przesunęło się hipsochromowo względem widma zmierzonego dla pochodnej w DMSO (linia czerwona) czy w buforze (linia czarna), stanowiącymi środowiska polarne. Wskazuje to na zmianę polarności otoczenia w jakim znalazł się związek, a dokładnie na obniżenie tej polarności. Sugeruje to, iż badana pochodna oddziałuje z membraną LUV zbudowaną z niepolarnych fosfolipidów.



Rysunek 181. Widma emisji zarejestrowane dla Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) o stężeniu 10 μM w roztworze PBS, DMSO oraz w PBS z dodatkiem LUV.

Widmo emisji zmierzone dla pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) (Rysunek 181) w obecności LUV pokrywa się z widmem emisji zmierzonym w samym buforze. Obserwacje wskazują, że związek mógł przeniknąć do wnętrza liposomów wypełnionych buforem lub doprowadzić do ich dezintegracji.



Rysunek 182. Widma emisji zarejestrowane dla $\text{Tyr}(\text{ac-2-Naft-6-OMe})_2$ o stężeniu $10\ \mu\text{M}$ w roztworze PBS, DMSO oraz w PBS z dodatkiem LUV.

Analogiczną sytuację obserwuje się w przypadku pochodnej $\text{Tyr}(\text{ac-2-Naft-6-OMe})_2$ (Rysunek 182).

6.2. Badania z wykorzystaniem GUV

Liposomy przygotowałam metodą elektroformacji, która umożliwia otrzymanie gigantycznych jednowarstwowych pęcherzyków lipidowych (GUV) o wysokiej jednorodności i integralności błony.

Roztwór macierzysty lipidów przygotowałam poprzez rozpuszczenie POPC, Biotin-DOPE oraz barwnika fluorescencyjnego ATTO 643 w stosunku molowym 1 : 100 : 1000 w chloroformie. Naniosłam po $10\ \mu\text{l}$ przygotowanego roztworu na powierzchnię dwóch równoległych cylindrycznych elektrod platynowych, które następnie pozostawiłam w atmosferze azotu w celu całkowitego odparowania rozpuszczalnika organicznego. Po wysuszeniu elektrod umieściłam je w komorze elektroformacyjnej wypełnionej wodnym roztworem sacharozy o stężeniu $290\ \text{mM}$.

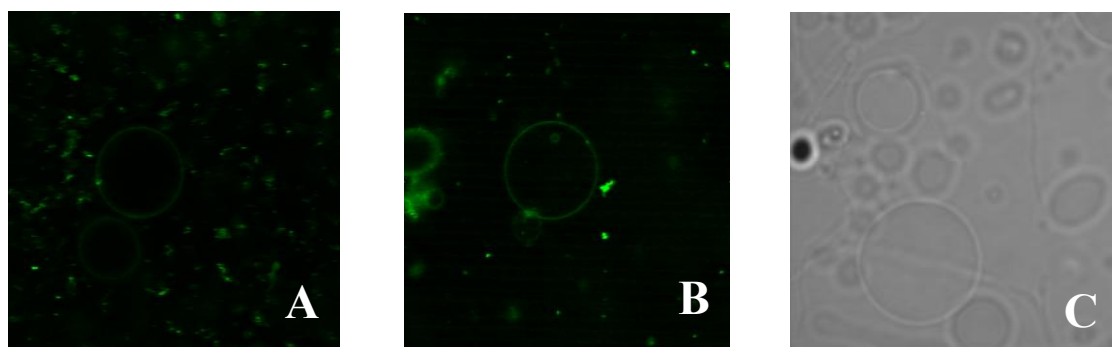
Proces elektroformacji liposomów prowadziłam w zmiennym polu elektrycznym o częstotliwości $10\ \text{Hz}$ przez $3000\ \text{s}$, a następnie $2\ \text{Hz}$ przez kolejne $1200\ \text{s}$. Wszystkie eksperymenty przeprowadziłam przy napięciu poniżej $3\ \text{V}$, aby zapobiec uszkodzeniu lipidowych błon pęcherzyków. Temperatura podczas elektroformacji była utrzymywana na poziomie $45\ ^\circ\text{C}$, co zwiększało płynność lipidów i sprzyjało samoorganizacji błon.

Tak przygotowane liposomy (GUV) charakteryzowały się dużymi rozmiarami (rzędu kilku do kilkudziesięciu mikrometrów) oraz wysoką jednorodnością morfologiczną.

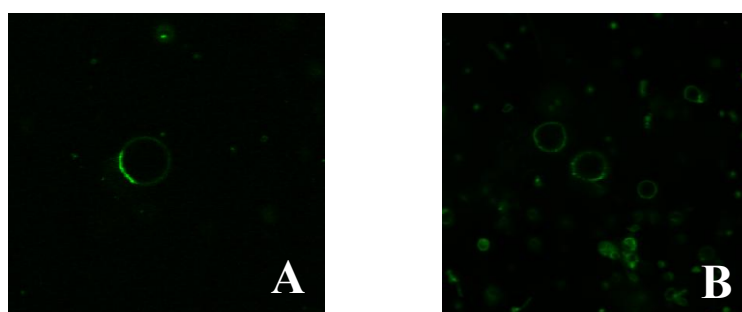
Mieszaninę liposomów umieściłam w płytkach 8-dołkowych wcześniej przygotowanych poprzez przemycie każdego dołka $200\ \mu\text{l}$ BSA/Biot (biotynylowane BSA, $0,1\ \text{mg/ml}$)

i pozostawienie na 10 min, następnie przemyć wodą demineralizowaną i dodanie 200 μ l streptawidyny (20 μ g/ml). Po 10 min płytki przemyłam wodą demineralizowaną i dodałam do każdego z dołków 200 μ l wodnego roztworu glukozy (290 mM) oraz 50 μ l uformowanych liposomów. Inkubacja przebiegała w temperaturze pokojowej, na blacie laboratoryjnym, pod przykryciem. Następnie do każdego z dołków z liposomami w roztworze glukozy dodawałam wybrane pochodne rozpuszczone w DMSO i wprowadzone do układu pomiarowego tak, aby ich stężenie końcowe wyniosło 10 μ M lub 100 μ M, a DMSO stanowiło 1 % objętości badanej próbki.

Dzięki obecności Biotin-DOPE oraz barwnika ATTO 643 możliwe było badanie oddziaływań związków z liposomami przy użyciu obrazowania za pomocą Olympus FluoView1000 MPE (Rysunek 183 oraz 184).



Rysunek 183. Zdjęcia zarejestrowane za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego. A - GUV po dodaniu Tyr(acDMA)₂ uzyskując finalne stężenie związku wynoszące 10 μ M, B - GUV po dodaniu Tyr(acDMA)₂ uzyskując finalne stężenie związku wynoszące 100 μ M, C - zdjęcia GUV w świetle przechodzącym przed dodaniem związku. Rozmiar zdjęć: 105 x 105 μ m.

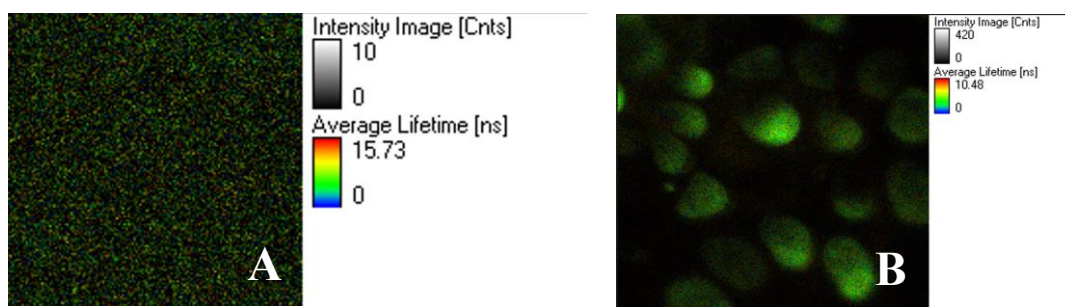


Rysunek 184. Zdjęcia zarejestrowane za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego. A - GUV po dodaniu Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) uzyskując finalne stężenie związku wynoszące 10 μ M, B - GUV po dodaniu Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) uzyskując finalne stężenie związku wynoszące 100 μ M. Rozmiar zdjęć: 210 x 210 μ m.

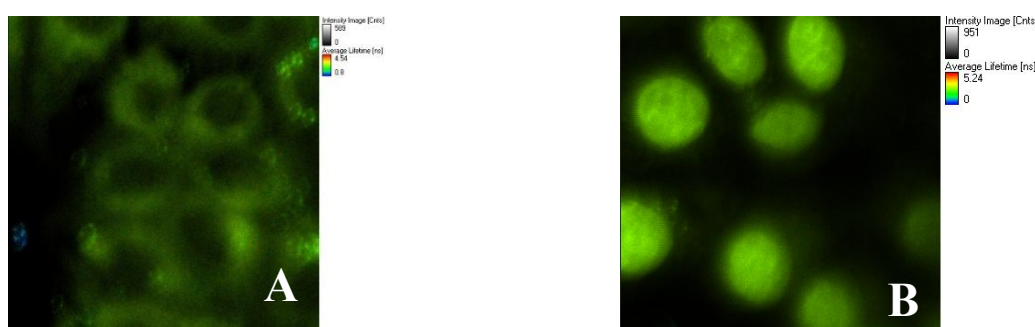
Pochodna Tyr(acDMA)₂ już w niższym z badanych stężeń oddziaływała z membranami liposomów kumulując się głównie na ich powierzchni (Rysunek 183). Wyniki badań są zgodne z wynikami badań przeprowadzonych z wykorzystaniem LUV. Pochodna Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) oddziaływała z powierzchnią membran GUV jednocześnie powodowała stopniową dezintegrację pęcherzyków, co zostało zaobserwowane w czasie rzeczywistym podczas eksperymentu (Rysunek 184). W przypadku pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂ nie udało się zarejestrować zdjęć potwierdzających wystąpienie oddziaływań pomiędzy liposomami a związkiem. Po wprowadzeniu związku do układu powodował on całkowitą dezintegrację GUV.

6.3. Badanie zdolności do przenikania przez błony komórkowe komórek nowotworowych

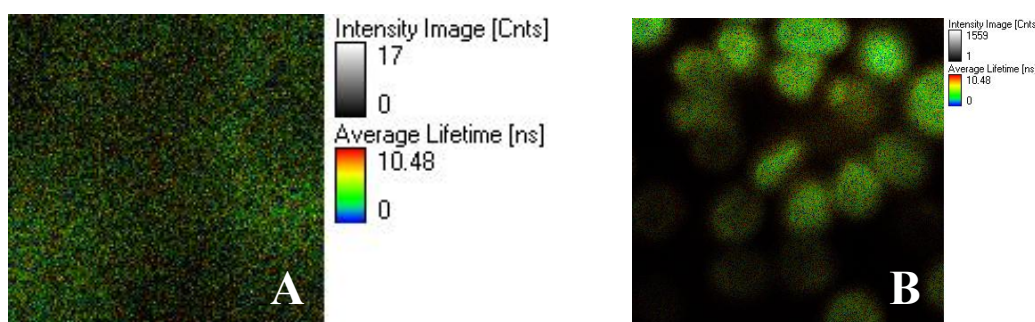
Badania zdolności do przenikania przez błony komórkowe komórek nowotworowych MCF-7 przeprowadziłam z wykorzystaniem fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego MT200 Picoquant z techniką FLIM. Do badań wykorzystałam komórki raka piersi (linia komórkowa MCF-7). Warunki hodowli komórek były analogiczne, jak opisane w sekcji 5 części doświadczalnej. Stężenie komórek jakie wykorzystywałam do posiewów w płytkach 6-dołkowych wyniosło 5×10^5 na 2 ml pożywki. Finalne stężenie badanych związków w układach wyniosło 10 μ M. Związki były inkubowane z komórkami przez 24 h. Jako próbę kontrolną pozytywną wykorzystałam Hoest - znacznik fluorescencyjny dostępny komercyjnie, który wykorzystywany jest do barwienia jąder komórkowych. Hoest został użyty w stężeniu 18 μ M i był inkubowany z komórkami 15 min przed badaniem. Badaniom zostały poddane tylko wybrane pochodne, takie jak: Tyr(acDMA), Tyr(acDMA)₂, Tyr(acPh-4-NO₂), Tyr(acPh-4-NO₂)₂, Tyr(acPir)₂ oraz Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂, których długofalowe pasma absorpcji umożliwiały wzbudzenie przy użyciu laserów stanowiących źródła światła w wykorzystanym fluorescencyjnym mikroskopie konfokalnym (Rysunek 185 - 190).



