

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

PETRA HOHLER

MAGISTRSKA NALOGA

Magistrski študij laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2014

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

PETRA HOHLER

**Vrednotenje od pH odvisnih foto-fizikalnih lastnosti izbranih
rodaminskih derivatov**

**Evaluation of pH dependent photo-physical properties of
selected rhodamine derivatives**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom doc. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Staneta Pajka, mag. farm..

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Janezu Mravljaku in somentorju asist. dr. Stanetu Pajku za pomoč pri pripravi in analizi vzorcev, za njuno vodenje, spodbude in strokovno pomoč ter nasvete pri opravljanju magistrske naloge.

Hvala tudi strokovni sodelavki na Katedri za farmacevtsko kemijo, ki je bila vedno pripravljena priskočiti na pomoč.

Rada bi se zahvalila tudi svojim sodelavcem na Oddelku za laboratorijsko diagnostiko Splošne bolnišnice Celje, ki so tekom mojega študija pokazali veliko dobre volje pri medsebojnih menjavah službenih obveznosti.

Prav tako se zahvaljujem tudi svojim staršem, sošolcem in prijateljem, ki so mi stali ob strani in me podpirali v času študija, ter za vse njihove spodbudne besede.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo z naslovom Vrednotenje od pH odvisnih foto-fizikalnih lastnosti izbranih rodaminskih derivatov izdelala samostojno, pod mentorstvom doc. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Staneta Pajka, mag. farm..

Petra Hohler

Ljubljana, 2014

Predsednik komisije: prof. dr. Janja Marc

Član komisije: asist. dr. Jurij Trontelj

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	III
ABSTRACT.....	V
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO GRAFOV.....	VIII
1. UVOD	1
1.1. Spektroskopske analizne metode	1
1.2. UV/VIS absorpcijska spektroskopija	1
1.2.1. Absorpcijski spekter	3
1.2.2. UV/VIS spektrofotometer	4
1.3. Fluorescenčna spektroskopija	6
1.3.1. Fluorescenca.....	6
1.3.2. Jablonskijev diagram	7
1.3.3. Ekscitacijski in emisijski spekter	8
1.3.4. Spektrofluorometri	8
1.4. Fluorescenčni označevalci	10
1.4.1. Fluorescenčne sonde.....	10
1.4.2. Fluorescentne spojine, ki so odvisne od pH.....	11
1.5. DC-SIGN	12
1.5.1. DC-SIGN receptor.....	12
1.5.2. Sintezni ligandi DC-SIGN in njihov terapevtski potencial	14
2. NAMEN DELA	15
3. MATERIALI IN EKSPERIMENTALNO DELO	16
3.1. Materiali.....	16
3.1.1. Reagenti	16
3.1.2. Oprema.....	18
3.1.3. Aparature.....	18
3.2. EKSPERIMENTALNO DELO	19
3.2.1. Priprava pufra: citronska kislina- Na_2HPO_4	19
3.2.1.1. Priprava pufrov	20
3.2.2. Priprava testnih spojin za testiranje	21
3.3.2.1. Priprava osnovnih raztopin za testiranje	21
3.3.2.2. Priprava vzorčnih raztopin za testiranje za UV/VIS in fluorescenčno spektroskopijo	22
3.3.2.3. Priprava raztopine vzorčne slepe za spojine MP-1, AAG-12 in MP-17 za UV/VIS spektroskopijo	25
3.2.3. Inkubacija čez noč	25
3.2.4. Merjenje absorbance z UV/VIS spektrofotometrom.....	26
3.2.5. Merjenje fluorescence s fluorescenčnim spektrofotometrom	27
3.2.6. Vrednotenje meritev	29
4. REZULTATI	30
4.1. Rezultati meritev z UV/VIS spektroskopijo.....	30
4.1.1. Absorpcijski spektri spojine MP-1	31
4.1.2. Rezultati za spojino AAG-12	31
4.1.2.1. Absorpcijski spektri spojine AAG-12 (konc. 4×10^{-6} M)	32

4.1.2.2. Absorpcijski spektri spojine AAG-12 (konc. 2×10^{-5} M).....	32
4.1.2.3. Absorpcijski spektri spojine AAG-12 (10^{-5} M).....	33
4.1.3. Rezultati za spojino MP-17.....	34
4.1.3.1. Absorpcijski spektri spojine MP-17 (konc. 4×10^{-6} M).....	34
4.1.3.2. Absorpcijski spektri spojine MP-17 (konc. 2×10^{-5} M).....	35
4.1.3.3. Absorpcijski spektri spojine MP-17 (konc. 10^{-5} M).....	35
4.2. Rezultati fluorescentne spektroskopije.....	36
4.2.1. Emisijski spektri spojine MP-1.....	37
4.2.2. Rezultati meritev za spojino AAG-12.....	37
4.2.2.1. Emisijski spektri spojine AAG-12 (konc. 4×10^{-8} M).....	38
4.2.2.2. Emisijski spektri spojine AAG-12 (konc. 2×10^{-7} M).....	38
4.2.2.3. Emisijski spektri spojine AAG-12 (konc. 10^{-7} M).....	39
4.2.3. Rezultati meritev za spojino MP-17.....	40
4.2.3.1. Emisijski spektri spojine MP-17 (konc. 4×10^{-8} M).....	40
4.2.3.2. Emisijski spektri spojine MP-17 (konc. 2×10^{-7} M).....	41
4.2.3.3. Emisijski spektri spojine MP-17 (10^{-5} M).....	41
4.3. Titracijske krivulje fluorescentnih spojin rodaminskega tipa.....	42
4.3.1. Titracijske krivulje za spojino MP-1.....	42
4.3.2. Titracijska krivulja za spojino AAG-12.....	43
4.3.2.1. Titracijska krivulja za spojino AAG 12 (4×10^{-8} M).....	43
4.3.2.2. Titracijska krivulja za spojino AAG-12 (2×10^{-7} M).....	44
4.3.2.3. Titracijska krivulja za spojino AAG-12 (konc. 10^{-7} M).....	45
4.3.2. Titracijska krivulja za spojino MP-17.....	45
4.3.2.1. Titracijska krivulja za spojino MP-17 (konc. 4×10^{-8} M).....	46
4.3.2.2. Titracijska krivulja za spojino MP-17 (konc. 2×10^{-7} M).....	47
4.3.2.3. Titracijska krivulja za spojino MP-17 (konc. 10^{-7} M).....	48
4.4. Normalizirane maksimalne krivulje.....	48
4.4.1. Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino MP-1....	49
4.4.2. Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino AAG-12	49
4.4.2.1. Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino AAG-12 (konc. 4×10^{-6} M in 4×10^{-8} M).....	50
4.4.2.2. Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino AAG-12 (konc. 2×10^{-5} M in 2×10^{-7} M).....	50
4.4.2.3. Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino AAG-12 (konc. 10^{-5} M in 10^{-7} M).....	51
4.4.3. Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino MP-17... 51	51
4.4.3.1. Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino MP-17 (konc. 4×10^{-6} M in 4×10^{-8} M).....	52
4.4.3.2. Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino MP-17 (konc. 2×10^{-5} M in 2×10^{-7} M).....	52
4.4.3.3. Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino MP-17 (konc. 10^{-5} M in 10^{-7} M).....	53
5. RAZPRAVA.....	54
6. SKLEPI.....	58
7. LITERATURA.....	59

POVZETEK

Nekatere spojine rodaminskega tipa, katerih fluorescenca je odvisna od pH se pogosto uporabljajo kot deli fluorescentnih sond ali prob za določanje pH posameznih celičnih organelov. Rodamini imajo v splošnem odlične fotofizikalne lastnosti kot so visok kvantni izkoristek, visok molarni ekstinkcijski koeficient, poleg tega fluorescirajo pri valovnih dolžinah, ki so mnogo višje od avtofluorescence celičnih komponent. Zelo pomembno je tudi, da so načeloma netoksični in prehajajo biološke membrane.

V okviru magistrske naloge smo ovrednotili foto-fizikalne lastnosti novim spojinam rodaminskega tipa, ki fluorescirajo v odvisnosti od pH, in so uporabne kot molekularna orodja za določanje pH v celičnih organelih s pomočjo fluorescenčne mikro-spetroskopije.

V nalogo smo vključili tri na novo sintetizirane spojine (**MP-1**, **AAG-12** in **MP-17**), ki sta jih sintetizirala doc. dr. Janez Mravljak in asist. dr. Stane Pajk na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Spojini **MP-1** in **AAG-12** sta derivata rodamina 6G, spojina **MP-17** pa je derivat rodamina B.

V sklopu eksperimentalnega dela smo si pripravili vzorčne spojine v pufrskih raztopinah različnih pH vrednosti. Naslednji dan, ko se je vzpostavilo ravnovesje (to se vzpostavi takrat, ko se v vzorčni raztopini razmerje med planarno obliko spojine in spirociklično obliko spojine ne spreminja več), smo posneli njihove absorpcijske in emisijske spektre. Iz dobljenih rezultatov smo narisali titracijske krivulje, ki pokažejo spremembe v intenziteti fluorescence v odvisnosti od pH, grafično določili okvirne vrednosti pKa za posamezno spojino.

Ugotovili smo, da so vse tri spojine rodaminskega tipa dobro topne v DMSO. Spojina **MP-1** ima izrazit preskok v obarvanosti med pH vrednostjo 5,0 in 3,0.

Spojina **AAG-12** ima pri konc. $4 \times 10^{-8} M$ izrazit preskok v obarvanosti med pH 5,0 in 2,6. Pri konc. $2 \times 10^{-7} M$ in $10^{-7} M$ ima spojina izrazit preskok med pH 5,0 in 3,0. Obe spojinii imata preskok v obarvanosti pri prenizkem pH in zato za označevanje kislih celičnih struktur nista primerni.