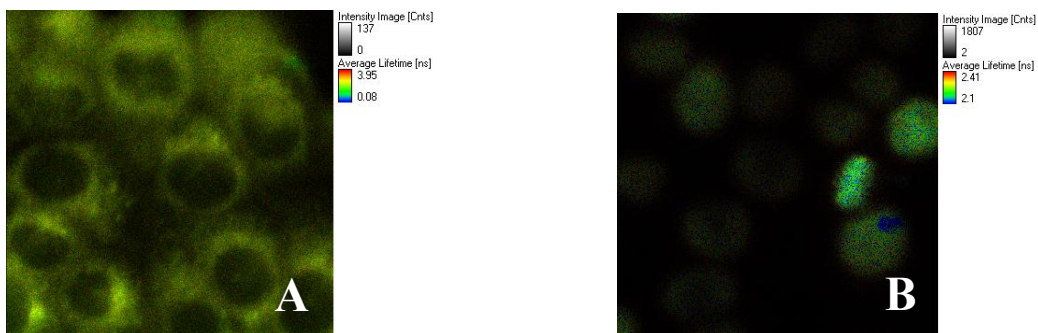
Rysunek 185. A - Obraz zarejestrowany dla próbki zawierającej komórki MCF-7 po 24h inkubacji ze związkiem Tyr(acDMA) o stężeniu 10 μ M, B - zdjęcie zarejestrowane po 24 h inkubacji ze związkiem Tyr(acDMA) o stężeniu 10 μ M oraz po 15 min inkubacji z Hoestem. Rozmiar zdjęć: 80 x 80 μ m.



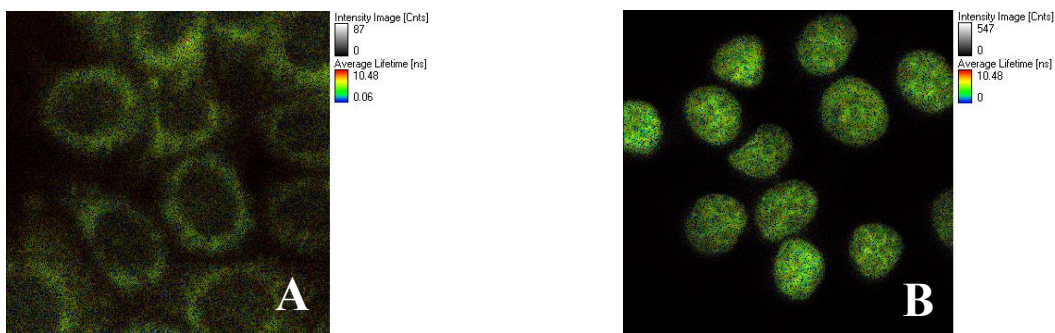
Rysunek 186. A - Zdjęcie komórek MCF-7 po 24 h inkubacji ze związkiem Tyr(acDMA)₂ o stężeniu 10 μ M, B - zdjęcie zarejestrowane po 24 h inkubacji ze związkiem Tyr(acDMA)₂ o stężeniu 10 μ M oraz po 15 min inkubacji z barwnikiem Hoest. Rozmiar zdjęć: 80 x 80 μ m.



Rysunek 187. A - Obraz zarejestrowany dla próbki zawierającej komórki MCF-7 po 24 h inkubacji ze związkiem Tyr(acPh-4-NO₂) o stężeniu 10 μ M, B - zdjęcie zarejestrowane po 24 h inkubacji ze związkiem Tyr(acPh-4-NO₂) o stężeniu 10 μ M oraz po 15 min inkubacji z barwnikiem Hoest. Rozmiar zdjęć: 80 x 80 μ m.

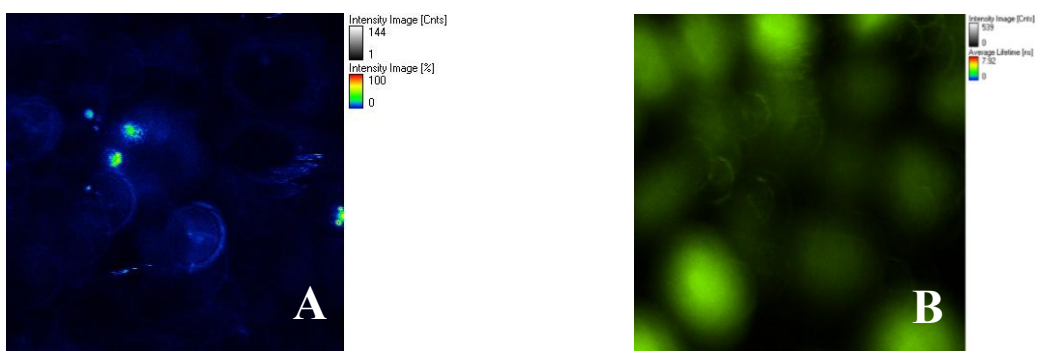


Rysunek 188. A - Zdjęcie komórek MCF-7 po 24 h inkubacji ze związkiem $\text{Tyr}(\text{acPh-4-NO}_2)_2$ o stężeniu $10\ \mu\text{M}$, B - zdjęcie zarejestrowane po 24 h inkubacji ze związkiem $\text{Tyr}(\text{acPh-4-NO}_2)_2$ o stężeniu $10\ \mu\text{M}$ oraz po 15 min inkubacji z barwnikiem Hoest. Rozmiar zdjęć: $80 \times 80\ \mu\text{m}$.



Rysunek 189. A - Zdjęcie komórek MCF-7 po 24 h inkubacji ze związkiem $\text{Tyr}(\text{acPir})_2$ o stężeniu $10\ \mu\text{M}$, B - zdjęcie zarejestrowane po 24 h inkubacji ze związkiem $\text{Tyr}(\text{acPir})_2$ o stężeniu $10\ \mu\text{M}$ oraz po 15 min inkubacji z barwnikiem Hoest.

Rozmiar zdjęć: $80 \times 80\ \mu\text{m}$.



Rysunek 190. A - Obraz zarejestrowany dla próbki zawierającej komórki MCF-7 po 24 h inkubacji ze związkiem $\text{Tyr}(\text{ac-2-Naft-6-OMe})_2$ o stężeniu $10\ \mu\text{M}$, B - zdjęcie zarejestrowane po 24 h inkubacji ze związkiem $\text{Tyr}(\text{ac-2-Naft-6-OMe})_2$ o stężeniu $10\ \mu\text{M}$ oraz po 15 min inkubacji z barwnikiem Hoest. Rozmiar zdjęć: $80 \times 80\ \mu\text{m}$.

Uzyskane wyniki sugerują, że w warunkach eksperymentu związki asymetryczne (Rysunek 185, 187) nie wykazywały zdolności do oddziaływania z komórkami nowotworowymi - nie wnikały do ich wnętrza ani nie akumulowały się w obrębie błony komórkowej w badanym stężeniu oraz po analizowanym czasie inkubacji. W przeciwieństwie do nich, związki symetryczne (Rysunek 186, 188, 189, 190) wykazywały wyraźne powinowactwo do komórek nowotworowych MCF-7, gromadząc się głównie w obszarze błony komórkowej.

Jako kontrolę pozytywną zastosowałam barwnik Hoest, który pozwalał na wizualizację jąder komórkowych i potwierdzenie obecności oraz integralności badanych komórek podczas prowadzonego eksperymentu.

Warto zaznaczyć, że brak zarejestrowanego sygnału fluorescencji dla badanych pochodnych asymetrycznych może wynikać z ograniczeń zastosowanego sprzętu i braku możliwości optymalnego wzbudzenia analizowanych związków. W związku z tym planowane jest powtórzenie eksperymentu z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego wyposażonego w źródło światła emitujące promieniowanie w krótkofalowym zakresie oraz ocena oddziaływań z komórkami przy wyższych stężeniach.

IV. Podsumowanie i wnioski

Założeniem pracy doktorskiej pod tytułem „*Fluorescencyjne analogi aminokwasów niebiałkowych z fragmentem tyrozyny - synteza, charakterystyka fotofizyczna i ocena aktywności biologicznej*” była synteza nowych aromatycznych acetylenowych pochodnych tyrozyny wykorzystując reakcję Sonogashiry-Hagihary, określenie ich właściwości spektralnych i fotofizycznych, takich jak: położenie widm absorpcji oraz emisji, określenie molowego współczynnika absorpcji, wyznaczenie wydajności kwantowych fluorescencji, czasów zaniku fluorescencji, jasności świecenia, określenie fotostabilności, sprawdzenie wpływu na żywotność wybranych linii komórkowych, takich jak: HaCaT, MCF-7, PC-3 oraz weryfikacja ich zdolności do penetracji modelowej błony komórkowej i błony komórkowej komórek MCF-7. Realizacja wszystkich przedstawionych zadań badawczych umożliwiła finalnie uzyskanie nowych fluoroforów, określenie ich właściwości oraz zdefiniowanie potencjału aplikacyjnego otrzymanych pochodnych.

Otrzymałam łącznie 18 asymetrycznych i symetrycznych acetylenowych pochodnych tyrozyny zawierających w swojej budowie podstawniki aromatyczne o zróżnicowanym charakterze elektronoakceptorowym i elektronodonorowym, takie jak: fenyl, anizol, dimetyloanilinę, beznzaldehyd, fenoksybenzen, nitrobenzen, pirydynę, naftyl, metoksynaftalen oraz fenyl sprzężony poprzez wiązanie potrójne z dimetyloaniliną. Związki oczyściłam, a ich tożsamość potwierdziłam za pomocą widm mas oraz ^1H NMR. Asymetryczne i symetryczne acetylenowe pochodne tyrozyny otrzymałam ze zróżnicowaną wydajnością wahającą się między około 2 % a 40 %. Pochodnej asymetrycznej podstawionej pirydyną nie udało się wyizolować. 18 pochodnych scharakteryzowałam pod kątem właściwości spektralnych i fotofizycznych. Wpływ zmian pH na położenie widm absorpcji oraz emisji sprawdziłam dla 5 wybranych pochodnych, a wpływ obecności utleniacza i reduktora w środowisku dla 4 pochodnych. 17 z 18 związków przebadałam pod kątem wpływu na żywotność wybranych linii komórkowych. 3 pochodne poddałam badaniom oddziaływania z modelową błoną komórkową, a w przypadku 6 wybranych związków sprawdziłam zdolność do oddziaływania z błoną komórkową komórek MCF-7.

W ramach pracy doktorskiej dodatkowo przeprowadziłam badania właściwości spektroskopowych oraz cytotoksyczności osłoniętej pochodnej tyrozyny (BocTyrOMe) jako związku odniesienia dla otrzymanych osłoniętych acetylenowych pochodnych

tyrozyny. Pozwoliło to jednoznacznie stwierdzić, jak wprowadzone modyfikacje strukturalne wpłynęły na analizowane właściwości zsyntezowanych pochodnych.

W każdym z przebadanych przypadków maksima widm absorpcji były przesunięte o co najmniej 27 nm (Tyr(acPh) zmierzone w MeCN), a najwięcej o 104 nm (Tyr(acPh-O-Ph) zmierzone w PBS) w kierunku dłuższych fal w porównaniu z BocTyrOMe (Tabela 2, 6). Wartości molowego współczynnika absorpcji są w każdym przypadku wyższe przy czym najmniejszy wzrost zaobserwowałam dla pochodnej Tyr(acPh-4-NO₂) w CX (4,7-krotny wzrost względem BocTyrOMe), a największy dla Tyr(acPhacDMA) w MeOH (około 100-krotny wzrost względem BocTyrOMe) (Tabela 2, 6).

Maksima widm emisji przesunęły się batochromowo najmniej o 27 nm (Tyr(acPh) zmierzone w MeOH) oraz maksymalnie o 288 nm (Tyr(acPh-4-NO₂) zmierzone w MeOH). Widma emisji w większość przypadków charakteryzują się dużą wrażliwością na zmiany polarności środowiska w przeciwieństwie do BocTyrOMe (Tabela 2, 6).

Przesunięcia Stokesa dla otrzymanych pochodnych mieszczą się w zakresie od 69 do około 11000 cm⁻¹ - dla osłoniętej tyrozyny od około 1200 do 2700 cm⁻¹ (Tabela 6).

Wydajność kwantowa asymetrycznych i symetrycznych pochodnych jest zróżnicowana i zależna od użytego podstawnika, jak i otoczenia pomiarowego. Jej wartości wahają się od około 1 % do 100 % (Tabela 2, 4).

Tabela 6. Zestawienie właściwości spektroskopowych dla BocTyrOMe w warunkach analogicznych dla badanych acetylenowych pochodnych tyrozyny.

Związek	Rozpuszalnik	λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]	ϵ [dm ³ /mol · cm]	Przesunięcie Stokesa [cm ⁻¹]	QY	Jasność $\epsilon \times QY$
BocTyrOMe	MeCN	277	296	2220	2317	0,081	180
	MeOH	278	301	1540	2749	0,11	169
	CX	277	287	1640	1258	0,12	197
	PBS	276	299	1290	2787	0,072	93

Jasność świecenia w większości przypadków jest wielokrotnie wyższa niż jasność stosowanego odniesienia. Warto podkreślić, że parametr ten - definiujący jednocześnie efektywność związku jako chromoforu i fluoroforu - jest zbliżony do lub wyższy od jasności świecenia komercyjnie dostępnych znaczników fluorescencyjnych (Tabela 7).