Pri spojini **MP-17** izrazitega preskoka v obarvanosti nismo opazili, ampak je v sredini prisoten plato in zato za označevanje kislih celičnih struktur prav tako ni primerna.

Iz narisanih titracijskih krivulj smo grafično določili tudi okvirne pKa vrednosti.

Te vrednosti so naslednje:

- spojina **MP-1** ima okvirno vrednost pri 4,4
- spojina **AAG-12** ima pri vseh treh konc. ($4 \times 10^{-8} \text{ M}$, $2 \times 10^{-7} \text{ M}$ in 10^{-7} M) okvirno vrednost pri 4,0
- pri spojini **MP-17** okvirne vrednosti nismo mogli določiti, zaradi slabo definiranega prehoda.

Normalizirane maksimalne krivulje fluorescence in absorbance kažejo Stokesov premik, saj so spektri emitirane svetlobe pomaknjeni k daljšim valovnim dolžinam. Dolžina tega premika je pri vseh treh spojinah (**MP-1**, **AAG-12** in **MP-17**) približno 15 nm, kar je ugodno. Normalizirani krivulji sta skoraj simetrični; pri absorpcijskem spektru se pojavi rama, ki pa pri emisijskem spektru ni vidna.

ABSTRACT

Several compounds of rhodamine type, fluorescence of which is pH depended, are often used as parts of fluorescent labels for determination of pH of specific cell organelles. Rhodamines are very appropriate since they possess excellent photo-physical properties; high quantum yield and molar extinction coefficient, low photobleaching, absorption and emission maximum are present at much higher wavelengths as autofluorescence of cell components etc. Very importantly they are generally non-toxic and can migrate through biological membranes.

Within the scope of this thesis we have evaluated some photo-physical properties of new the compounds of the rhodamine with pH dependent fluorescence intensity. These probes can be used as molecular tools for determining pH values of cellular organelles by means of fluorescent microscopy.

For this purpose we have examined three newly synthesized compounds (MP-1, AAG-12 and MP-17). They were synthesized by doc. dr. Janez Mravljak and asist. dr. Stane Pajk from department of pharmaceutical chemistry on Faculty of Pharmacy in Ljubljana. Compounds MP-1 and AAG-12 are derived from rhodamine 6G, compound MP-17 is derived from rhodamine B.

Within experimental part of thesis we have prepared sampled compounds in buffer solutions of different pH values. When the equilibrium was established (this happens when the ratio of planar and spirocyclic form of compounds stabilizes), we recorded absorption and emission spectra. Maximal intensity of each spectrum was than plotted against appropriate pH value at which spectrum was recorded. From this titration curves we could visually determine approximate values of pKa for each compound.

We found that all three compounds of rhodamine type are easily soluble in DMSO. Compound MP-1 shifts in coloration between pH values 5.0 and 3.0.

Compound AAG-12 in concentration $\times 10^{-8} M$ shifts in coloration between pH values 5.0 and 2.6. At concentrations of $2 \times 10^{-7} M$ in $10^{-7} M$ shift in coloration happens between pH

values 5.0 and 3.0. Both compounds shift in coloration at very low pH values, therefore they are not suitable for marking acid cellular structures.

In the case of compound **MP-17** there was no visible shift in coloration therefore this compound is also not suitable for marking acid cellular structures.

From draw titration curves we have visually determined approximate pKa values.

These are following:

- for compound **MP-1** this is at app. 4,4
- for compound **AAG-12** is at all three concentrations (4×10^{-8} M, 2×10^{-7} M in 10^{-7} M) at app. 4,0
- for compound **MP-17** we could not determine pKa value, due to poorly defined transition.

Stokes shift of maximal fluorescence and absorption wavelength is clearly visible from normalized curves of fluorescence and absorption recorded at pH of its maximal intensity. With all three compounds (**MP-1**, **AAG-12** and **MP-17**) the Stokes shift is approximately 15 nm, which is favorable. Normalized curves are almost symmetrical; with the exception of a shoulder in absorption spectrum, which is not present in fluorescence spectrum.

SEZNAM OKRAJŠAV

A = absorbanca

ACP = antigen predstavljajoče celice

c = koncentracija snovi

CRD = domena za prepoznavanje ogljikovih hidratov

ϵ = molarni absorpcijski koeficient

DC = dendritične celice

DMSO = dimetilsulfoksid (Dimethyl Sulfoxid)

l = dolžina poti žarka

I = intenziteta prepuščene svetlobe

I_0 = intenziteta vpadne svetlobe

IR = infrardeča svetloba

λ = valovna dolžina

M = molarnost

M^* = molekulska masa

m = masa

n = množina snovi

HPLC = kromatografija visoke ločljivosti

Konc. = koncentracija

S.T. = sobna temperatura

UV = ultravijolična svetloba

VIS = vidna svetloba

V = volumen

KAZALO SLIK

Slika 1: Zmanjšanje intenzitete žarka sevanja zaradi absorpcije v raztopini s koncentracijo c	2
Slika 2: Absorpcijski spekter spojine AAG 12 pri različnih vrednostih pH.....	4
Slika 3: Shema UV/VIS spektrofotometra (prirejeno in povzeto po (5)).....	4
Slika 4: Jablonskijev diagram	7
Slika 5: Ekscitacijski in emisijski spekter spojine MP-1.....	8
Slika 6: Shematičen prikaz spektrofluorometra	9
Slika 7: Sprememba v strukturi oz. preklopu spojine rodaminskega tipa iz spirociklične v planarno obliko ter dikationsko obliko v zelo kislem okolju ($\text{pH} < 2$).....	11
Slika 8: Kristalna struktura DC-SIGN CRD. Kot modre kroglice so prikazani trije Ca^{2+} ioni, trak predstavlja peptidno ogrodje, aminokislinski ostanki pa so predstavljeni kot paličice	13
Slika 9: Primer serije vzorčnih raztopin v območju pH- ja od 2,6 do 7,6 za novo spojino AAG-12. Zgoraj so vzorčne raztopine za UV/VIS spektroskopijo (konc. 2×10^{-5} M) , spodaj pa raztopine za fluorescenčno spektroskopijo (konc. 2×10^{-7} M)	22
Slika 10: UV/VIS spetrofotometrom Varian 50 Conc, s pomočjo katerega smo našim spojinam izmerili absorpcijske spektre.	26
Slika 11: Fluorescenčni spetrofotometer ParkinElmer LS 55, s katerim smo spojinam MP-1, AAG-12 in MP-17 posneli emisijske spektre.....	28

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Absorpcijski spektri 1×10^{-5} M vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa MP-1 pri različnih pH.	31
Graf 2: Absorpcijski spektri 4×10^{-6} M vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa AAG-12 pri različnih pH.	32
Graf 3: Absorpcijski spektri 2×10^{-5} M vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa AAG-12 pri različnih pH.	32
Graf 4: Absorpcijski spektri 10^{-5} M vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa AAG-12 pri različnih pH.	33
Graf 5: Absorpcijski spektri 4×10^{-6} M vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa MP-17 pri različnih pH.	34
Graf 6: Absorpcijski spektri 2×10^{-5} M vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa MP-17 pri različnih pH.	35
Graf 7: Absorpcijski spektri 10^{-5} M vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa MP-17 pri različnih pH.....	35
Graf 8: Emisijski spektri 1×10^{-7} M vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa MP-1 pri različnih pH vrednostih (ekscitacija pri 510 nm).....	37
Graf 9: Emisijski spektri 4×10^{-8} M vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa AAG-12 pri različnih pH vrednostih (ekscitacija pri 510 nm).....	38
Graf 10: Emisijski spektri 2×10^{-7} M vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa AAG-12 pri različnih pH vrednostih (ekscitacija pri 510 nm).	38

Graf 11: Emisijski spektri 10^{-7} M vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa AAG-12 pri različnih pH vrednostih (ekscitacija pri 510 nm).....	39
Graf 12: Emisijski spektri 4×10^{-8} M vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa MP-17 pri različnih pH vrednostih (ekscitacija pri 540 nm).....	40
Graf 13: Emisijski spektri 2×10^{-7} M vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa MP-17 pri različnih pH vrednostih (ekscitacija pri 540 nm).....	41
Graf 14: Emisijski spektri 10^{-7} M vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa MP-17 pri različnih pH vrednostih (ekscitacija pri 540 nm).....	41
Graf 15: Titracijska krivulja za spojino MP-1.....	42
Graf 16: Titracijska krivulja za spojino AAG-12 (4×10^{-8} M).....	43
Graf 17: Titracijska krivulja za spojino AAG-12 (2×10^{-7} M).....	44
Graf 18: Titracijska krivulja za spojino AAG-12 (2×10^{-7} M) z izpuščeno točko pri pH 4,4.....	44
Graf 19: Titracijska krivulja za spojino AAG-12 (konc. 10^{-7} M).....	45
Graf 20: Titracijska krivulja za spojino MP-17 (konc. 4×10^{-8} M).....	46
Graf 21: Titracijska krivulja za spojino MP-17 (konc. 2×10^{-7} M).....	47
Graf 22: Titracijska krivulja za spojino MP-17 (10^{-7} M).....	48
Graf 23: Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za vzorčno spojino MP-1, pri pH 3,0.....	49
Graf 24: Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino AAG-12 (konc. 4×10^{-6} M in 4×10^{-8} M), pri pH 2,6.....	50
Graf 25: Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino AAG-12 (konc. 2×10^{-5} M in 2×10^{-7} M), pri pH 3,0.....	50
Graf 26: Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino AAG-12 (konc. 10^{-5} M in 10^{-7} M), pri pH 2,6.....	51
Graf 27: Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino MP-17 (konc. 4×10^{-6} M in 4×10^{-8} M), pri pH 2,6.....	52
Graf 28: Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino MP-17 (konc. 2×10^{-5} M in 2×10^{-7} M), pri pH 2,6.....	52
Graf 29: Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino MP-17 (konc. 10^{-5} M in 10^{-7} M), pri pH 2,6.....	53

1. UVOD

1.1. Spektroskopske analizne metode

Osnova spektroskopskih analiznih metod je merjenje elektromagnetnega valovanja, ki ga absorbirajo ali emitirajo posamezne komponente v vzorcu, ki ga preiskujemo. Če opazujemo pojav, jih razdelimo v absorpcijske, fluorescenčne in emisijske spektroskopske metode, če pa opazujemo samo naravo snovi pa na atomske in molekularne spektroskopije (1,2).