Tabela 7. Zestawienie jasności świecenia wybranych acetylenowych pochodnych tyrozyny oraz znaczników komercyjnych.^{1,179–181}

Nazwa związku	Rozpuszczalnika	Jasność świecenia
BocTyrOMe	MeCN	180
	MeOH	170
	CX	197
	PBS	93
Tyr(acDMA)	PBS	76000
Tyr(acPhacDMA)	MeOH	100000
Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂	MeCN	54000
	MeOH	56000
	CX	49000
	PBS	79000
chinina	H ₂ O (pH = 2)	3000
BODIPY-FL	MeOH	86000
fluoresceina	H ₂ O (pH = 9)	88000
rodamina 110	H ₂ O (pH = 7,5)	68000

Wprowadzenie do łańcucha bocznego podstawników elektronodonorowych, takich jak dimetyloanilina, anizol czy pochodne metoksynaftalenu, prowadziło do uzyskania szczególnie korzystnych właściwości spektroskopowych i fotofizycznych badanych związków, zwłaszcza w zakresie parametrów ilościowych, w porównaniu z pochodnymi zawierającymi podstawniki elektronoakceptorowe (np. nitrobenzenu czy benzaldehydu). Wyniki te wskazują, że obecność podstawników elektronodonorowych sprzyja stabilizacji stanów wzbudzonych oraz zwiększeniu efektywności procesów emisyjnych. Z kolei wprowadzenie podstawników elektronoakceptorowych prowadziło do batochromowego przesunięcia widm emisji, odzwierciedlającego stabilizację stanów wzbudzonych o niższej energii.

Modyfikacje polegające na wprowadzeniu symetrycznie układów aromatycznych do łańcucha bocznego tyrozyny nie prowadziły do znaczącej poprawy właściwości fotofizycznych w porównaniu z analogicznymi podstawnikami wbudowanymi asymetrycznie. Wskazuje to, iż liczba wprowadzonych podstawników w badanym układzie odgrywa mniejszą rolę niż ich charakter.

Wpływ zmian pH na właściwości spektroskopowe badanych pochodnych okazał się marginalny. W analizowanym zakresie pH nie zaobserwowano istotnych zmian ani w widmach absorpcji, ani w widmach emisji, co wskazuje na wysoką stabilność fotofizyczną badanych układów. Niezależnie od warunków środowiska fluorescencja pozostawała wyraźnie obserwowana, co potwierdza stabilność właściwości emisyjnych badanych związków oraz niewielki wpływ zmian pH na charakter stanu emitującego.

Przebadane pochodne wykazały wysoką odporność zarówno na działanie czynników utleniających, jak i redukujących. W przeprowadzonych eksperymentach nie obserwowano istotnych zmian właściwości optycznych badanych związków, co wskazuje na wysoką stabilność badanych układów w zróżnicowanych warunkach redoks. Szczególnie istotne jest, że we wszystkich analizowanych przypadkach sygnał fluorescencji pozostawał wyraźnie rejestrowalny nawet po 24 h inkubacji w obecności utleniacza lub reduktora. Obserwowane zmiany dotyczyły głównie intensywności fluorescencji, natomiast profil widm emisji pozostawał niezmienny, co sugeruje zachowanie tego samego układu emitującego oraz wysoką stabilność właściwości emisyjnych badanych pochodnych. Wyniki te wskazują również na przewidywalny charakter odpowiedzi fluorescencyjnej analizowanych związków, istotny z punktu widzenia potencjalnych zastosowań aplikacyjnych.

Większość przebadanych pochodnych wykazywała wysoką fotostabilność i nie ulegała istotnej fotodegradacji w warunkach prowadzonych eksperymentów. Analiza RP-HPLC nie wykazała obecności produktów fotodegradacji, co wskazuje na zachowanie integralności chemicznej badanych układów pomimo ekspozycji na promieniowanie UV. Dodatkowo obserwowane zmiany dotyczyły głównie intensywności fluorescencji, natomiast profil widm emisji pozostawał niezmienny, co sugeruje zachowanie tego samego układu emitującego. Wyniki te potwierdzają wysoką stabilność właściwości emisyjnych badanych pochodnych oraz ich potencjalną przydatność w zastosowaniach wymagających długotrwałej i przewidywalnej emisji sygnału fluorescencyjnego.

Związki zostały przebadane pod kątem wpływu na żywotność wybranych linii komórkowych, takich jak: HaCaT, MCF-7, PC-3. Pochodne w większości przypadków nie wpływały znacząco na żywotność wybranych linii komórkowych, co potwierdza ich biogodność i otwiera możliwość wykorzystania w badaniach *in vitro*. Co istotne, dla części otrzymanych związków, szczególnie układów symetrycznych, zaobserwowano zdolność do interakcji z błonami komórkowymi, co wskazuje na ich potencjał jako sond środowiskowych oraz znaczników fluorescencyjnych do obrazowania struktur komórkowych. Uzyskane wyniki sugerują również możliwość zastosowania tych układów do monitorowania zmian fizykochemicznych zachodzących w obrębie błon biologicznych i mikrośrodowiska komórkowego. Dodatkowym atutem badanych związków jest ich charakter nieproteinogennych aminokwasów oraz obecność

reaktywnych grup funkcyjnych, co stwarza możliwość ich dalszej funkcjonalizacji oraz wprowadzania do bardziej złożonych układów biologicznych, takich jak peptydy i białka.

Podsumowując, otrzymane w ramach pracy doktorskiej pochodne aminokwasów niebiałkowych stanowią obiecującą grupę związków o szerokim potencjale aplikacyjnym. Dzięki obecności dwóch grup funkcyjnych umożliwiają one znakowanie peptydów, białek oraz innych układów biologicznych bez konieczności stosowania dużych komercyjnych fluoroforów, których rozmiar, charakter chemiczny lub aktywność biologiczna mogą wpływać na właściwości badanych układów.

Uzyskane pochodne charakteryzują się korzystnymi właściwościami spektroskopowymi i fotofizycznymi, obejmującymi wysoką jasność fluorescencji, dobrą fotostabilność oraz zachowanie właściwości emisyjnych w zróżnicowanych warunkach środowiskowych. Właściwości te wskazują na możliwość wykorzystania acetylenowych pochodnych tyrozyny w technikach bioobrazowania oraz monitorowaniu lokalizacji i oddziaływań biomolekuł w układach komórkowych.

Istotnym atutem badanych układów jest również ich biokompatybilność względem analizowanych linii komórkowych, co umożliwia potencjalne zastosowanie w badaniach *in vitro*. Niewielka lub umiarkowana wrażliwość na zmiany pH oraz obecność modelowych utleniaczy i reduktorów sugeruje dodatkowo możliwość wykorzystania tych związków w warunkach fizjologicznych, gdzie mikrośrodowisko biologiczne podlega dynamicznym zmianom składu chemicznego i potencjału redoks.

Dla części otrzymanych analogów zaobserwowano zdolność do interakcji z błonami komórkowymi, co otwiera możliwość projektowania sond fluorescencyjnych wrażliwych na zmiany mikrośrodowiska membran biologicznych. W przyszłości właściwości te mogą znaleźć zastosowanie w badaniach organizacji błon oraz procesów związanych z dynamiką i reorganizacją struktur komórkowych.

Uzyskane wyniki wskazują, że opracowane pochodne mogą stanowić wartościowe narzędzia do badań biofizycznych i biochemicznych oraz punkt wyjścia do dalszego projektowania funkcjonalnych znaczników fluorescencyjnych i układów sensorycznych dla zastosowań w naukach biologicznych i biomedycznych.

W szerszej perspektywie ich właściwości czynią je atrakcyjnymi kandydatami do zastosowań w szeroko pojętych naukach *life science* i projektowaniu innowacyjnych systemów diagnostycznych, co podkreśla ich interdyscyplinarne znaczenie oraz wartość naukową uzyskanych wyników

V. Dorobek naukowy

Publikacje naukowe:

1) Hać A., Sildatk-Czostka M., Wierzbička M., **Stepasiuk-Stańko A.**, Herman-Antosiewicz A., Wiczek W., Bylińska I., New fluorescently labeled isothiocyanate derivatives as a potential cancer theranostic tool, *Sci. Rep.*, **15**, 41714 (2025).

Komunikaty konferencyjne:

1) **Stepasiuk A.**, Hać A., Johanovska Z., Šachl R., Hof M., Herman-Antosiewicz A., Bylińska I., Diagnostic potential of fluorescently labeled isothiocyanate derivatives, Natural Science Baltic Conference 2025, Online, Polska.

2) Urbaniak M. M., Gazińska M., Płociński P., Szwed-Georgiou A., Włodarczyk M., Krupa A., Biernat M., Sawicka J., Krokos A., Sztetner P., Rodziewicz-Motowidło S., **Stepasiuk A.**, Cybulski M. K., Chmiela M., Rudnicka K., From alkaptonuria to bone regeneration: pyromelanin as a game-changer in biomaterial-based osteoregeneration, International Conference IMPLANTS 2025, 2025, Sopot, Polska.

3) Zaucha W., **Stepasiuk A.**, Bylińska I., Synteza oraz badanie właściwości spektralnych i fotofizycznych nowych acetylenowych pochodnych tyrozyny, VII Konferencja Naukowa Chemia - Biznes - Środowisko (ChemBiś 2025), 2025, Gdańsk, Polska.

4) Bylińska I., **Stepasiuk A.**, Hać A., Wiczek W., Herman-Antosiewicz A., Fluorescent anticancer isothiocyanates derivatives as potential theranostic tools, 4th International Conference on Cancer Science and Therapy (Cancer World 2024), 2024, Online, UK.

5) Lavrynychuk Y., Skibiński J., Bandyra K., Zarzecka U., **Stepasiuk A.**, Bylińska I., Dziadek J., Chmiela M., Płociński P., Targeting bacterial RNA metabolism with novel antimicrobial drugs, 9th International Weigl Conference, 2024, Rzeszów, Polska.

6) **Stepasiuk A.**, Hać A., Sildatk-Czostka M., Witkowska J., Wiczek W., Herman-Antosiewicz A., Bylińska I., Nowa nadzieja dla pacjentów onkologicznych - Fluorescencyjne antynowotworowe pochodne izotiocyanianów jako narzędzia umożliwiające jednoczesną diagnozę i terapię, XX Ogólnopolskie seminarium dla doktorantów i studentów „Na pograniczu chemii, biologii i farmacji”, 2024, Jarnołtówek, Polska.

7) **Stepasiuk A.**, Hać A., Wiczek W., Herman-Antosiewicz A., Bylińska I., Fluorescent anticancer isothiocyanate derivatives as theranostic tools, Natural Science Baltic Conference, 2024, Online, Polska.

- 8) Zaucha W., **Stepasiuk A.**, Bylińska I., Właściwości, potencjalne zastosowania i biologiczne znaczenie aminokwasów niebiałkowych, VI Konferencja Naukowa Chemia - Biznes - Środowisko (ChemBiŚ 2024), 2024, Gdańsk, Polska.
- 9) **Stepasiuk A.**, Bylińska I., Synteza i właściwości spektroskopowe fluorescencyjnych pochodnych tyrozyny, Ogólnopolska Konferencja Nauk Przyrodniczych i Nauk o Życiu dla Doktorantów „Bio Idea 4.0”, 2024, Online, Polska.
- 10) Bylińska I., Guzow K., **Stepasiuk A.**, Wiczek W., New non-proteinogenic fluorescent amino acids: Benzoxazol-5-yl-alanine derivatives containing acetylene unit, the Polish National Scientific Conference "e-Factory of Science", 9th Edition, 2023, Online, Polska.
- 11) **Stepasiuk A.**, Bylińska I., Fluorescencyjne pochodne zawierające szkielet tyrozyny, XIX Ogólnopolskie seminarium dla doktorantów i studentów „Na pograniczu chemii i biologii”, 2023, Trzebieiszowice, Polska.
- 12) **Stepasiuk A.**, Bylińska I., Fluorescent non-proteinogenic amino acids - tyrosine derivatives containing a triple bond between carbon atoms, II Kongres Młodej Nauki, 2022, Gdańsk, Polska.
- 13) **Stepasiuk A.**, Bylińska I., New fluorescent derivatives of non-protein amino acids, International Meeting CYSTATINS 2022, 2022, Gdańsk, Polska.
- 14) Wtulich J., **Stepasiuk A.**, Bylińska I., Tyrosine acetylene derivatives as a new group of effective fluorophores, the 8th EuChemS Chemistry Congress (ECC8), 2022, Lizbona, Portugalia.
- 15) **Stepasiuk A.**, Bylińska I., Aktywność biologiczna naturalnie występujących izotiocyjanianów, II Pomorskie Studenckie Sympozjum Chemiczne (II PSSCh), 2021, Online, Polska.
- 16) **Stepasiuk A.**, Hać A., Bylińska I., Aktywność antynowotworowa pochodnych sulforafanu, III Studencka Konferencja Naukowa im. prof. Antoniego Hoborskiego (III SKNS), 2020, Online, Polska.

Zgłoszenia patentowe:

- 1) Współautor zgłoszenia patentowego: Związki znakowane fluorescencyjnie i ich zastosowanie medyczne, I. Bylińska, A. Hać, A. Herman-Antosiewicz, M. Sildatk-Czostka, **A. Stepasiuk**, W. Wicz, zgłoszenie patentowe nr: PL445727, WIPO ST 10/C (z dnia 1.08.2023).
- 2) Współautor zgłoszenia patentowego: Związki znakowane fluorescencyjnie i ich zastosowanie medyczne, I. Bylińska, A. Hać, A. Herman-Antosiewicz, **A. Stepasiuk**, W. Wicz, zgłoszenie patentowe nr PL445728, WIPO ST 10/C (z dnia 1.08.2023).