Različne spektroskopije spadajo med najpomembnejše metode, ki jih poznamo v kemijski analizi, zaradi svoje velike občutljivosti (3). Pri samih metodah spektroskopije uporabljamo elektromagnetno valovanje, ki obsega vse od gama žarkov (valovna dolžina je 10^{-12} m) in vse do radijskih valov (valovna dolžina je 10^3 m). Celotno območje elektromagnetnega valovanja imenujemo elektromagnetni spekter. Delovanje elektromagnetnega valovanja in same snovi v vzorcu je lahko različno. Če snovi v vzorcu (atomi, molekule) sprejmejo energijo, ta pojav imenujemo absorpcija, pojav pri katerem snov odda del energije v obliki sevanja pa emisija.

Najpogosteje uporabljene metode spektroskopije so UV/VIS in fluorescenčna spektroskopija, nuklearna magnetna resonanca (NMR), infrardeča spektroskopija (IR) ter rentgenska difrakcija (1).

1.2. UV/VIS absorpcijska spektroskopija

UV/VIS spektroskopija je najpogosteje uporabljena analitska metoda, za kvantitativno določanje koncentracij različnih anorganskih in organskih spojin ter temelji na absorpciji vidne in ultravijolične svetlobe.

Če kemijske substance v mediju, ki je prepusten za svetlobo, selektivno sprejmejo elektromagnetno sevanje točno določene frekvence, se ta proces imenuje absorpcija. Molekule lahko zavzamejo različna energijska stanja, ki so določena z elektronskimi energijskimi nivoji; ta nivoja sta: osnovni energijski nivo (ne vzbujeno stanje) in višji nivo (vzbujeni nivo). Atom, ion ali molekula lahko iz osnovnega stabilnega stanja, kateri ima nižjo energijo, preide v vzbujeno nestabilno stanje, za katerega je značilna višja energija.

Ta proces se zgodi, če le-ti absorbirajo fotone določenih valovnih dolžin in s tem pridobijo njihovo energijo. Valovna dolžina absorbirane svetlobe je vedno enaka razliki med obema energijskima nivojema.

Del molekule, ki je odgovoren za absorpcijo vidne in UV svetlobe, se imenuje kromofor oz. kromoforni sistem (1, 4).

O absorpciji ultravijolične (UV) ali vidne (VIS) svetlobe govorimo, kadar imamo izvor, ki emitira svetlobo z valovno dolžino med 180 - 340 nm (UV) in 340 - 800 nm (VIS). Pri tem merimo transmitanco (T) ali absorbanco (A).

Če presvetlimo kiveto z vzorcem z monokromatsko svetlobo, ki ima intenziteto I_0 , se bo intenziteta prepuščene svetlobe (I) zmanjšala in je posledica absorpcijske aktivnosti snovi v raztopini.

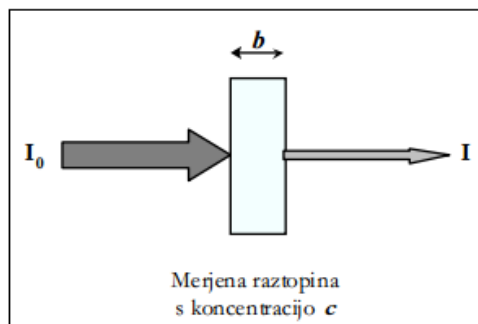
Prepustnost ali transmitanca (T) je delež prepuščene svetlobe in je definirana kot razmerje med intenziteto prepuščene in vpadne svetlobe:

$$T = (I/I_0) \times 100$$

Absorbanca (A) je matematična logaritemska transformacija izmerjene % T in je definirana kot desetiški logaritem razmerja med intenziteto vpadne in intenziteto prepuščene (neabsorbirane) svetlobe:

$$A = -\log_{10} T$$

Če se zmanjša intenziteta elektromagnetnega valovanja po prehodu skozi raztopino, absorbanca raztopine narašča (1,4).



Slika 1: Zmanjšanje intenzitete žarka sevanja zaradi absorpcije v raztopini s koncentracijo c (4).

Od koncentracije raztopine in prav tako od dolžine poti, ki jo prepotuje žarek skozi raztopino, je odvisna absorbanca, od intenzitete elektromagnetnega sevanja pa je le-ta

neodvisna. Lahko pa rečemo drugače, da je odvisna od števila molekul, katere so odgovorne za absorpcijo elektromagnetnega valovanja (4).

Beer-Lambertov zakon je zakon, ki opisuje zvezo med koncentracijo snovi in absorbanco v kivetu. Za ta zakon velja, da je absorbanca preprosto sorazmerna dolžini optične poti, ki jo prepotuje žarek ($l = 1 \text{ cm}$), molarnemu absorpcijskemu koeficientu (ϵ), ki je značilen za določeno snov, in koncentraciji snovi (c):

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

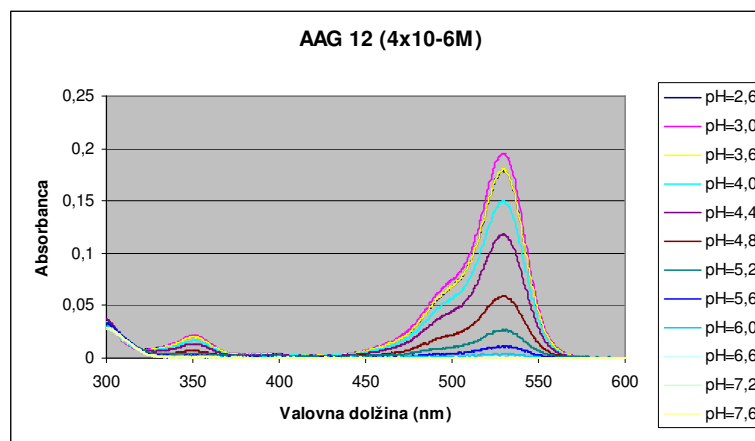
Zveza med dolžino optične poti in absorbanco je linearna, vendar lahko pride tudi do odstopanja le-te. Ta vzrok je lahko v kemični naravi snovi, ki jo merimo, ali pa sama napaka nastane zaradi merjenja izven linearnega območja. Napakam se izognemo tako, da izdelamo umeritveno krivuljo s standardnimi koncentracijami snovi in nato merimo samo v območju linearnosti umeritvene krivulje (1,4).

1.2.1. Absorpcijski spekter

Absorpcijske karakteristike merjenih substanc se podajo v obliki absorpcijskega spektra (slika 1). V primeru enostavnih molekul v plinskem stanju UV/VIS absorpcijski spekter pokaže ozke trakove (»pike«), medtem ko ioni in molekule v raztopinah pokažejo širše trakove. Slednji so posledica množice vibracijskih in rotacijskih energijskih nivojev, ki so prisotni poleg glavnih elektronskih prehodov. Vibracijske spremembe se pojavijo zaradi množice vibracijskih stanj, ki nastanejo zaradi nihanja vezi med atomi. Gibanje molekule okoli njene gravitacijske osi pa doprinese k rotacijskim spremembam (4).

Absorpcijski spekter prikazuje odvisnost absorbance od valovne dolžine. Ker je valovna dolžina absorbirane svetlobe odvisna od porazdelitve atomov ali od funkcionalnih skupin in so le-ti različni za posamezne molekule. Tudi okolje molekule kot so: pH in polarnost topila, polarnost sosednjih skupin, relativna orientacija sosednjih molekul, vplivajo na absorpcijski spekter. Pri tisti valovni dolžini, kjer je energija ravno pravšnja za prehod elektronov v vzbujeno stanje, je absorpcija najvišja.

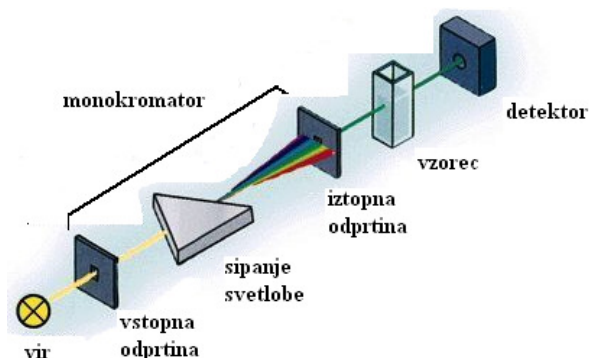
UV/VIS spektri so premalo specifični, da bi jih lahko uporabili za določanje istovetnosti preiskovane snovi, lahko pa se uporabljajo za sekundarno identifikacijo.



Slika 2: Absorpcijski spekter spojine AAG 12 pri različnih vrednostih pH.

1.2.2. UV/VIS spektrofotometer

Spektrofotometri so inštrumenti za merjenje absorbance oz. transmittance. Analizator je sestavljen iz izvora svetlobe (žarnica), monokromatorja (omogoča izvor ozkega območja svetlobe), detektorja (pretvarja svetlobno energijo v električno) in registratorja (omogoča vrednotenje signala) (1). Na sliki 3 je prikazan eno-žarkovni spektrofotometer.



Slika 3: Shema UV/VIS spektrofotometra (prirejeno in povzeto po (5)).