Projekty badawcze:

- 1) 2025 - kierownik projektu badawczego „*Badanie potencjału diagnostycznego fluorescencyjnie znakowanych pochodnych izotiocyjanianów*”, finansowanego w ramach konkursu „Badania Młodych Naukowców 2025”, Uniwersytet Gdański.
- 2) 2024 - kierownik projektu badawczego „*Synteza i charakterystyka spektroskopowa wybranych aromatycznych pochodnych tyrozyny*”, finansowanego w ramach konkursu „Badania Młodych Naukowców 2024”, Uniwersytet Gdański.
- 3) 2023 - 2024 - kierownik projektu badawczego „*Nowa nadzieja dla pacjentów onkologicznych - fluorescencyjnie znakowane pochodne izotiocyjanianów jako narzędzia do jednoczesnej diagnostyki i terapii*”, finansowanego w ramach programu „Talenty Jutra II”, Fundacja Empiria i Wiedza.
- 4) 2023 - kierownik projektu badawczego „*Synteza i badanie właściwości fotofizycznych wybranych aromatycznych pochodnych acetylenowych aminokwasów niebiałkowych zawierających szkielet tyrozyny*”, finansowanego w ramach konkursu „Badania Młodych Naukowców 2023”, Uniwersytet Gdański.
- 5) 2022 - 2025 - wykonawca projektu badawczego „*Badania strukturalne nad udziałem degradozomu RNA w trans-translacji w świetle aktywności przeciwdrobnoustrojowej pirazynamidu - perspektywy opracowania leków przeciw(myko)bakterijnych*”, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (UMO-2019/34/E/NZ1/00338), kierownik projektu: dr hab. Przemysław Płociński, prof. UŁ, Uniwersytet Łódzki.
- 6) 2022 - kierownik projektu badawczego „*Synteza i badanie właściwości fotofizycznych wybranych aromatycznych pochodnych acetylenowych aminokwasów niebiałkowych zawierających szkielet tyrozyny*”, finansowanego w ramach konkursu „Badania Młodych Naukowców 2022”, Uniwersytet Gdański.

Staże naukowe:

1) 07.2023 - 09.2023 - zagraniczny staż naukowy w Instytucie Chemii Fizycznej im. J. Heyrovskiego Czeskiej Akademii Nauk, Zakład Chemii Biofizycznej, Praga, Czechy.

Nagrody, wyróżnienia, stypendia:

1) 2025 - Laureatka II miejsca w IV edycji konkursu „Young Fahrenheit”, Uniwersytet Gdański, Gdańsk, Polska.

2) 2022 - Stypendium programu PROM (NAWA) - Międzynarodowa wymiana doktorantów i kadry akademickiej - dofinansowanie wyjazdu na konferencje EuChemS2022.

3) 2017, 2018, 2019, 2020 - Laureatka Stypendium Rektora Uniwersytetu Gdańskiego dla najlepszych studentów (studia I i II stopnia).

Działalność organizacyjna:

1) 2025 - Udział w organizacji międzynarodowej konferencji naukowej „IMPLANTY 2025”, Sopot, Polska.

2) 2023, 2024, 2025 - Udział w organizacji Dni Otwartych Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

3) 2022 - Udział w organizacji Dni Otwartych Katedry Chemii Biomedycznej podczas „Pikniku z Nauką” organizowanego przez Uniwersytet Gdański.

VI. Wykaz rysunków

Rysunek 1. Diagram Jabłońskiego obrazujący stan podstawowy S_0 , stany wzbudzone S_1 , S_2 i T_1 oraz możliwe przejścia elektronowe; $h\nu_A$ - absorpcja światła, $h\nu_F$ - emisja promieniowania w postaci fluorescencji, $h\nu_P$ - emisja promieniowania w postaci fosforescencji. ¹	9
Rysunek 2. Przesunięcie Stokesa. Widmo absorpcji oraz fluorescencji Tyr(acDMA) ₂ zmierzone w MeCN. Badania własne.	11
Rysunek 3. Uproszczony schemat działania fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego z techniką FLIM opierający się na metodzie TCSPC. ⁴⁹	17
Rysunek 4. Znormalizowane widma absorpcji i emisji kwasu tłuszczowego AP-C12 zmierzone w różnych rozpuszczalnikach, obrazujące negatywny efekt solwatochromowy. ⁵⁷	19
Rysunek 5. Wygaszanie fluorescencji opierające się na przejściach międzysystemowych, gdzie: F^* - cząsteczka znajdująca się w stanie wzbudzony singletowym, F^*_T - cząsteczka znajdująca się w stanie wzbudzony trypletowym, k_{ISC} - stała szybkości przejść międzysystemowych, k_{nr} - stała szybkości przejścia niepromienistego, $k[Q]$ - stała szybkości wygaszania fosforescencji, Q - wygaszacz fluorescencji lub fosforescencji. ¹	25
Rysunek 6. Wygaszanie fluorescencji opierające się na wymianie elektronów (oddziaływania Dexter); D - donor, A - akceptor, D^* - wzbudzona forma donora, A^* - wzbudzona forma akceptora. ¹	26
Rysunek 7. Struktura pochodnej izotiocyanianowej fluoresceiny (FITC).	27
Rysunek 8. Struktury komercyjnych znaczników fluorescencyjnych; od lewej Oregon Green® 488 i 514 oraz Rhodamine Green™ - X.	28
Rysunek 9. 5-karboksytetrametylorodamina (5-TAMRA) sukcynimid ester.	29
Rysunek 10. Przykładowe struktury barwników z rodziny Alexa Fluor. ⁸⁵	30
Rysunek 11. Znormalizowane widma emisji barwników z rodziny Alexa Fluor. ⁸⁵	30
Rysunek 12. Struktura barwnika BODIPY.	31
Rysunek 13. Znormalizowane widma emisji wybranych barwników z rodziny BODIPY zmierzone w etanolu. ⁸⁵	31
Rysunek 14. Struktury fluorescencyjnych aromatycznych aminokwasów białkowych. ¹	32

Rysunek 15. Widma absorpcji oraz emisji tryptofanu (Trp), tyrozyny (Tyr) i fenyloalaniny (Phe) zmierzone w wodzie. ¹	33
Rysunek 16. Struktura pochodnej tryptofanu wyznakowanej znacznikiem BODIPY. ¹¹⁰	34
Rysunek 17. Schemat syntezy pochodnej tryptofanu ze znacznikiem BODIPY. ¹¹⁰	35
Rysunek 18. Struktura Trp(redBODIPY). ¹¹¹	35
Rysunek 19. Schemat reakcji pomiędzy N-Boc-pirrolem-2-borowym a 2-bromo-5-metylo-tiofenem. ¹¹¹	35
Rysunek 20. Schemat reakcji pomiędzy kwasem 3-jodobenzoesowym i 2,4-dimetylopirolem. ¹¹¹	36
Rysunek 21. Otrzymywanie pochodnej znacznika BODIPY oraz sprzęganie go z tryptofanem. ¹¹¹	36
Rysunek 22. Schemat syntezy HADA, NADA, FDL, TDL. ^{113,114}	37
Rysunek 23. Pochodne tyrozyny z pirenem i bisfenylem. ¹¹⁷	38
Rysunek 24. Styrylowe pochodne asymetryczne i symetryczne tyrozyny; gdzie: R to I lub H, Ar to podstawniki aromatyczne. ¹¹⁸	39
Rysunek 25. Schemat reakcji otrzymywania L-Anap; osłony grup aminowych: o-Ns-2-nitrobenzosulfonyl, Tr – osłona trytylowa. ¹²⁰	40
Rysunek 26. Struktury pochodnych boranowych; gdzie: Boc - osłona tertbutyloksykarbonylowa, All - ester propylowy. ¹²⁵	40
Rysunek 27. Pochodne tryptofanu. ¹²⁶	41
Rysunek 28. Znornalizowane widma absorpcji i widma emisji zmierzone w wodzie. ¹²⁶	41
Rysunek 29. Schemat mechanizmu reakcji Sonogashira-Hagihary. ¹⁴⁹	45
Rysunek 30. Schemat syntezy polimeru Pery-DHTP-BZ-COP z wykorzystaniem reakcji Sonogashiry-Hagihary. ¹⁶¹	46
Rysunek 31. Schemat reakcji otrzymywania 9,10-bis(6-etynylo-3-fenylo-3,4-dihydro-1,3-benzoksazyno)antracenu. ¹⁶²	48
Rysunek 32. Struktury czerwonych emiterów. ¹⁶³	49
Rysunek 33. Widma absorpcji i znornalizowane widma emisji wybranych czerwonych emiterów zmierzone w acetonitrylu. ¹⁶³	49
Rysunek 34. Struktury związków dietylnotriazolowych. ¹⁶⁴	50
Rysunek 35. Schemat reakcji pomiędzy EE a DIB. ¹⁶⁵	51
Rysunek 36. Warunki wprowadzania osłon na grupę aminową i karboksylową jodopochodnych tyrozyny.	61

Rysunek 37. Schemat syntezy 2-metylo-4-(naftalen-2-ylo)but-3-yn-2-olu.....	63
Rysunek 38. Schemat syntezy 4-(4-nitrofenylo)but-3-yn-2-olu.	63
Rysunek 39. Schemat syntezy 4-((4-(trimetylosililoetynylo)fenylo)etynylo)-N,N-dimetyloaniliny.	63
Rysunek 40. Schemat usuwania osłony z 2-metylo-4-(naftalen-2-ylo)but-3-yn-2-olu (A) oraz 4-(4-nitrofenylo)but-3-yn-2-olu (B).....	64
Rysunek 41. Schemat usuwania osłony trimetylosililowej z 4-((4-(trimetylosililoetynylo)fenylo)etynylo)-N,N-dimetyloaniliny (A) oraz 4-((trimetylosililo)etynylo)benzaldehydu (B).....	65
Rysunek 42. Schemat syntezy Tyr(acPh).....	67
Rysunek 43. Struktura Tyr(acPh) z numeracją atomów.....	67
Rysunek 44. Schemat syntezy Tyr(acPh-4-OMe).....	68
Rysunek 45. Struktura Tyr(acPh-4-OMe) z numeracją atomów.....	68
Rysunek 46. Schemat syntezy Tyr(acDMA).....	69
Rysunek 47. Struktura Tyr(acDMA) z numeracją atomów.....	69
Rysunek 48. Schemat syntezy Tyr(acPir).	70
Rysunek 49. Struktura Tyr(acPir) z numeracją atomów.	70
Rysunek 50. Schemat syntezy Tyr(acPh-4-CHO).....	71
Rysunek 51. Struktura Tyr(acPh-4-CHO) z numeracją atomów.....	71
Rysunek 52. Schemat syntezy Tyr(acPh-4-NO ₂).	72
Rysunek 53. Struktura Tyr(acPh-4-NO ₂) z numeracją atomów.	72
Rysunek 54. Schemat syntezy Tyr(acPh-O-Ph).	73
Rysunek 55. Struktura Tyr(acPh-O-Ph) z numeracją atomów.	73
Rysunek 56. Schemat syntezy Tyr(ac-2-Naft).	74
Rysunek 57. Struktura Tyr(ac-2-Naft) z numeracją atomów.	74
Rysunek 58. Schemat syntezy Tyr(ac-2-Naft-6-OMe).	75
Rysunek 59. Struktura Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) z numeracją atomów.	75
Rysunek 60. Schemat syntezy Tyr(acPhacDMA).....	76
Rysunek 61. Struktura Tyr(acPhacDMA) z numeracją atomów.....	76
Rysunek 62. Schemat syntezy Tyr(acPh) ₂	77
Rysunek 63. Struktura Tyr(acPh) ₂ z numeracją atomów.	77
Rysunek 64. Schemat syntezy Tyr(acPh-4-OMe) ₂	78
Rysunek 65. Struktura Tyr(acPh-4-OMe) ₂ z numeracją atomów.....	78
Rysunek 66. Schemat syntezy Tyr(acDMA) ₂	79

Rysunek 67. Struktura Tyr(acDMA) ₂ z numeracją atomów.	79
Rysunek 68. Schemat syntezy Tyr(acPir) ₂	80
Rysunek 69. Struktura Tyr(acPir) ₂ z numeracją atomów.	80
Rysunek 70. Schemat syntezy Tyr(acPh-4-CHO) ₂	81
Rysunek 71. Struktura Tyr(acPh-4-CHO) ₂ z numeracją atomów.	81
Rysunek 72. Schemat syntezy Tyr(acPh-4-NO ₂) ₂	82
Rysunek 73. Struktura Tyr(acPh-4-NO ₂) ₂ z numeracją atomów.	82
Rysunek 74. Schemat syntezy Tyr(acPh-O-Ph) ₂	83
Rysunek 75. Struktura Tyr(acPh-O-Ph) ₂ z numeracją atomów.	83
Rysunek 76. Schemat syntezy Tyr(ac-2-Naft) ₂	84
Rysunek 77. Struktura Tyr(ac-2-Naft) ₂ z numeracją atomów.	84
Rysunek 78. Schemat syntezy Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) ₂	85
Rysunek 79. Struktura Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) ₂ z numeracją atomów.	85
Rysunek 80. Znormalizowane widma absorpcji asymetrycznych acetylenowych pochodnych tyrozyny zmierzone w MeOH, MeCN, CX, PBS.	91
Rysunek 81. Zestawienie znormalizowanych widm absorpcji pochodnych asymetrycznych zmierzonych w MeCN.	91
Rysunek 82. Znormalizowane widma absorpcji symetrycznych acetylenowych pochodnych tyrozyny zmierzone w MeOH, MeCN, CX, PBS.	94
Rysunek 83. Zestawienie znormalizowanych widm absorpcji pochodnych symetrycznych zmierzonych w MeCN.	95
Rysunek 84. Znormalizowane widma absorpcji wybranej symetrycznej acetylenowej pochodnej tyrozyny zmierzone w PBS i DMSO.	95
Rysunek 85. Znormalizowane widma emisji asymetrycznych acetylenowych pochodnych tyrozyny zmierzone w MeOH, MeCN, CX, PBS.	99
Rysunek 86. Zestawienie znormalizowanych widm emisji pochodnych asymetrycznych zmierzonych w MeCN.	99
Rysunek 87. Widma emisji Tyr(acPh-4-NO ₂) zmierzone w MeOH, MeCN, CX, PBS.	99
Rysunek 88. Znormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(acPh) zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.	103
Rysunek 89. Znormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(acPh-4-OMe) zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.	103
Rysunek 90. Znormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(acDMA) zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.	104

Rysunek 91. Znnormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(acPh-4-CHO) zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.	104
Rysunek 92. Znnormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(acPh-O-Ph) zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.	105
Rysunek 93. Znnormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(acPh-4-NO ₂) zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.	105
Rysunek 94. Znnormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(ac-2-Naft) zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.	106
Rysunek 95. Znnormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.	106
Rysunek 96. Znnormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(acPhacDMA) zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.	107
Rysunek 97. Znnormalizowane widma emisji symetrycznych acetylenowych pochodnych tyrozyny zmierzone w MeOH, MeCN, CX, PBS.	113
Rysunek 98. Zestawienie znnormalizowanych widm emisji pochodnych symetrycznych zmierzonych w MeCN.	114
Rysunek 99. Znnormalizowane widma emisji wybranej symetrycznej acetylenowej pochodnej tyrozyny zmierzone w PBS i DMSO.	114
Rysunek 100. Widma emisji Tyr(acPh-4-NO ₂) ₂ zmierzone w MeOH, MeCN, CX, PBS.	114
Rysunek 101. Znnormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(acPh) ₂ zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.	119
Rysunek 102. Znnormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(acPh-4-OMe) ₂ zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.	119
Rysunek 103. Znnormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(acDMA) ₂ zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.	120
Rysunek 104. Znnormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(acPir) ₂ zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.	120
Rysunek 105. Znnormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(acPh-4-CHO) ₂ zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.	121
Rysunek 106. Znnormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(acPh-O-Ph) ₂ zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.	121

Rysunek 107. Znormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(ac-2-Naft) ₂ zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.	122
Rysunek 108. Znormalizowane widma absorpcji, emisji oraz wzbudzenia Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) ₂ zestawione kolejno dla rozpuszczalników MeCN, MeOH, CX, PBS.	122
Rysunek 109. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(acDMA) w roztworze wodnym (z dodatkiem 25 % DMSO) o pH = 7, 5 oraz 9.	127
Rysunek 110. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(acDMA) ₂ w roztworze wodnym (z dodatkiem 25 % DMSO) o pH = 7, 5 oraz 9.	128
Rysunek 111. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(acPir) ₂ w roztworze wodnym (z dodatkiem 25 % DMSO) o pH = 7, 5 oraz 9. Widoczny uskok sygnału na widmie absorpcji wynika z błędu korekcji filtrów wewnętrznych aparatu pomiarowego.	128
Rysunek 112. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) w roztworze wodnym (z dodatkiem 25 % DMSO) o pH = 7, 5 oraz 9.	128
Rysunek 113. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) ₂ w roztworze wodnym (z dodatkiem 25 % DMSO) o pH = 7, 5 oraz 9.	129
Rysunek 114. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) ₂ w roztworze wodnym (z dodatkiem 25 % DMSO) o pH = 7, 2 oraz 12.	129
Rysunek 115. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(acPh-4-OMe) w roztworze buforowanym (PBS) z dodatkiem DMSO, w obecności utleniacza, zarejestrowane po określonym czasie.	131
Rysunek 116. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(acPh-4-OMe) ₂ w roztworze buforowanym (PBS) z dodatkiem DMSO, w obecności utleniacza, zarejestrowane po określonym czasie.	131
Rysunek 117. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) w roztworze buforowanym (PBS) z dodatkiem DMSO, w obecności utleniacza, zarejestrowane po określonym czasie.	132
Rysunek 118. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) ₂ w roztworze buforowanym (PBS) z dodatkiem DMSO, w obecności utleniacza, zarejestrowane po określonym czasie.	132
Rysunek 119. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(acPh-4-OMe) w roztworze buforowanym (PBS) z dodatkiem DMSO, w obecności reduktora, zarejestrowane po określonym czasie.	133

Rysunek 120. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(acPh-4-OMe) ₂ w roztworze buforowanym (PBS) z dodatkiem DMSO, w obecności reduktora, zarejestrowane po określonym czasie.....	134
Rysunek 121. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) w roztworze buforowanym (PBS) z dodatkiem DMSO, w obecności reduktora, zarejestrowane po określonym czasie.....	134
Rysunek 122. Od lewej widmo absorpcji oraz emisji pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) ₂ w roztworze buforowanym (PBS) z dodatkiem DMSO, w obecności reduktora, zarejestrowane po określonym czasie.....	134
Rysunek 123. Widma emisji pochodnej Tyr(acPh) zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.	137
Rysunek 124. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{emmax}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acPh).	137
Rysunek 125. Chromatogramy z RP-HPLC (układ A, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acPh); A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.	137
Rysunek 126. Widma emisji pochodnej Tyr(acPh-4-OMe) zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.	138
Rysunek 127. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{emmax}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acPh-4-OMe).	138
Rysunek 128. Chromatogramy z RP-HPLC (układ A, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acPh-4-OMe); A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.	138
Rysunek 129. Widma emisji pochodnej Tyr(acDMA) zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.	139
Rysunek 130. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{emmax}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acDMA).	139
Rysunek 131. Chromatogramy z RP-HPLC (układ C, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acDMA); A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.	139

Rysunek 132. Widma emisji pochodnej Tyr(acPh-4-CHO) zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.	140
Rysunek 133. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{emmax}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acPh-4-CHO).	140
Rysunek 134. Chromatogramy z RP-HPLC (układ A, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acPh-4-CHO); A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.	140
Rysunek 135. Widma emisji pochodnej Tyr(acPh-O-Ph) zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.	141
Rysunek 136. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{emmax}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acPh-O-Ph).	141
Rysunek 137. Chromatogramy z RP-HPLC (układ A, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acPh-O-Ph); A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.	141
Rysunek 138. Widma emisji pochodnej Tyr(acPh-4-NO ₂) zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.	142
Rysunek 139. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{emmax}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acPh-4-NO ₂).	142
Rysunek 140. Chromatogramy z RP-HPLC (układ A, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acPh-4-NO ₂); A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.	142
Rysunek 141. Widma emisji pochodnej Tyr(ac-2-Naft) zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.	143
Rysunek 142. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{emmax}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(ac-2-Naft).	143
Rysunek 143. Chromatogramy z RP-HPLC (układ A, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(ac-2-Naft); A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.	143
Rysunek 144. Widma emisji pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.	144

Rysunek 145. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{emmax}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe).....	144
Rysunek 146. Chromatogramy z RP-HPLC (układ B, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe); A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.	144
Rysunek 147. Widma emisji pochodnej Tyr(acPh) ₂ zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.	145
Rysunek 148. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{emmax}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acPh) ₂	145
Rysunek 149. Chromatogramy z RP-HPLC (układ A, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acPh) ₂ ; A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.	145
Rysunek 150. Widma emisji pochodnej Tyr(acPh-4-OMe) ₂ zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.....	146
Rysunek 151. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{emmax}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acPh-4-OMe) ₂	146
Rysunek 152. Chromatogramy z RP-HPLC (układ B, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acPh-4-OMe) ₂ ; A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.	146
Rysunek 153. Widma emisji pochodnej Tyr(acDMA) ₂ zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.	147
Rysunek 154. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{emmax}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acDMA) ₂	147
Rysunek 155. Chromatogramy z RP-HPLC (układ D, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acDMA) ₂ ; A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.	147
Rysunek 156. Widma emisji pochodnej Tyr(acPh-4-CHO) ₂ zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.....	148

Rysunek 157. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{emmax}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acPh-4-CHO) ₂	148
Rysunek 158. Chromatogramy z RP-HPLC (układ A, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acPh-4-CHO) ₂ ; A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.	148
Rysunek 159. Widma emisji pochodnej Tyr(acPh-O-Ph) ₂ zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.	149
Rysunek 160. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{emmax}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acPh-O-Ph) ₂	149
Rysunek 161. Chromatogramy z RP-HPLC (układ B, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acPh-O-Ph) ₂ ; A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h. ...	149
Rysunek 162. Widma emisji pochodnej Tyr(acPh-4-NO ₂) ₂ zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.	150
Rysunek 163. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{emmax}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acPh-4-NO ₂) ₂	150
Rysunek 164. Chromatogramy z RP-HPLC (układ A, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acPh-4-NO) ₂ ; A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.	150
Rysunek 165. Widma emisji pochodnej Tyr(acPir) ₂ zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.	151
Rysunek 166. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{emmax}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(acPir) ₂	151
Rysunek 167. Chromatogramy z RP-HPLC (układ D, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(acPir) ₂ ; A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.	151
Rysunek 168. Widma emisji pochodnej Tyr(ac-2-Naft) ₂ zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.	152

Rysunek 169. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{emmax}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(ac-2-Naft) ₂	152
Rysunek 170. Chromatogramy z RP-HPLC (układ B, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(ac-2-Naft) ₂ ; A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.	152
Rysunek 171. Widma emisji pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) ₂ zarejestrowane po określonym czasie naświetlania; A - próbka kontrolna, B - próbka badawcza.....	153
Rysunek 172. Od lewej wykresy zależności intensywności fluorescencji (wartości odczytane przy λ_{emmax}) oraz zintegrowanej intensywności fluorescencji od czasu trwania eksperymentu dla próbki i kontroli pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) ₂	153
Rysunek 173. Chromatogramy z RP-HPLC (układ B, detekcja UV przy 254 nm) uzyskane podczas badania fotostabilności pochodnej Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) ₂ ; A - próbka w czasie 0 h, B - próbka po 1 h naświetlania, C - kontrola przechowywana w ciemności przez 1 h.	153
Rysunek 174. Wyniki testu MTT obrazujące zależność żywotności komórek z linii HaCaT od stężenia badanych asymetrycznych pochodnych tyrozyny względem kontroli negatywnej (0 μ M, komórki poddane działaniu czystego nośnika DMSO przyjęto za 100 %) po 24h traktowania. Przetawiono wartość SEM co najmniej 3 niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna różnic określono za pomocą testu one-way ANOVA oraz testu wielokrotnych porównań Dunnetta (****p<0,0001); gdzie: * - różnica istotna statystycznie pomiędzy HaCaT traktowanymi wybranymi pochodnymi a kontrolą.	158
Rysunek 175. Wyniki testu MTT obrazujące zależność żywotności komórek z linii MCF-7 od stężenia badanych asymetrycznych pochodnych tyrozyny względem kontroli negatywnej (0 μ M, komórki poddane działaniu czystego nośnika DMSO przyjęto za 100 %) po 24h traktowania. Przetawiono wartość SEM co najmniej 3 niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna różnic określono za pomocą testu one-way ANOVA oraz testu wielokrotnych porównań Dunnetta (****p<0,0001); gdzie: * - różnica istotna statystycznie pomiędzy MCF-7 traktowanymi wybranymi pochodnymi a kontrolą.	159
Rysunek 176. Wyniki testu MTT obrazujące zależność żywotności komórek z linii PC-3 od stężenia badanych asymetrycznych pochodnych tyrozyny względem kontroli negatywnej (0 μ M, komórki poddane działaniu czystego nośnika DMSO przyjęto za	