Kot izvor svetlobe se običajno uporabljata dve žarnici. Za VIS območje (350 nm do 1000 nm) se uporablja volframova žarnica, za UV območje (195 nm do 375 nm) pa se uporablja devterijeva žarnica. Pomembno je, da sta pri viru svetlobe zagotovljena dva pogoja: to sta zadostna moč in stabilno sevanje (1,6).

Da bi iz kontinuiranega spektra dobili monokromatsko svetlobo uporabljamo monokromator. Njegovi sestavni deli so vhodna reža, zrcalo ali leča, prizma ali uklonska mrežica (razprši polikromatsko sevanje), žariščna leča in izstopna reža (1, 6, 7).

Vzorec nalijemo v kivete, ki morajo biti narejene iz materiala, ki prepušča zelene valovne dolžine in je inerten glede na raztopino analita. Kivete narejene za VIS področje so lahko iz navadnega stekla, medtem ko so za UV območje kivete narejene iz kvarčnega stekla. Običajna dolžina kivet je 1 cm, poznamo pa še drugačne dolžine, ki so lahko od 0,1 cm do 10 cm. Tam, kjer potuje žarek svetlobe skozi kiveto, morata biti strani kivete gladki, zato da se zmanjša izguba odboja žarka. Kiveta ima drugi dve strani manj gladki, ki sta namenjeni zato, da jo lahko primemo (6).

Detektor meri intenziteto prepuščene svetlobe skozi vzorec. Svetloba se pri prehodu skozi vzorec delno absorbira, delno pa prehaja skozi vzorec. Intenziteto prepuščene svetlobe izmerimo fotoelektrično s pomočjo fotopomnoževalke, ki prevede električni signal v ustrezno električno napetost. Fotopomnoževalke uporabljamo pri nizkih intenzitetah svetlobe, sicer se uporabljajo tudi fotodiode.

Najpomembnejši del detektorja je fotocelica, ki vsebuje fotoemisivno katodo in anodo, med katerima je velika napetost. Elektron iz katode je s pomočjo fotona vpadne svetlobe izbit iz katode in nato se le-ta pod vplivom pozitivne napetosti do 100 do 200 V usmeri k naslednji elektrodi. Elektron tako pod vplivom električnega polja pridobi veliko kinetične energije. Takšen elektron je nato sposoben izbiti 2-3 sekundarne elektrone iz površine elektrode ob udarcu. Ti izbiti elektroni se nato usmerijo naprej (pod vplivom električnega polja) do naslednje elektrode. Na koncu merimo tok elektronov.

Fotopomnoževalka ojača signal in v bistvu predstavlja večje število fotocelic v enem elementu. Detektorji z nizom diod (»Diode array« detektorji) se uporabljajo v spektrometrih, ki merijo v celotnem spektru svetlobe hkrati (1, 6).

1.3. Fluorescenčna spektroskopija

Fluorescenčna spektroskopija je metoda, ki spada med osnovna orodja v biofiziki in biokemiji. Njena uporaba v bioloških raziskavah pa se je v zadnjem času močno razširila tudi na druga področja kot so biotehnologija, medicinska diagnostika, itd.. Zanj je značilno, da analiziramo fluorescenco v vzorcu. Njena prednost je predvsem v visoki občutljivosti, saj pri tej metodi fluorescenčni signal praviloma nima ozadja (8).

1.3.1. Fluorescenca

Osnovni princip fluorescence je interakcija svetlobe s snovjo. Ko svetloba zadane ob snov, lahko gre skozi snov (porozna snov), se lahko razprši ali absorbira. V prvih dveh primerih ne pride do spremembe v energiji, ko pa se svetloba absorbira, pride do pretvorbe svetlobne energije v različne oblike kot je na primer fluorescenca (9).

Leta 1852 je George Gabriel Stokes prvič opisal pojav fluorescence, fizikalno pa ga je leta 1935 opisal še Alexander Jablonski.

Fluorofor je del molekule, ki je odgovoren za fluorescenco. V osnovnem energetskem stanju fluorofor absorbira svetlobno energijo (foton). Pri tem pojavu pride do spremembe v elektronskem, rotacijskem in vibracijskem stanju. Foton se nato vrača v osnovno stanje po dveh poglavitnih poteh in ti sta fluorescenca in vibracijska relaksacija (10).

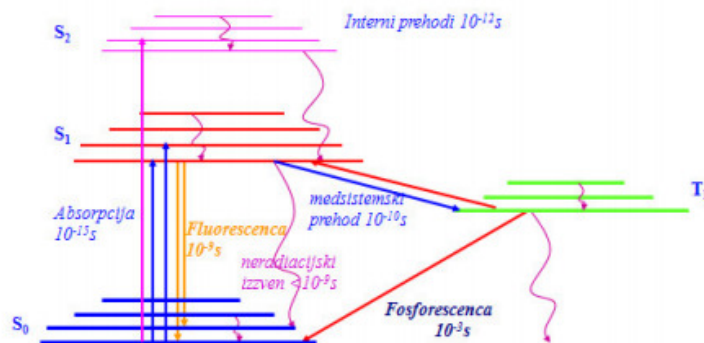
Pri fluorescenci molekula absorbira elektromagnetno valovanje, pri čemer elektroni molekule preidejo v višje energetske stanje oz. višji energetski nivo. Zaradi tega molekula teži k prehodu nazaj v osnovno stanje oz. se želi relaksirati, kar se lahko zgodi v obliki fotona - radiacijska relaksacija (fluorescenca) ali brez oddanega fotona – neradiacijska relaksacija (9).

Od tega ali bo molekula fluorescirala ali ne odloča okolje molekule (pH, raztopljen kisik, temperatura in struktura molekule (funkcionalne skupine, konjugiranost, togost, ...)) (12).

1.3.2. Jablonskijev diagram

Različne fizikalne procese, ki potekajo v vzbujenem stanju molekule, prikazuje Jablonskijev diagram (slika 4) in na njem lahko predstavimo pojav fluorescence. S_0 je osnovno stanje, v katerem se nahaja fluorofor, ki ni absorbiral energije. To je najnižje vibracijsko stanje. Energija se prenese na fluorofor takrat, kadar fluorofor absorbira svetlobo, ta energija je odvisna od valovne dolžine. V primeru, ko je energija večja kot je potrebna pa preskok iz elektronov iz osnovnega v vzbujeno stanje, bo molekula deležna tudi vibracijske in rotacijske spremembe. Prav zaradi tega je interval valovnih dolžin širok in le-ta lahko povzroči ekscitacijo molekule. Za prehod iz osnovnega S_0 v vzbujeno stanje S_1 je potrebna energija. To je tista minimalna energija za fluorescenco, ki je potrebna za prehod iz osnovnega v vzbujeno stane (10).

Molekula ima lahko na vsakem energijskem nivoju več vibracijskih stanj. Če molekula hitro preide na najnižje vibracijsko stanje določenega energijskega nivoja to imenujemo notranja konverzija. Ta proces notranje konverzije se zgodi znotraj 10^{-12} s (življenjski čas fluorescence je tipično 10^{-8} s) in zato izmenjava poteče še preden se svetloba izseva (8). Fluorofor se vrne v najnižje vibracijsko stanje vzbujenega stanja S_1 , pri čemer pa ne pride do oddajanja fotona, saj se presežena energija prenese na sosednje molekule preko direktnih interakcij. Na ta način fluorofor izgubi del pridobljene energije in je osnova za Stokes-ov premik, ki pravi, da je emitirana svetloba vedno višje valovne dolžine (manj energetske bogata) kot ekscitacijska (bolj energetske bogata). Pri fluoroforu je idealno končna stopnja izguba prejete energije oddajanje fotona, katerega energija je enaka razliki med najnižjim vibracijskim stanjem (S_1) in katerikoli vibracijskem oz. rotacijskem stanjem (S_0) (10).

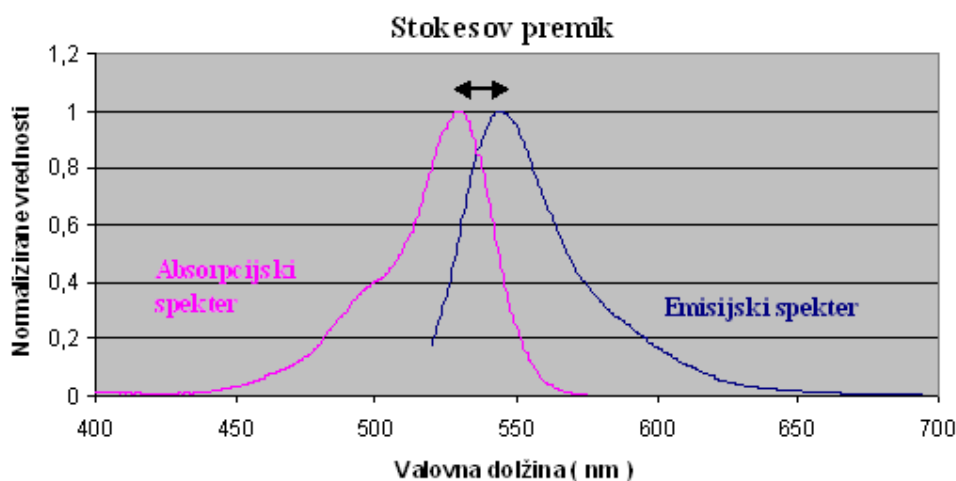


Slika 4: Jablonskijev diagram (10).

1.3.3. Ekscitacijski in emisijski spekter

Ekscitacijski spekter se posname med merjenjem jakosti emisije pri konstantni valovni dolžini, valovna dolžina eksitacije variira. Ekscitacijski in emisijski spekter sta pri isti molekuli podobna. Fluorescenčni spekter se posname pri konstantni valovni dolžini eksitacije (4).

Zaradi vibracijske relaksacije in konverzije je energija, ki jo odda oddani foton, nižja od stanja S_1 (najnižje vibracijsko stanje), kot energija fotona, ki se je absorbiral. Prav zaradi tega so spektri emitirane svetlobe pomaknjeni k daljšim valovnim dolžinam. Ta premik imenujemo Stokesov premik in je prikazan na sliki št. 5. Za fluorofor je značilno, da je dolžina tega premika odvisna od njega. Emitirano in ekscitacijsko svetlobo lažje ločimo med sabo, če je dolžina tega premika čim večja (10).



Slika 5: Ekscitacijski in emisijski spekter spojine *MP-1*.

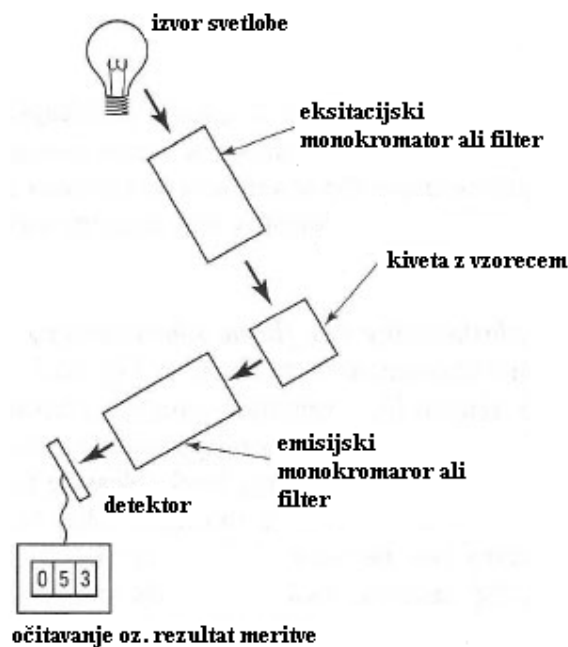
1.3.4. Spektrofluorometri

Pri idealnem inštrumentu emisijski spekter posameznih valovnih dolžin predstavlja izsevano moč po posameznih valovnih dolžinah v območju, katero je določeno z disperzijo monokromatorja in širino reže (8).

Osnovne komponente spektrofluorometra (slika 6) so podobne komponentam absorpcijskega spektrofotometra. Razlika je v tem, da ima fluorometer dva monokromatorja (9). Sestavljen je iz izvora svetlobe, monokromatorja za izbiro

vzbujevalne svetlobe, kivete, monokromatorja za izbiro valovne dolžine emitirane svetlobe in detektorja. Intenziteto fluorescence merimo pod kotom 90° glede na vpadni žarek. Pri spektrofluorimetru imamo dva filtra. Prvi je primarni oz. filter vpadne svetlobe in je odgovoren, da se v vzorcu povzroči fluorescenca, ter drugi oz. sekundarni filter pa ima nalogo, da izolira želeno valovno dolžino emitirane svetlobe. Pri izbiri primarnih filtrov je zelo pomembno, da prepušča samo tiste valovne dolžine, katere se pri ekscitacijskem in emisijskem spektru potem ne prekrivajo. Skozi monokromator oz. filter svetloba potuje iz izvira na vzorec. Izvori sevanja so običajno laserji, laserske diode, svetleče diode, ksenonske žarnice in živosrebrne žarnice. Vzorec del vpadne svetlobe absorbira. V vzorcu posamezne molekule oddajo svetlobo s tem, ko prehajajo na nižje energijsko stanje. Pri tem se svetloba razprši na vse smeri. Skozi drugi monokromator nato potuje ta del svetlobe ter nato doseže detektor. Ta detektor je postavljen pod kotom 90° glede na vpadni žarek. S tem detektor poskuša preprečiti, da bi detektirali prepuščeno oz. odbito vpadno svetlobo (8).

Selektivnost dosežemo z izbiro primerne valovne dolžine vzbujevalne in emitirane svetlobe. Intenziteta fluorescence je odvisna od eksperimentalnih pogojev, pod katerimi se analit nahaja (13).



Slika 6: Shematičen prikaz spektrofluorimetra (14).

1.4. Fluorescenčni označevalci

Če ima snov nekaj ostro definiranih in razmaknjenih energijskih stanj, lahko na osnovi tega načeloma fluorescira vsaka snov. Jedro večine organskih fluoroforov predstavljajo različni aromatski sistemi ali konjugirane dvojne vezi, na fluorescenco pa močno vplivajo tudi vse funkcionalne skupine, ki lahko z resonančnimi in induktivnimi vplivi spremenijo gostoto osnovnega sistema. V primeru, da molekula/makromolekula, ki jo želimo opazovati, ne fluorescira, ji lahko pripnemo fluorofor oz. jo označimo (8, 15).

Tako poznamo fluorescentne označevalce, ki se specifično vežejo na preiskovano molekulo (DNA ali protein) oz. se lokalizirajo v specifični regiji (citoskelet, mitohondrij, Golgijev aparat, endoplazmatski retikulum ali jedro) na podlagi kovalentnih, elektrostatskih ali hidrofobnih interakcij. Poznamo tudi fluorofore, ki so namenjeni sledenju dinamičnih procesov in lokaliziranim spremembam, kot so: koncentracije kovinskih ionov, reaktivnih kisikovih spojin in spremembi membranskega potenciala.

Fluorofori se razlikujejo glede na značilnosti absorpcijskih in emisijskih spektrov. Pomembno je, da ima fluorofor visok kvantni izkoristek in čim večji molarni ekstinkcijski koeficient ter da so visoko fotostabilni. Emitirani fluorofori morajo zadostovati za zajem slike visoke ločljivosti pri intenziteti ekscitacijske svetlobe, ki ne povzroča fotobledenja. Samo izbiro fluoroforov moramo prilagoditi omejitvam optičnega sistema (omejitve filtrov/monokromatorjev ekscitacijskega/emisijskega optičnega sistema, zmogljivosti detektorja, ...) s katerimi spremljamo pojav, ki nas zanima (10).

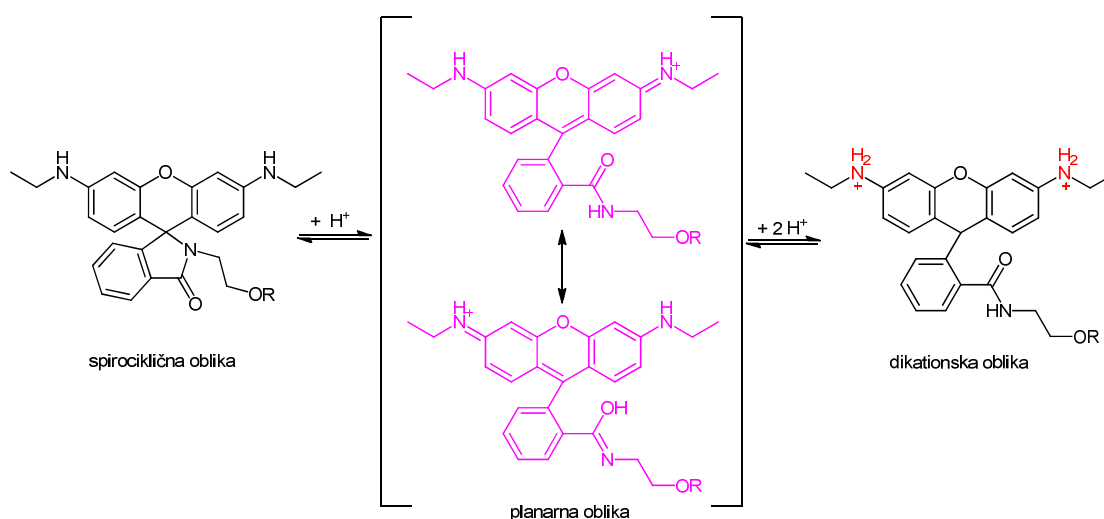
1.4.1. Fluorescenčne sonde

Fluorescenčne sonde sinteznega izvora so močno orodje v celični biologiji za merjenje znotrajceličnih sprememb pH, koncentracij različnih anionov in kationov, reaktivnih kisikovih zvrsti (npr. singletnega kisika, dušikovega oksida ...), ter za vizualizacijo celičnih struktur. Ponujajo veliko prednost pred ostalimi tehnikami, saj ne porušijo strukture celice, imajo visoko občutljivost in selektivnost (16).

1.4.2. Fluorescentne spojine, ki so odvisne od pH

Rodamin je fluorescenčna molekula, ki se pogosto uporablja zaradi svojih odličnih foto-fizikalnih lastnosti; maksimalna absorpcija in emisija se nahajata pri višjih valovnih dolžinah kot avtofluorescenca celice, ima velik kvantni izkoristek in molarni absorpcijski koeficient. Rodamini in njihovi derivati, ki so občutljivi na spremembo pH, so načeloma netoksični in prehajajo biološke membrane (16, 17).

Značilnost primarnih amidov rodamina B in rodamina 6G je sprememba strukture oz. preklop iz spirociklične oblike v planarno, ki je odvisna od pH. V nevtralnem oz. rahlo kislem pH-ju se te spojine nahajajo v spirociklični obliki in so brezbarvne ter ne fluorescirajo. V bolj kislem okolju ob prisotnosti H^+ ionov pride do vzpostavitve ravnotežja in spremembe strukture molekule. Ob ravnotežju pride do odpiranja obroča. Aromatska amino skupina na rodaminu se pretvori v imin in protonira. Molekule preidejo v planarno obliko, doseže se konjugacija, posledica le-tega pa je sprememba barve iz brezbarvne v rožnato; take molekule fluorescirajo. Če pa se pH približuje še bolj kislemu območju (pod pH 2) se protonira še druga aromatska amino skupina na rodaminu. Pri tem se konjugiran sistem poruši tako, da spojina ni več fluorofor, posledica le-tega je znižanje fluorescence pri zelo nizkih pH-jih (16).