100 %) po 24h traktowania. Przetawiono wartość SEM co najmniej 3 niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna różnic określono za pomocą testu one-way ANOVA oraz testu wielokrotnych porównań Dunnetta (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$); gdzie: * - różnica istotna statystycznie pomiędzy PC3 traktowanymi wybranymi pochodnymi a kontrolą.	160
Rysunek 177. Wyniki testu MTT obrazujące zależność żywotności komórek z linii HaCaT od stężenia badanych symetrycznych pochodnych tyrozyny względem kontroli negatywnej (0 μM , komórki poddane działaniu czystego nośnika DMSO przyjęto za 100 %) po 24h traktowania. Przetawiono wartość SEM co najmniej 3 niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna różnic określono za pomocą testu one-way ANOVA oraz testu wielokrotnych porównań Dunnetta (**** $p < 0,0001$); gdzie: * - różnica istotna statystycznie pomiędzy HaCaT traktowanymi wybranymi pochodnymi a kontrolą.	161
Rysunek 178. Wyniki testu MTT obrazujące zależność żywotności komórek z linii MCF-7 od stężenia badanych symetrycznych pochodnych tyrozyny względem kontroli negatywnej (0 μM , komórki poddane działaniu czystego nośnika DMSO przyjęto za 100 %) po 24h traktowania. Przetawiono wartość SEM co najmniej 3 niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna różnic określono za pomocą testu one-way ANOVA oraz testu wielokrotnych porównań Dunnetta (*** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$); gdzie: * - różnica istotna statystycznie pomiędzy MCF-7 traktowanymi wybranymi pochodnymi a kontrolą.	162
Rysunek 179. Wyniki testu MTT obrazujące zależność żywotności komórek z linii PC-3 od stężenia badanych symetrycznych pochodnych tyrozyny względem kontroli negatywnej (0 μM , komórki poddane działaniu czystego nośnika DMSO przyjęto za 100 %) po 24h traktowania. Przetawiono wartość SEM co najmniej 3 niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna różnic określono za pomocą testu one-way ANOVA oraz testu wielokrotnych porównań Dunnetta (**** $p < 0,0001$); gdzie: * - różnica istotna statystycznie pomiędzy PC3 traktowanymi wybranymi pochodnymi a kontrolą.	163
Rysunek 180. Widma emisji zarejestrowane dla Tyr(acDMA) ₂ o stężeniu 10 μM w roztworze PBS, DMSO oraz w PBS z dodatkiem LUV.....	166
Rysunek 181. Widma emisji zarejestrowane dla Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) o stężeniu 10 μM w roztworze PBS, DMSO oraz w PBS z dodatkiem LUV.....	166

Rysunek 182. Widma emisji zarejestrowane dla Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) ₂ o stężeniu 10 μM w roztworze PBS, DMSO oraz w PBS z dodatkiem LUV.....	167
Rysunek 183. Zdjęcia zarejestrowane za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego. A - GUV po dodaniu Tyr(acDMA) ₂ uzyskując finalne stężenie związku wynoszące 10 μM, B - GUV po dodaniu Tyr(acDMA) ₂ uzyskując finalne stężenie związku wynoszące 100 μM, C - zdjęcia GUV w świetle przechodzącym przed dodaniem związku. Rozmiar zdjęć: 105 x 105 μm.....	168
Rysunek 184. Zdjęcia zarejestrowane za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego. A - GUV po dodaniu Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) uzyskując finalne stężenie związku wynoszące 10 μM, B - GUV po dodaniu Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) uzyskując finalne stężenie związku wynoszące 100 μM. Rozmiar zdjęć: 210 x 210 μm.	168
Rysunek 185. A - Obraz zarejestrowany dla próbki zawierającej komórki MCF-7 po 24h inkubacji ze związkiem Tyr(acDMA) o stężeniu 10 μM, B - zdjęcie zarejestrowane po 24 h inkubacji ze związkiem Tyr(acDMA) o stężeniu 10 μM oraz po 15 min inkubacji z Hoestem. Rozmiar zdjęć: 80 x 80 μm.....	170
Rysunek 186. A - Zdjęcie komórek MCF-7 po 24 h inkubacji ze związkiem Tyr(acDMA) ₂ o stężeniu 10 μM, B - zdjęcie zarejestrowane po 24 h inkubacji ze związkiem Tyr(acDMA) ₂ o stężeniu 10 μM oraz po 15 min inkubacji z barwnikiem Hoest. Rozmiar zdjęć: 80 x 80 μm.....	170
Rysunek 187. A - Obraz zarejestrowany dla próbki zawierającej komórki MCF-7 po 24 h inkubacji ze związkiem Tyr(acPh-4-NO ₂) o stężeniu 10 μM, B - zdjęcie zarejestrowane po 24 h inkubacji ze związkiem Tyr(acPh-4-NO ₂) o stężeniu 10 μM oraz po 15 min inkubacji z barwnikiem Hoest. Rozmiar zdjęć: 80 x 80 μm.....	170
Rysunek 188. A - Zdjęcie komórek MCF-7 po 24 h inkubacji ze związkiem Tyr(acPh-4-NO ₂) ₂ o stężeniu 10 μM, B - zdjęcie zarejestrowane po 24 h inkubacji ze związkiem Tyr(acPh-4-NO ₂) ₂ o stężeniu 10 μM oraz po 15 min inkubacji z barwnikiem Hoest. Rozmiar zdjęć: 80 x 80 μm.....	171
Rysunek 189. A - Zdjęcie komórek MCF-7 po 24 h inkubacji ze związkiem Tyr(acPir) ₂ o stężeniu 10 μM, B - zdjęcie zarejestrowane po 24 h inkubacji ze związkiem Tyr(acPir) ₂ o stężeniu 10 μM oraz po 15 min inkubacji z barwnikiem Hoest. Rozmiar zdjęć: 80 x 80 μm.	171
Rysunek 190. A - Obraz zarejestrowany dla próbki zawierającej komórki MCF-7 po 24 h inkubacji ze związkiem Tyr(ac-2-Naft-6-OMe) ₂ o stężeniu 10 μM, B - zdjęcie	

zarejestrowane po 24 h inkubacji ze związkiem Tyr(ac-2-Naft-6-OMe)₂ o stężeniu 10 μM
oraz po 15 min inkubacji z barwnikiem Hoest. Rozmiar zdjęć: 80 x 80 μm..... 171

VII. Wykaz tabel

Tabela 1. Zestawienie właściwości spektroskopowych fenyloalaniny, tyrozyny i tryptofanu. ¹	33
Tabela 2. Właściwości spektralne i fotofizyczne asymetrycznych acetylenowych pochodnych tyrozyny.....	100
Tabela 3. Czasy zaniku fluorescencji asymetrycznych acetylenowych pochodnych tyrozyny.	107
Tabela 4. Właściwości spektralne i fotofizyczne symetrycznych acetylenowych pochodnych tyrozyny.....	117
Tabela 5. Czasy zaniku fluorescencji symetrycznych acetylenowych pochodnych tyrozyny.	123
Tabela 6. Zestawienie właściwości spektroskopowych dla BocTyrOMe w warunkach analogicznych dla badanych acetylenowych pochodnych tyrozyny.....	174
Tabela 7. Zestawienie jasności świecenia wybranych acetylenowych pochodnych tyrozyny oraz znaczników komercyjnych. ^{1,177–179}	175

VIII. Literatura

1. Lakowicz J. R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer, Baltimore, 2006.
2. Paszyc S., Podstawy Fotochemii, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1983.
3. Levine S. Z. et al., Fluorescence from the second excited singlet state of thiophosgene vapour, *Chem. Phys. Lett.*, **29**, 73-76 (1974).
4. Baba H. et al., Fluorescence from the second excited singlet state and radiationless processes in pyrene vapor, *J. Chem. Phys.*, **55**, 2433-2438 (1971).
5. Chattopadhyay N. et al., Fluorescence from the second excited singlet state of 3-hydroxyflavone in supercritical CO₂, *Chem. Phys. Lett.*, **387**, 258-262 (2004).
6. Gibson J. et al., The Importance of Vibronic Coupling for Efficient Reverse Intersystem Crossing in Thermally Activated Delayed Fluorescence Molecules, *ChemPhysChem*, **19**, 2956-2961 (2016).
7. Shakeel U. et al., Study of processes of reverse intersystem crossing (RISC) and thermally activated delayed fluorescence (TADF) in organic light emitting diodes (OLEDs), *Org. Electron.*, **59**, 121-124 (2018).
8. Kasha M., Characterization of electronic transitions in complex molecules, *Discuss. Faraday Soc.*, **9**, 14-19 (1950).
9. Williams R. M. et al., On the applicability of the Kasha-Vavilov rule to C₆₀, *Spectrochim. Acta A*, **50**, 251-254 (1994).
10. Rätsep M. et al., Mirror symmetry and vibrational structure in optical spectra of chlorophyll a, *J. Chem. Phys.*, **130** (2009).
11. Tatischeff I. et al., Influence of the Environment on the Excitation Wavelength Dependence of the Fluorescence Quantum Yield of Indole, *Photochem. Photobiol.*, **22**, 221-229 (1975).
12. Galbán J. et al., The environmental effect on the fluorescence intensity in solution. An analytical model, *Analyst*, **134**, 2286-2292 (2009).
13. Rassamesard A. et al., Environmental effect on the fluorescence lifetime and quantum yield of single extended luminescent conjugated polymers, *J. Phys. Chem. C*, **113**, 18681-18688 (2009).
14. Schlegel G. et al., Fluorescence Decay Time of Single Semiconductor Nanocrystals, *Phys. Rev. Lett.*, **88** (2002).

15. Xu H. et al., Mechanisms of fluorescence decays of colloidal CdSe-CdS/ZnS quantum dots unraveled by time-resolved fluorescence measurement, *Phys. Chem. Phys.*, **17**, 27588-27595 (2015).
16. Gautier I. et al., Homo-FRET microscopy in living cells to measure monomer-dimer transition of GFP-tagged proteins, *Biophys. J.*, **80**, 3000-3008 (2001).
17. Rovnyagina N. R. et al., Fluorescence lifetime and intensity of thioflavin T as reporters of different fibrillation stages: Insights obtained from fluorescence up-conversion and particle size distribution measurements, *Int. J. Mol. Sci.*, **21** (2020).
18. Levitt J. A. et al., Quantitative real-time imaging of intracellular FRET biosensor dynamics using rapid multi-beam confocal FLIM, *Sci. Rep.*, **10** (2020).
19. Muir R. et al., Collagen Glycation Detected by Its Intrinsic Fluorescence, *J. Phys. Chem. B*, **125**, 11058-11066 (2021).
20. Loman A. et al., Measuring rotational diffusion of macromolecules by fluorescence correlation spectroscopy, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **9**, 627-636 (2010).
21. Margineanu A. et al., Screening for protein-protein interactions using Förster resonance energy transfer (FRET) and fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM), *Sci. Rep.*, **6** (2016).
22. Ragam A., Confocal Microscopy. Principles of Ocular Imaging, CRC Press, Floryda, 2021.
23. Elliott A. D., Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices., *Curr. Protoc. Cytom.*, **92**, (2020).
24. Chen Y. et al., Protein localization in living cells and tissues using FRET and FLIM, *Differentiation*, **71**, 528-541 (2003).
25. Spatola Rossi T. et al., FRET-FLIM to Determine Protein Interactions and Membrane Topology of Enzyme Complexes, *Curr. Protoc.*, **2** (2022).
26. Wallrabe H. et al., Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **16**, 19-27 (2005).
27. Petutschnig E. K. et al., A novel fluorescent protein pair facilitates FLIM-FRET analysis of plant immune receptor interaction under native conditions, *J. Exp. Bot.*, **75**, 746-759 (2024).
28. Zheng K. et al., Monitoring intracellular nanomolar calcium using fluorescence lifetime imaging, *Nat. Protoc.*, **13**, 581-597 (2018).

29. Bleeker J. et al., Quinolinium-Based Fluorescent Probes for Dynamic pH Monitoring in Aqueous Media at High pH Using Fluorescence Lifetime Imaging, *ACS Sens.*, **8**, 2050-2059 (2023).
30. Vyšniauskas A. et al., Cyclopropyl Substituents Transform the Viscosity-Sensitive BODIPY Molecular Rotor into a Temperature Sensor, *ACS Sens.*, **6**, 2158-2167 (2021).
31. Yamazaki T. et al., Applicability and Limitations of Fluorescence Intensity-Based Thermometry Using a Palette of Organelle Thermometers, *Chemosensors*, **11** (2023).
32. Ouyang Y. et al., FLIM as a Promising Tool for Cancer Diagnosis and Treatment Monitoring, *Nano-Micro Lett.*, **13** (2021).
33. Luo T. et al., Discrimination of wet or dried arterial and venous blood for forensic applications via eosin fluorescence lifetime, *Sens. Actuators B Chem.*, **304** (2020).
34. Gal M. et al., New fluorescent electrospun polymer materials containing phenothiazinyl carboxylate metal salts for versatile latent fingerprint detection, *Dyes Pigm.*, **211** (2023).
35. Nevin A. et al., Time-resolved photoluminescence spectroscopy and imaging: New approaches to the analysis of cultural heritage and its degradation, *Sensors*, **14**, 6338-6355 (2014).
36. Becker W. et al., FLIM and FCS detection in laser-scanning microscopes: Increased efficiency by GaAsP hybrid detectors, *Microsc. Res. Tech.*, **74**, 804-811 (2011).
37. Schmidt U. et al., Multimodal Low-Dimensional Materials Characterization with Correlative Microscopy: Raman-PL-FLIM-AFM-SNOM-SEM, *Microsc. Microanal.*, **22**, 224-225 (2016).
38. Micic M. et al., Correlated atomic force microscopy and fluorescence lifetime imaging of live bacterial cells, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **34**, 205-212 (2004).
39. De Los Santos C. et al., FRAP, FLIM, and FRET: Detection and analysis of cellular dynamics on a molecular scale using fluorescence microscopy, *Mol. Reprod. Dev.*, **82**, 587-604 (2015).
40. Liras M. et al., Nitroxide amide-BODIPY probe behavior in fibroblasts analyzed by advanced fluorescence microscopy, *Org. Biomol. Chem.*, **14**, 4023-4026 (2016).
41. Hoffmann C. et al., Live cell imaging reveals actin-cytoskeleton-induced self-association of the actin-bundling protein WLIM1, *J. Cell Sci.*, **127**, 583-598 (2014).
42. Zhao M. et al., Green emitted CdSe@ZnS quantum dots for FLIM and STED imaging applications, *J. Innov. Opt. Health Sci.*, **12** (2019).

43. Mazumder N. et al., Label-Free Non-linear Multimodal Optical Microscopy—Basics, Development, and Applications, *Front. Phys.*, **7** (2019).
44. Lee J. et al., Label-Free Multiphoton Imaging of Microbes in Root, Mineral, and Soil Matrices with Time-Gated Coherent Raman and Fluorescence Lifetime Imaging, *Environ. Sci. Technol.*, **56**, 1994-2008 (2022).
45. König K., Review: Clinical in vivo multiphoton FLIM tomography, *Methods Appl. Fluoresc.*, **8** (2020).
46. Becker W., Fluorescence lifetime imaging - techniques and applications, *J. Microsc.*, **247**, 119-136 (2012).
47. Hirvonen L. M. et al., Lightsheet fluorescence lifetime imaging microscopy with wide-field time-correlated single photon counting, *J. Biophotonics*, **13** (2020).
48. Hirvonen L. M. et al., Fast Timing Techniques in FLIM Applications, *Front. Phys.*, **8** (2020).
49. Suhling K. et al., Fluorescence lifetime imaging (FLIM): Basic concepts and some recent developments, *Med. Photonics*, **27**, 3-40 (2015).
50. Cui H. et al., Color-changing fluorescent DNA probe containing solvatochromic Dansyl-nucleoside surrogate for sensing local variation of DNA duplex, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **59** (2022).
51. Pazin W. M. et al., Thermal and solvatochromic effects on the emission properties of a thienyl-based dansyl derivative, *RSC Adv.*, **10**, 28484-28491 (2020).
52. Mocanu S. et al., Solvatochromic characteristics of dansyl molecular probes bearing alkyl diamine chains, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **237** (2020).
53. Fürstenberg A., Water in biomolecular fluorescence spectroscopy and imaging: Side effects and remedies, *Chimia*, **71**, 26-31 (2017).
54. Stryer L., Excited-State Proton-Transfer Reactions. A Deuterium Isotope Effect on Fluorescence, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 5708-5712 (1966).
55. Bisballe N. et al., What is Best Strategy for Water Soluble Fluorescence Dyes?-A Case Study Using Long Fluorescence Lifetime DAOTA Dyes, *Chem. Eur. J.*, **26**, 15969-15376 (2020).
56. Magde D. et al., Solvent dependence of the fluorescence lifetimes of xanthene dyes, *Photochem. Photobiol.*, **70**, 737-744 (1999).
57. Kajiwara K. et al., A negative-solvatochromic fluorescent probe for visualizing intracellular distributions of fatty acid metabolites, *Nat. Commun.*, **13** (2022).

58. Bylińska I. et al., Influence of Solvent Properties on Two Individuals Presented in the Excited State - Reverse Fluorosolvatochromism of CNAacDMA, *ChemPhysChem*, **23** (2022).
59. Kowski A., On the estimation of excited-state dipole moments from solvatochromic shifts of absorption and fluorescence spectra, *Z. Naturforsch. A*, **57**, 255-262 (2002).
60. Paczkowski-Maliszewski I. et al., Solvatochromism and the Empirical Scales of Solvent Polarity: A Review, *Quim. Nova*, **46**, 998-1004 (2023).
61. Bunel E. et al., Solvatochromism and Solvent Polarity Scales, *Acc. Chem. Res.*, **23**, 226-231 (1990).
62. Cheong W. et al., Kamlet-Taft π Polarizability/Dipolarity of Mixtures of Water with Various Organic Solvents, *Anal. Chem.*, **60**, 820-826 (1988).
63. Catalán J. et al., Use of the SPP scale for the analysis of molecular systems with dual emissions resulting from the solvent polarity, *J. Fluoresc.*, **6**, 15-22 (1996).
64. Lakowicz J. R. et al., Direct recording of the initially excited and the solvent relaxed fluorescence emission spectra of tryptophan by phase sensitive detection of fluorescence, *Photochem. Photobiol.*, **36**, 125-132 (1982).
65. Wang M. et al., Temperature-Dependent Dual Fluorescence from Small Organic Molecules, *Org. Mater.*, **4**, 204-215 (2022).
66. Haidekker M. A. et al., Fluid shear stress increases membrane fluidity in endothelial cells: A study with DCYJ fluorescence, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **278** (2000).
67. Tomin V. I. et al., Dynamic quenching as a simple test for the mechanism of excited-state reaction, *Chem. Phys.*, **342**, 126-134 (2007).
68. Tanwar A. S. et al., Dual “Static and Dynamic” Fluorescence Quenching Mechanisms Based Detection of TNT via a Cationic Conjugated Polymer, *ACS Meas. Sci. Au*, **2**, 23-30 (2022).
69. Paterson K. A. et al., Dynamic and static quenching of 2-aminopurine fluorescence by the natural DNA nucleotides in solution, *Methods Appl. Fluoresc.*, **8** (2020).
70. Yammine A. et al., Tryptophan Fluorescence Quenching Assays for Measuring Protein-ligand Binding Affinities: Principles and a Practical Guide, *Bio Protoc.*, **9** (2019).
71. Kim I. J. et al., Metal-Induced Fluorescence Quenching of Photoconvertible Fluorescent Protein DendFP, *Molecules*, **27** (2022).
72. Eftink M. R. et al., Fluorescence quenching studies with proteins, *Anal. Biochem.*, **114**, 199-227 (1981).

73. Möller M. et al., Protein tryptophan accessibility studied by fluorescence quenching, *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, **30**, 175-178 (2002).
74. Tansi F. L. et al., Targeting the Tumor Microenvironment with Fluorescence-Activatable Bispecific Endoglin/Fibroblast Activation Protein Targeting Liposomes, *Pharmaceutics*, **12** (2020).
75. Askes S. H. C. et al., Water-Dispersible Silica-Coated Upconverting Liposomes: Can a Thin Silica Layer Protect TTA-UC against Oxygen Quenching?, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **3**, 322-334 (2017).
76. Tutkus M. et al., Aggregation-related quenching of LHCII fluorescence in liposomes revealed by single-molecule spectroscopy, *J. Photochem. Photobiol. B*, **218** (2021).
77. Chen R. F. et al., Mechanism of fluorescence concentration quenching of carboxyfluorescein in liposomes: Energy transfer to nonfluorescent dimers, *Anal. Biochem.*, **172**, 61-77 (1988).
78. Fischkoff S. et al., Oxygen diffusion in biological and artificial membranes determined by the fluorochrome pyrene, *J. Gen. Physiol.*, **65**, 663-676 (1975).
79. Clegg R. M., Fluorescence resonance energy transfer, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **6**, 103-110 (1995).
80. Evans D. F., Perturbation of singlets-triplet transitions of aromatic molecules by oxygen under pressure, *J. Chem. Soc.*, 1351-1357 (1957).
81. Lessard G. et al., Singlet and triplet quenching of indole by heavy atom containing molecules in a low temperature glassy matrix. Evidence for complexation in the triplet state, *J. Phys. Chem.*, **82** (1978).
82. Berlman I. B., Empirical study of heavy-atom collisional quenching of the fluorescence state of aromatic compounds in solution, *J. Phys. Chem.*, **77**, 562-567 (1973).
83. Song L. et al., Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy, *Biophys. J.*, **68**, 2588-2600 (1995).
84. Margulies D. et al., Fluorescein as a model molecular calculator with reset capability, *Nat. Mater.*, **4**, 768-771 (2005).
85. Wiederschain G. Ya., The Molecular Probes handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies, Biochemistry, Moscow, **76** (2011).
86. Rusinova E. et al., Alexa and Oregon Green dyes as fluorescence anisotropy probes for measuring protein-protein and protein-nucleic acid interactions, *Anal. Biochem.*, **308**, 18-25 (2002).

87. Sun W. C. et al., Synthesis of fluorinated fluoresceins, *J. Org. Chem.*, **62**, 6469-6475 (1997).
88. Pelet S. et al., Comparing the quantification of Förster resonance energy transfer measurement accuracies based on intensity, spectral, and lifetime imaging, *J. Biomed. Opt.*, **11** (2006).
89. Kunzelmann S. et al., A fluorescent, reagentless biosensor for ADP based on tetramethylrhodamine-labeled ParM, *ACS Chem. Biol.*, **5**, 415-425 (2010).
90. Duchardt-Ferner E. et al., Structure of an RNA aptamer in complex with the fluorophore tetramethylrhodamine, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 949-961 (2020).
91. Bolden C. T. et al., A decade of blood-brain barrier permeability assays: Revisiting old traumatic brain injury rat data for new insights and experimental design, *Microvasc. Res.*, **145** (2023).
92. Liao-Chan S. et al., Quantitative assessment of antibody internalization with novel monoclonal antibodies against Alexa fluorophores, *PLoS One*, **10** (2015).
93. Lindhoud S. et al., Fluorescence of Alexa Fluor Dye Tracks Protein Folding, *PLoS One*, **7** (2012).
94. Mahmoudian J. et al., Comparison of the photobleaching and photostability traits of Alexa fluor 568- and fluorescein isothiocyanate-conjugated antibody, *Cell J.*, **13**, 169-172 (2011).
95. Berlier J. E. et al., Quantitative Comparison of Long-wavelength Alexa Fluor Dyes to Cy Dyes: Fluorescence of the Dyes and Their Bioconjugates, *J. Histochem. Cytochem.*, **51**, 1699-1712 (2003).
96. Gebhardt C. et al., Molecular and Spectroscopic Characterization of Green and Red Cyanine Fluorophores from the Alexa Fluor and AF Series, *ChemPhysChem*, **22**, 1566-1583 (2021).
97. Cheng H. B. et al., BODIPY as a Multifunctional Theranostic Reagent in Biomedicine: Self-Assembly, Properties, and Applications, *Adv. Mater.*, **35** (2023).
98. Zhang W. et al., Application of multifunctional BODIPY in photodynamic therapy, *Dyes Pigm.*, **185** (2021).
99. Das S. et al., BODIPY-Based Molecules for Biomedical Applications, *Biomolecules*, **13** (2023).
100. Mao Z. et al., Engineering of BODIPY-based theranostics for cancer therapy, *Coord. Chem. Rev.*, **476** (2023).

101. Antina E. et al., BODIPY Conjugates as Functional Compounds for Medical Diagnostics and Treatment, *Molecules*, **27** (2022).
102. Cheng Z. et al., Fluorescent amino acids as versatile building blocks for chemical biology, *Nat. Rev. Chem.*, **4** (2020).
103. Jun J. V. et al., Rational design of small molecule fluorescent probes for biological applications, *Org. Biomol. Chem.*, **18** (2020).
104. Lavis L. D. et al., Bright ideas for chemical biology, *ACS Chem. Biol.*, **3** (2008).
105. Speight L. C. et al., Minimalist approaches to protein labelling: Getting the most fluorescent bang for your steric buck, *Aust. J. Chem.*, **67** (2014).
106. Loving G. S. et al., Monitoring protein interactions and dynamics with solvatochromic fluorophores, *Trends Biotechnol.*, **28** (2010).
107. Park S. H. et al., Fluorescence polarization assay to quantify protein-protein interactions, *Methods Mol. Biol.*, **261** (2004).
108. Raines R. T., Fluorescence polarization assay to quantify protein-protein interactions: An update, in Protein-Protein Interactions: Methods and Applications, *Methods Mol. Biol.*, **1278**, 323-327 (2015).
109. Schuler B. et al., Single-molecule spectroscopy of protein folding dynamics-expanding scope and timescales, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **23** (2013).
110. Mendive-Tapia L. et al., Preparation of a Trp-BODIPY fluorogenic amino acid to label peptides for enhanced live-cell fluorescence imaging, *Nat. Protoc.*, **12**, 1588-1619 (2017).
111. Subiros-Funosas R. et al., Fluorogenic Trp(redBODIPY) cyclopeptide targeting keratin 1 for imaging of aggressive carcinomas, *Chem. Sci.*, **11**, 1368-1374 (2020).
112. Wang W. et al., BODIPY Peptide Labeling by Late-Stage C(sp³)-H Activation, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **57**, 10554-10558 (2018).
113. Kuru E. et al., Synthesis of fluorescent D-amino acids and their use for probing peptidoglycan synthesis and bacterial growth in situ, *Nat. Protoc.*, **10**, 33-52 (2015).
114. Kuru E. et al., In situ probing of newly synthesized peptidoglycan in live bacteria with fluorescent D-amino acids, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 12519-12523 (2012).
115. Navo C. D. et al., Cell-Penetrating Peptides Containing Fluorescent d-Cysteines, *Chem. Eur. J.*, **24**, 7991-8000 (2018).
116. Yokoo H. et al., A Polarity-Sensitive Fluorescent Amino Acid and its Incorporation into Peptides for the Ratiometric Detection of Biomolecular Interactions, *ChemPlusChem*, **84**, 1716-1719 (2019).