Slika 7: Sprememba v strukturi oz. preklopu spojine rodaminskega tipa iz spirociklične v planarno obliko ter dikationsko obliko v zelo kislem okolju ($pH < 2$).

1.5. DC-SIGN

Na antigen predstavljajočih celicah (ADP) – dendritičnih celicah se nahaja DS-SIGN (dendritic cell-specific intracellular adhesion molekule-3-grabbing-non-integrin) in spada v skupino laktina tipa C. Njegova pglavitna vloga je, da privzame patogene, jih prenese v sekundarne limfatične organe ter jih predstavi celicam T. Ker bi lahko nove zdravilne učinkovine preprečile interakcijo patogena z njim in tako preprečile oz. blokirale prvi korak pri okužbi z virusom HIV, je zadnja leta zelo zanimiv kot tarča za razvoj novih zdravilnih učinkovin (18, 19, 20).

1.5.1. DC-SIGN receptor

Na dendritičnih celicah najdemo DC-SIGN receptor, ki spada v družino receptorjev laktinskega tipa C. To je površinski receptor, ki veže glikane patogenih mikro-organizmov. Za njega je značilno, da prepozna vzorce, kateri so skupni za različne patogene. Tako prepozna bakterijske polisaharide, fruktozne in manozne oligosaharidne ostanke, pri DC usmerja migracijo teh celic, njihovo adhezijo in vnetni odziv, sproži imunski odgovor ter sodeluje pri pobegu tumorskih celic ali patogenov izpod nadzora imunskega sistema (20).

DC-SIGN receptor je sestavljen iz treh delov: iz zunajceličnega, transmembranskega in citoplazemskega. Zunajcelični del je tisti del, ki ima domeno CRD (Carbohydrate Recognition Domain), ki je prikazana na sliki 8 in je odgovorna za prepoznavanje ogljikovih hidratov in t.i. »vrat« oz. vratno domeno. Del CRD ima globularno strukturo, ki je sestavljena: iz dveh α -vijačnic, 12-tih β -trakov ter treh disulfidnih mostov. Dve vezavni mesti za Ca^{2+} sta na delu proteina, ki tvori zanko in štrli iz površine. Za konformacijo CRD je ključno eno mesto, drugo pa je namenjeno za tvorbo koordinacijskih vezi, ki se zgradijo z ogljikohidratnimi strukturami. Štiri aminokisliline (Glu347, Asn349, Glu354 in Asn365) reagirajo s Ca^{2+} ioni in narekujejo prepoznavo specifičnih ogljikohidratnih struktur. Transmembranski del sodeluje pri lokalizaciji DC-SIGN na površini celic. Citoplazemski del vsebuje di-levcinski motiv (LL), ki je odgovoren za prevzem antigena), klastre kislin (EEE), ki so odgovorni za prenos signalov, in aktivacijski motiv ITAM (»immune receptor tyrosine-based activation motif«) (19,20,21,22).



Slika 8: Kristalna struktura DC-SIGN CRD. Kot modre kroglice so prikazani trije Ca^{2+} ioni, trak predstavlja peptidno ogrodje, aminokislinski ostanki pa so predstavljeni kot paličice (21).

DC-SIGN ima vezavno mesto, ki Ca^{2+} ionom ponuja šest koordinacijskih vezi in dve dodatni koordinacijski vezi, katere tvorijo ogljikohidratni ostanki. Zaradi zaporedja aminokislin Glu347-Asn349-Glu354-Asn365, ki se nahaja v CRD, izkazuje veliko nagnjenost k vezavi monosaharidov s hidroksilnimi skupinami na mestih 3 in 4, med katere lahko prištevamo tudi ogljikove hidrate, ki vsebujejo manozo.

CRD veže mnogo različnih ligandov; ta vezava pa je visoko regulirana. Do interakcije med DC-SIGN in visoko manoziliranimi oligosaharidi pride v veliki meri. Do interakcije ne pride, ali pa je le-ta šibka in kratkotrajna, če je prisoten samo en terminalni manozni ostanek. V primeru, da so v strukturi vsaj trije manozni ostanki, kateri so v notranjosti glikanske strukture, jih vezavno mesto prepozna (19,20,21,22).

Naloga DC-SIGN receptorja je, da prepozna ligande, ki so izraženi na patogenih. Tem ligandom olajša prevzem v DC. Interakcija med ligandom in samim receptorjem DC-SIGN, ki je izražen na površini DC, povzroči infekcijo in njihovo migracijo ter prenos patogena iz DC celicam pomagalkam (celice T ali CD4+). Ko patogen vstopi v celico, je zaščiten pred znotrajcelično degradacijo oz. pred litičnim kompleksom. Za načrtovanje in sintezo ligandov oz. inhibitorjev, bi lahko ta sistem vezave patogena in DC-SIGN izkoristili, saj bi lahko le-ti preprečili vezavo DC-SIGN in patogena. Ker bi lahko že na začetku preprečili prenos patogena ter posledično širjenje okužbe in infekcijo limfocitov, ima to za terapijo velik potencial (19,20).

1.5.2. Sintezni ligandi DC-SIGN in njihov terapevtski potencial

Vloga DC-SIGN pri okužbah s patogeni nakazuje zanimiv pristop k razvoju zdravilnih učinkovin. Če oligosaharidi vsebujejo fruktozo ali manozo se ti vežejo z višjo afiniteto, kot pa je afiniteta vezave same fruktoze ali manoze. Na receptorju sta prisotni dve vezavni mesti, ki sta namenjeni za vezavo ligandov, in ti mesti ponavadi izkoriščajo naravni ligandi. Prav to pa se lahko potem izkoristi za sintezo novih ligandov oz. inhibitorjev. Najprej so bili sintetizirani antagonisti, ki so temeljili na manozni osnovi in so bili potem naprej izhodišče za sintezo novih derivatov. Njihova slabost je bila v tem, da je bila njihova afiniteta vezave na DC-SIGN precej nizka. S povečanjem multimernih oblik pa se je povečala njihova učinkovitost oz. so z vezavo na receptorje učinkoviteje preprečili širjenje virusne infekcije. Vezavo sintetiziranih ligandov na DC lahko spremljamo s fluorescenčno spektroskopijo, s tem da se določi afiniteto vezave na celice (izračun IC_{50}). Vloga DC-SIGN pa se lahko proučuje tudi s fluorescentno mikroskopijo (19,20,21).

2. NAMEN DELA

Fluorescenčne sonde so močno orodje v celični biologiji, saj nam s pomočjo fluorescenčne mikroskopije omogočajo vizualizacijo zgradbe in sledenje mnogih procesov znotraj celice, med katere spada tudi merjenje znotrajceličnih sprememb pH. Spojine rodaminskega tipa, ki fluorescirajo v odvisnosti od pH, se zaradi svojih odličnih foto-fizikalnih lastnosti uporabljajo kot reporterski deli različnih označevalcev in sond. Njihova dobra lastnost je tudi, da so načeloma netoksične in prehajajo biološke membrane.

V okviru magistrske naloge bomo ovrednotili foto-fizikalne lastnosti novim spojinam rodaminskega tipa, ki fluorescirajo v odvisnosti od pH, in so uporabne kot molekularna orodja za določanje pH v celičnih organelih s pomočjo fluorescenčne mikro-spetroskopije. Te lastnosti bomo ovrednotili s pomočjo UV/VIS in fluorescenčne spektroskopije.

Izbrali smo tri na novo sintetizirane spojine (**MP-1**, **AAG-12** in **MP-17**), ki sta jih sintetizirala doc. dr. Janez Mravljak in asist. dr. Stane Pajk na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Spojinam bomo v sklopu eksperimentalnega dela posneli njihove absorpcijske in emisijske spektre pri različnih vrednostih pH ter iz dobljenih rezultatov narisali titracijske krivulje. Grafično bomo določili tudi okvirne vrednosti pKa za posamezno spojino.

Radi bi ugotovili, če ima katera izmed analiziranih spojin rodaminskega tipa maksimalno absorbanco in emisijo pri pH vrednosti 4,4 in je zato primerna za označevanje kisljih celičnih struktur (npr. lizosomov).

3. MATERIALI IN EKSPERIMENTALNO DELO

3.1. Materiali

3.1.1. Reagenti

a) Priprava puferskih raztopin:

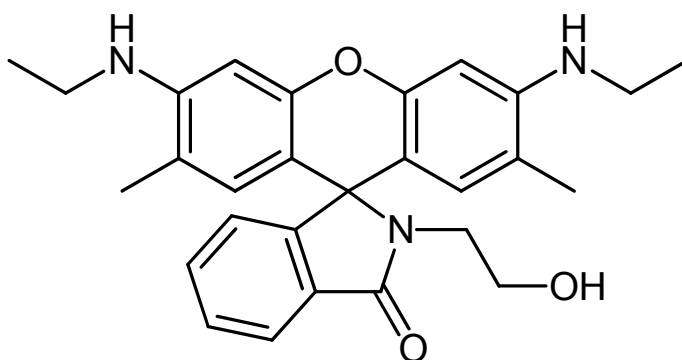
- 0,1 M citronska kislina ($C_6H_8O_7$) ($M = 192,12 \text{ g/mol}$), brezvodna, Sigma Aldrich (Slovaška)
- 0,2 M $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ ($M = 141,98 \text{ g/mol}$), Sigma Aldrich (Slovaška)

b) Topila:

- voda za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivost (HPLC), očiščena z aparatom Millipore (USA)
- dimetilsulfoksid (DMSO), proizvajalca Sigma Aldrich (Slovaška)

c) Nove sintetizirane molekule:

MP-1

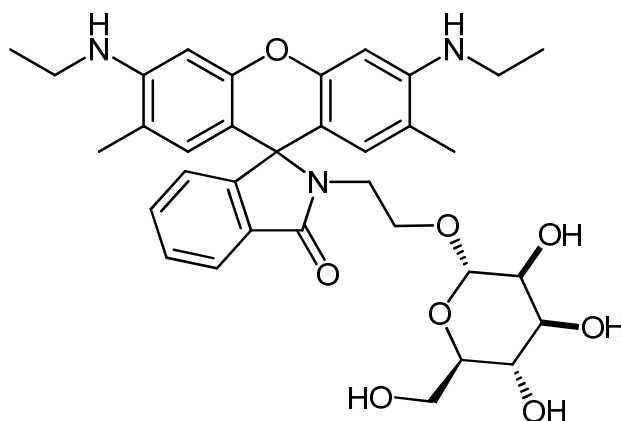


Kemijsko ime:

3',6'-bis(etilamino)-2-(2-hidroksietil)-2',7'-dimetilspiro[izoindolin-1,9'-ksanten]-3-on

Kemijska formula: $C_{28}H_{31}N_3O_3$

Molekulska masa: 457,56 g/mol

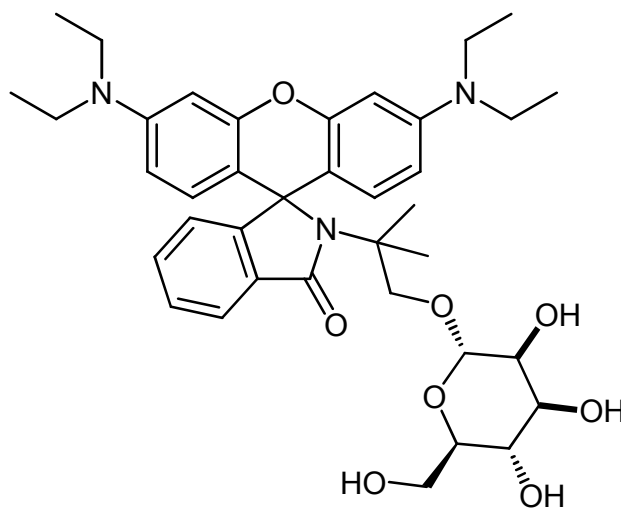
AAG-12

Kemijsko ime:

3',6'-bis(etilamino)-2',7'-dimetil-2-(2-(((2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)oksi)etil)spiro[izoindolin-1,9'-ksanten]-3-on

Kemijska formula: $C_{34}H_{41}N_3O_8$

Molekulska masa: 619,29 g/mol

MP-17

Kemijsko ime:

3',6'-bis(diethylamino)-2-(2-metil-1-(((2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)oksi)propan-2-il)spiro[izoindolin-1,9'-ksanten]-3-on

Kemijska formula: $C_{38}H_{49}N_3O_8$

Molekulska masa: 675,81 g/mol

3.1.2. Oprema

- **Mikropipete (enokanalne)**
100-1000 μL
0,5- 5 mL
0,5-10 mL
Proizvajalca Brand Transferpete $\text{\textcircled{R}}$ (Nemčija) z ustreznimi nastavki
20-100 μL
Proizvajalca Eppendorf $\text{\textcircled{R}}$ (Nemčija) z ustreznimi nastavki

- **Rokavice**
Zaščitne vinil rokavice (Kimberly-Clark)

- **Steklovina**
10 mL penicilinke in ustrezni plastični pokrovčki
100 mL infuzijske steklenice in ustrezni gumijasti zamaški
1 L merilna bučka z zamaškom
1 L erlenmajerica z zamaškom
100 mL merilni valj
50 mL in 100 mL čaša
Kvarčne kivete za UV-vis spektrofotometer in za fluorimeter
posoda za odpad
steklene Pasteurjeve pipete in mešiček za kapalko

3.1.3. Aparature

- Analitska tehtnica Mettler Toledo AG245, Švica
- UV-VIS spektrofotometer Varian 50 Conc, USA
- Fluorimeter ParkinElmer LS 55, UK
- Magnetno mešalo: IKA $\text{\textcircled{R}}$ Werke
- pH meter: Mettler Toledo, MP 220 (1900 Polaris Parkway, Columbus, USA)

- Aparatura za pripravo vode za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti Millipore, USA
- Hladilnik (4⁰ C)

3.2. EKSPERIMENTALNO DELO

Za testiranje smo s izbrali tri na novo sintetizirane spojine **MP-1**, **AAG-12** ter **MP-17**. To so fluorescenčna barvila rodaminskega tipa, odvisna od pH. Čiste spojine se nahajajo v trdnem agregatnem stanju v obliki kristalov ali stabilne pene.

Posneli smo absorpcijske in emisijske spektre pri različnih vrednostih pH.

Stopnje v poteku testiranja spojin:

1. priprava raztopin za pufre in priprava pufrov
2. priprava testnih spojin za testiranje in vzorčne slepe raztopine ali vzorca
3. preverjanje pH vrednosti raztopine
4. inkubacija čez noč
5. merjenje absorbance z UV-VIS spektrofotometrom
6. merjenje fluorescence s fluorescenčnim spektrofotometrom
7. vrednotenje meritev

3.2.1. Priprava pufra: citronska kislina- Na_2HPO_4

V merilni bučki (1 L) smo pripravili 0,1 M raztopino citronske kisline tako, da smo v 50 mL čašo zatehtali 19,21 g citronske kisline. To smo prenesli v merilno bučko in dolili vodo za HPLC do oznake. Pomembno je, da se vsi kristali lepo raztopijo.

V 1 L merilni bučki smo pripravili 0,2 M raztopino Na_2HPO_4 . Prav tako smo v 50 mL čašo zatehtali 28,40 g Na_2HPO_4 ter dolili vodo za HPLC do oznake 1 L. Sama spojina Na_2HPO_4 se počasi raztaplja, zato je bilo potrebno dolgotrajno mešanje. Ko sta bili raztopini pripravljene smo začeli s pripravo pufrov. V primeru, da pufrov nismo potrebovali isti dan, smo pufrske raztopine shranili v hladilnik na 4°C; pred samo uporabo smo jih nato ogreli na sobno temperaturo.

3.2.1.1. Priprava pufrov

Ker smo želeli spojinam posneti absorpcijske in emisijske spektre pri različnih pH vrednostih smo pripravili serijo pufrov s sledečimi pH: 2,6; 3,0; 3,6; 4,0; 4,4; 4,8; 5,2; 5,6; 6,0; 6,6; 7,2 in 7,6.

Pufre smo pripravili v 100 mL merilnem valju po naslednji tabeli. Uporabili smo Sigma Aldrich- evo recepturo (23).

<i>pH</i>	<i>x mL 0,1 M citronske kisline</i>	<i>y mL 0,2 M Na₂HPO₄</i>
2,6	89,10	10,90
3,0	79,45	20,55
3,6	67,80	32,20
4,0	61,45	38,55
4,4	55,90	44,10
4,8	50,70	49,30
5,2	46,40	53,60
5,6	42,00	58,00
6,0	36,85	63,15
6,6	27,25	72,75
7,2	13,05	86,95
7,6	6,35	93,65

x mL 0,1 M raztopine citronske kisline in y mL 0,2 M raztopine Na₂HPO₄ odmerimo z merilnim valjem in iz merilnega valja prelijemo v 100 mL infuzijske steklenice ter pomešamo z magnetnim mešalom, da se raztopini dobro premešata. S počjo pH metra smo preverili pH pufra ter po potrebi dodali kislino oz. bazo, da smo pH uravnali na želeno vrednost pH. pH meter smo predhodno umerili s standardnimi raztopinami po navodilih proizvajalca. Tako pripravljene pufre uporabimo za pripravo testnih spojin ali jih shranimo v hladilniku (na 4°C) ter jih pred ponovno uporabo spet segrejemo na S.T.

3.2.2. Priprava testnih spojin za testiranje

3.3.2.1. Priprava osnovnih raztopin za testiranje

Za vsako testno spojino smo morali pripraviti osnovne koncentracije spojine, ki smo jo nato redčili do želene koncentracije.

a) MP-1

Spojino **MP-1** smo raztopili v DMSO-ju. Pripravili smo osnovno raztopino koncentracije 10^{-3} M (mol/L). Najprej smo s pomočjo formule 1 izračunali potrebno maso spojine, ki je bila približno 2 mg. V označeno penicilinko smo zatehtali približno natančno 2 mg spojine **MP 1**. Nato smo s pomočjo zgornje formule izračunali še potreben volumen DMSO-ja, da smo dobili pravo koncentracijo osnovne raztopine. V penicilinko smo odmerili ustrezen volumen DMSO in pripravili osnovno raztopino z rahlim mešanjem.

Formula 1:
$$C = \frac{n}{V} = \frac{m}{VM^*}$$

(c = koncentracija snovi, n = množina snovi, m = masa, V = volumen, M^* = molska masa).

b) AAG-12

Enako kot za spojino **MP-1** smo pripravili osnovno raztopino **AAG-12** v DMSO-ju. Pripravili smo osnovno raztopino 2×10^{-3} M. Po istem postopku kot za spojino **MP-1** smo s pomočjo zgornje formule izračunali potrebno maso spojine, ki je bila približno 4,5 mg. V označeno penicilinko smo zatehtali približno natančno 4,5 mg spojine **AAG-12**. Nato smo izračunali še potreben volumen DMSO-ja, da smo dobili pravo konc. osnovne raztopine. V penicilinko smo odmerili ustrezen volumen DMSO-ja in pripravili osnovno raztopino z rahlim mešanjem.