117. Pereira G. et al., Synthesis of new β -amidodehydroaminobutyric acid derivatives and of new tyrosine derivatives using copper catalyzed C-N and C-O coupling reactions, *Amino Acids*, **44**, 335-344 (2013).
118. Cheruku P. et al., Tyrosine-derived stimuli responsive, fluorescent amino acids, *Chem. Sci.*, **6**, 1150-1158 (2015).
119. Gomez J. A. et al., Cell-penetrating penta-peptides (CPP5s): Measurement of cell entry and protein-transduction activity, *Pharmaceuticals*, **3**, 3594-3613 (2010).
120. Xiang Z. et al., Enantiospecific synthesis of genetically encodable fluorescent unnatural amino acid 1-3-(6-acetylnaphthalen-2-ylamino)-2-aminopropanoic acid, *J. Org. Chem.*, **76**, 6367-6371 (2011).
121. Zagotta W. N. et al., Measuring distances between TRPV1 and the plasma membrane using a noncanonical amino acid and transition metal ion FRET, *J. Gen. Physiol.*, **147**, 201-216 (2016).
122. Dai G. et al., The HCN channel voltage sensor undergoes a large downward motion during hyperpolarization, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 686-694 (2019).
123. https://www.sigmaaldrich.com/PL/pl/product/sigma/sml4210?utm_, [dostęp: 22.08.2025].
124. Zagotta W. N. et al., An improved fluorescent noncanonical amino acid for measuring conformational distributions using time-resolved transition metal ion fret, *eLife*, **10** (2021).
125. Arribat M. et al., Phospholyl(borane) Amino Acids and Peptides: Stereoselective Synthesis and Fluorescent Properties with Large Stokes Shift, *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 1028-1034 (2018).
126. Hilaire M. R. et al., Blue fluorescent amino acid for biological spectroscopy and microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **114**, 6005-6009 (2017).
127. Zhu Y. Y. et al., Free Amino Acid Recognition: A Bisbinaphthyl-Based Fluorescent Probe with High Enantioselectivity, *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 175-181 (2019).
128. Jones C. M. et al., Synthesis and characterization of fluorescent amino acid dimethylaminoacridonylalanine, *Arkivoc*, 2021, 97-109 (2021).
129. Yuan Y. et al., Fluorescent-Dye-Labeled Amino Acids for Real-Time Imaging in *Arabidopsis thaliana*, *Molecules*, **28** (2023).

130. Vinod Kumar V. et al., Fluorescent carbon quantum dots chemosensor for selective turn-on sensing of Zn^{2+} and turn-off sensing of Pb^{2+} in aqueous medium and zebrafish eggs, *New J. Chem.*, **41**, 15157-15164 (2017).
131. Zhang K. et al., Synthesis and application of the blue fluorescent amino acid l-4-cyanotryptophan to assess peptide-membrane interactions, *Chem. Commun.*, **55**, 5095-5098 (2019).
132. Cheng M. H. Y. et al., A convenient method for multicolour labelling of proteins with BODIPY fluorophores via tyrosine residues, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **16**, 1260-1267 (2017).
133. Fernandez A. et al., A Fluorescent Activatable AND-Gate Chemokine CCL2 Enables In Vivo Detection of Metastasis-Associated Macrophages, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **58**, 16894-16898 (2019).
134. Ge J. et al., A self-immobilizing and fluorogenic unnatural amino acid that mimics phosphotyrosine, *Chem. Commun.*, **47**, 10939-10941 (2011).
135. Tara T. B. et al., Wash-free and selective imaging of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) expressing cells with fluorogenic peptide ligands, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **500**, 283-287 (2018).
136. Zhao C. et al., Searching for the Optimal Fluorophore to Label Antimicrobial Peptides, *ACS Comb. Sci.*, **18**, 689-696 (2016).
137. Mendive-Tapia L. et al., Spacer-free BODIPY fluorogens in antimicrobial peptides for direct imaging of fungal infection in human tissue, *Nat. Commun.*, **7** (2016).
138. Van Oosten M. et al., Real-time in vivo imaging of invasive- and biomaterial-associated bacterial infections using fluorescently labelled vancomycin, *Nat. Commun.*, **4** (2013).
139. Ning X. et al., Maltodextrin-based imaging probes detect bacteria in vivo with high sensitivity and specificity, *Nat. Mater.*, **10**, 602-607 (2011).
140. Leevy W. M. et al., Optical imaging of bacterial infection in living mice using a fluorescent near-infrared molecular probe, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 16476-16477 (2006).
141. Akram A. R. et al., Enhanced avidity from a multivalent fluorescent antimicrobial peptide enables pathogen detection in a human lung model, *Sci. Rep.*, **9** (2019).
142. Huang W. E. et al., Shining Light on the Microbial World: The Application of Raman Microspectroscopy, in *Advances in Applied Microbiology*, **70**, 153–186 (2010).

143. Berney M. et al., Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight kit in combination with flow cytometry, *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 3283-3290 (2007).
144. Radkov A. D. et al., Imaging Bacterial Cell Wall Biosynthesis, *Annu. Rev. Biochem.*, **87**, 991-1014 (2018).
145. Egan A. J. F. et al., Regulation of bacterial cell wall growth, *FEBS J.*, **284**, 851-867 (2017).
146. Davey H. M. et al., Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: The importance of single-cell analyses, *Microbiol. Rev.*, **60**, 641-696 (1996).
147. Sonogashira K. et al., A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines, *Tetrahedron Lett.*, **16**, 4467-4470 (1975).
148. Sonogashira K., Development of Pd-Cu catalyzed cross-coupling of terminal acetylenes with sp²-carbon halides, *J. Organomet. Chem.*, **653**, 46-49 (2002).
149. Chinchilla R. et al., The Sonogashira reaction: A booming methodology in synthetic organic chemistry, *Chem. Rev.*, **107**, 874-922 (2007).
150. Saghyan A. S. et al., Synthesis of Enantiomerically Enriched Alkynylaryl-Substituted α -Amino Acids through Sonogashira Reactions, *ChemistrySelect*, **4**, 13806-13809 (2019).
151. Boyarskaya D. V. et al., Effect of the Structure of C,N-Chelate Diaminocarbene Palladium(II) Complexes on Their Catalytic Activity in the Sonogashira Reaction, *Russ. J. Org. Chem.*, **56**, 818-824 (2020).
152. Cao Y. X. et al., A Copper-Catalyzed Sonogashira Coupling Reaction of Diverse Activated Alkyl Halides with Terminal Alkynes Under Ambient Conditions, *Adv. Synth. Catal.*, **362**, 2280-2284 (2020).
153. Negishi E. I. et al., Palladium-catalyzed alkynylation, *Chem. Rev.*, **103**, 1979-2018 (2003).
154. Chinchilla R. et al., The Sonogashira reaction: A booming methodology in synthetic organic chemistry, *Chem. Rev.*, **107**, 874-922 (2007).
155. Surry D. S. et al., Biaryl phosphane ligands in palladium-catalyzed amination, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 6338-6361 (2008).
156. Mohajer F. et al., Copper-free Sonogashira cross-coupling reactions: an overview, *RSC Adv.*, **11**, 6885-6925 (2021).

157. Roopesh K. L. et al., Montmorillonite K-10 supported palladium nanoparticles: A catalyst for the preparation of α -aminoketones employing copper free acyl Sonogashira reaction, *Indian J. Chem. B*, **60**, 977-982 (2021).
158. Chen Q. et al., Nickel-Catalyzed Decarbonylative Alkynylation of Acyl Fluorides with Terminal Alkynes under Copper-Free Conditions, *Synlett*, **32** (2021).
159. Santra S. et al., A supported palladium nanocatalyst for copper free acyl Sonogashira reactions: One-pot multicomponent synthesis of N-containing heterocycles, *Green Chem.*, **13**, 3238-3247 (2011).
160. Shi L. et al., Acute toxic effects of lead (Pb²⁺) exposure to rare minnow (*Gobiocypris rarus*) revealed by histopathological examination and transcriptome analysis, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **78** (2020).
161. Mohsin Ejaz M. G. M. S.-W. K., Fluorescent Benzoxazine-Perylene Linked Covalent Organic Polymer as a Sensing Probe for Lead Ions and 2,4,6-Trinitrophenol, *ACS Appl. Polym. Mater.*, **6**, 9170-9179 (2024).
162. Goto M. et al., Synthesis and Cross-Linking of a Benzoxazine-Containing Anthracene Moiety: Thermally Stable Photoluminescent Benzoxazine Resin, *Macromolecules*, **53**, 6640-6648 (2020).
163. Ondrisek P. et al., Acetylene Derivatives of Cationic Diazoatriangulenes and Diaza[4]Helicenes - Access to Red Emitters and Planar Chiral Stereochemical Traits, *Chem. Eur. J.*, **28** (2022).
164. Govdi A. I. et al., 4,5-Bis(arylethynyl)-1,2,3-triazoles-A New Class of Fluorescent Labels: Synthesis and Applications, *Molecules*, **27** (2022).
165. Ali M. F. B. et al., A selective and highly sensitive high performance liquid chromatography with fluorescence derivatization approach based on Sonogashira coupling reaction for determination of ethinyl estradiol in river water samples, *J. Chromatogr. A*, **1628** (2020).
166. Osati S. et al., Synthesis and spectral properties of phthalocyanine-BODIPY conjugates, *Tetrahedron Lett.*, **56**, 2049-2053 (2015).
167. Best M. et al., Protein-specific localization of a rhodamine-based calcium-sensor in living cells, *Org. Biomol. Chem.*, **14**, 5606-5611 (2016).
168. Kasprzak A. et al., Application of Monoferrocenylsumanenes Derived from Sonogashira Cross-Coupling or Click Chemistry Reactions in Highly Sensitive and Selective Cesium Cation Electrochemical Sensors, *J. Org. Chem.*, **88**, 4199-4208 (2023).

169. Nakano-Yasaka N. et al., Development of a selective fluorescence derivatization strategy for thyroid hormones based on the Sonogashira coupling reaction, *J. Chromatogr. A*, **1677** (2022).
170. Szyszkowska M. et al., Temperature-dependence of spectral and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives of acetylene and buta-1,3-diyne, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, **358**, 236-245 (2018).
171. Wtulich J., Synteza i właściwości spektroskopowe estru metylowego N-Boc-(3,5-bis-(2-fenyletynylo))tyrozyny, Uniwersytet Gdański, Gdańsk - praca licencjacka (2021).
172. Zaucha W., Synteza i właściwości spektroskopowe nowych acetylenowych pochodnych tyrozyny, Uniwersytet Gdański, Gdańsk - praca magisterska (2025).
173. Magde D. et al., Fluorescence Quantum Yields and Their Relation to Lifetimes of Rhodamine 6G and Fluorescein in Nine Solvents: Improved Absolute Standards for Quantum Yields, *Photochem. Photobiol.*, **75** (2002).
174. Hua C. J. et al., Optical property investigations of coumarin and indene diketone structure dyes: Experiment and calculation, *Results Chem.*, **4** (2022).
175. Chen M. C. et al., Fluorescent Chromophores Containing the Nitro Group: Relatively Unexplored Emissive Properties, *ChemPlusChem*, **86**, 11-27 (2021).
176. Valmiki P. A. et al., Fluorescence Quenching and Electron Transfer Dynamics of a Thiophene-Substituted 1,3,4-Oxadiazole Derivative with Nitroaromatic Compounds, *J. Fluoresc.*, **35**, 10653-10668 (2025).
177. Guzow K. et al., Photophysical Properties of Tyrosine and Its Simple Derivatives Studied by Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy, Global Analysis, and Theoretical Calculations, *J. Phys. Chem. B*, **108**, 3879-3889 (2004).
178. Unruh J. R. et al., Tyrosyl rotamer interconversion rates and the fluorescence decays of n-acetyltyrosinamide and short tyrosyl peptides, *J. Phys. Chem. B*, **111**, 5494-5502 (2007).
179. Johnson I., Fluorescent probes for living cells, *Histochem. J.*, **30**, 123-140 (1998).
180. Lavis L. D. et al., Fluorogenic label for biomolecular imaging, *ACS Chem. Biol.*, **1**, 252-260 (2006).
181. Schulman S. G. et al., Fluorescence of 6-methoxyquinoline, quinine, and quinidine in aqueous media, *J. Pharm. Sci.*, **63**, 876-880 (1974).