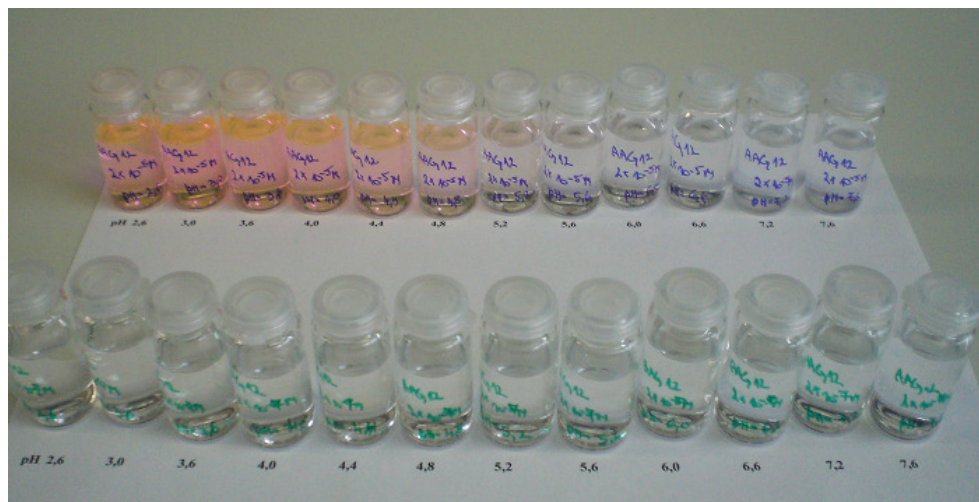
Pri tej spojini smo se odločili, da bomo pripravili še dve raztopini 4×10^{-4} M in 10^{-3} M. Prvo smo pripravili tako, da smo vzeli 1 mL 2×10^{-3} M ter zraven dodali 4 mL DMSO-ja. Drugo pa smo pripravili tako, da smo vzeli 1 mL 2×10^{-3} M osnovne raztopine in dodali 1 mL DMSO-ja.

c) **MP-17**

Tudi pri tej spojini smo pripravili osnovno raztopino, ki smo jo pripravili v DMSO-ju. Na enak način kot zgoraj smo izračunali maso spojine in volumen DMSO-ja, ki smo ju potrebovali. V označeno penicilinko smo zatehtali približno natančno 14 mg spojine **MP 17** ter jo raztopili v ustreznem volumnu DMSO-ja in tako pripravili 2×10^{-3} M osnovno raztopino. Ker smo predvidevali, da se bo spojina obnašala podobno kot zgornja spojina **AAG-12**, smo pripravili isto kot zgoraj še dve dodatni raztopini. Z redčenjem osnovne raztopine smo tako pripravili raztopini 4×10^{-4} M ter 10^{-3} M.

3.3.2.2. Priprava vzorčnih raztopin za testiranje za UV/VIS in fluorescenčno spektroskopijo

Ker smo želeli posneti absorpcijske in emisijske spektre na novo sintetiziranim spojinam, smo morali najprej pripraviti vzorčne raztopine pri ustreznih koncentracijah pH, ki smo jih predhodno pripravili. Tako smo za vsako spojino pripravili dve seriji raztopin v območju pH od 2,6 do 7,6 za UV/VIS in fluorescenčno spektroskopijo (slika 9).



Slika 9: Primer serije vzorčnih raztopin v območju pH-ja od 2,6 do 7,6 za novo spojino **AAG-12**. Zgoraj so vzorčne raztopine za UV/VIS spektroskopijo (konc. 2×10^{-5} M), spodaj pa raztopine za fluorescenčno spektroskopijo (konc. 2×10^{-7} M).

Za UV/VIS spektroskopijo smo potrebovali višjo konc. spojine, za fluorescenčno spektroskopijo pa nižje konc. same spojine.

Konc. spojini, ki smo jih pripravili za UV/VIS spektroskopijo so naslednje:

- **MP-1** konc. 10^{-5} M v vzorčnih raztopinah izbranih pH vrednosti
- **AAG-12** konc. 2×10^{-5} M, 4×10^{-6} M in 10^{-5} M v vzorčnih raztopinah izbranih pH vrednosti
- **MP-17** konc. 2×10^{-5} M, 4×10^{-6} M in 10^{-5} M v vzorčnih raztopinah izbranih pH vrednosti

Konc. spojini, ki smo jih pripravili za fluorescenčno spektroskopijo so naslednje:

- **MP-1** konc. 10^{-7} M vzorčnih raztopinah izbranih pH vrednosti
- **AAG-12** konc. 2×10^{-7} M, 4×10^{-8} M in 10^{-7} M vzorčnih raztopinah izbranih pH vrednosti
- **MP-17** konc. 2×10^{-7} M, 4×10^{-8} M in 10^{-7} M vzorčnih raztopinah izbranih pH vrednosti

Najprej smo na penicilinki označili spojino, ki smo jo testirali, ustrezen pH ter konc. spojine. Ker smo vse testne spojine raztopili v DMSO in v vodi za HPLC, oznaka za topilo ni bila potrebna.

Odločili smo se, da bomo za vse tri na novo sintetizirane spojine za pripravo ustreznih koncentracij uporabili isti protokol. Vzeli smo 100 μ L osnovnih raztopin ter jih redčili v 5000 mL vode za HPLC in 4900 μ L ustreznega pufra, da smo dobili 10 mL vzorčne spojine.

a) Priprava vzorčnih raztopin za spojino MP-1

Najprej smo pripravili serijo raztopin za UV/VIS spektroskopijo konc. 10^{-5} M v pufrnih raztopinah z ustreznimi pH vrednostmi. To smo pripravili na ta način, da smo osnovno raztopino **MP-1** konc. 10^{-3} M 100 -krat redčili do 10 mL po že zgoraj omenjenem protokolu: v čiste in z vsemi podatki označene penicilinke smo odmerili 4900 μ L ustreznega pufra in 5000 μ L vode za HPLC. Tako pripravljene spojine smo premešali s pipetiranjem ter zaprli s plastičnimi zamaški.

Istočasno smo pripravili serijo raztopin za fluorescenčno spektroskopijo. Te raztopine smo pripravili na način, da smo 100 -krat redčili zgornje raztopine, ki smo jih pripravili za

UV/VIS spektroskopijo: prav tako smo v čiste označene penicilinke odmerili 4900 μL ustreznega puфра in 5000 μL vode za HPLC ter 100 μL 10^{-5} M raztopine ustreznega puфра, ki smo jo prej pripravili za UV/VIS spektroskopijo. Pripravljene vzorčne raztopine smo premešali s pipetiranjem in penicilinke zaprli s plastičnimi zamaški.

b) Priprava vzorčnih raztopin za spojino AAG-12

Za to spojino smo prav tako pripravili serijo raztopin za UV/VIS in fluorescenčno spektroskopijo. Tudi tukaj smo na isti način kot pri spojini **MP-1** najprej pripravili serijo raztopin za UV/VIS spektroskopijo v pufernih raztopinah z ustreznimi pH vrednostmi. Pri tej spojini smo se odločili, da bomo iz treh konc. raztopin posneli spektre. Te konc. spojine so bile: 2×10^{-3} M, 4×10^{-4} M in 10^{-3} M. Na enak način kot pri spojini **MP-1** smo vse te tri raztopine 100 -krat redčili do 10 mL po že zgoraj omenjenem protokolu: v čiste in z vsemi podatki označene penicilinke smo odmerili 4900 μL ustreznega puфра in 5000 μL vode za HPLC ter dodali 100 μL ustrezne raztopine. Tako smo dobili tri serije vzorčnih raztopin za UV/VIS spektroskopijo konc. 2×10^{-5} M, 4×10^{-6} M in 10^{-5} M.

Istočasno smo pripravili še raztopine za fluorescenčno spektroskopijo po istem postopku kot smo jih pripravili za spojino **MP1**. Tako smo dobili tri serije vzorčnih raztopin konc. 2×10^{-7} M, 4×10^{-8} M in 10^{-7} M.

Pri tej spojini smo vzorčnim raztopinam pomerili tudi pH. Vrednosti pH vzorčnih raztopin niso bistveno odstopale od pH v pripravljenih pufernih raztopin. Interval odstopanja je bil največ $\pm 0,10$ pH vrednosti od pripravljenega puфра.

Pripravljene vzorčne raztopine smo premešali s pipetiranjem ter penicilinke zaprli s plastičnimi zamaški.

c) Priprava vzorčnih raztopin za spojino MP-17

Tudi za to spojino smo pripravili serijo vzorčenih raztopin za UV/VIS in fluorescenčno spektroskopijo na isti način kot pri zgoraj dveh spojinah **MP-1** in **AAG-12**, najprej serijo v pufernih raztopinah z ustreznimi pH vrednostmi za UV/VIS spektroskopijo. Tudi pri tej spojini smo se odločili, da bomo pripravili serijo treh raztopin. Izbrali smo iste koncentracije kot pri spojini **AAG-12**, ker smo predvidevali, da se bo spojina obnašala podobno kot le-ta. Zato smo tudi za to spojino pripravili naslednje konc. 2×10^{-3} M, $4 \times$

10^{-4} M in 10^{-3} M. Na enak način kot pri zgornjih dveh spojinah smo vse te raztopine 100 - krat redčili do 10 mL po že zgoraj omenjenem protokolu: v čiste in z vsemi podatki označene penicilinke smo odmerili 4900 μ L ustreznega pufra in 5000 μ L vode za HPLC ter dodali 100 μ L zgornje raztopine. Tako smo dobili tri serije vzorčnih raztopin za UV/VIS spektroskopijo konc. 2×10^{-5} M, 4×10^{-6} M in 10^{-5} M.

Istočasno smo pripravili še raztopine za fluorescenčno spektroskopijo po istem protokolu kot pri zgornjih dveh spojinah. Tako smo tudi za to spojino dobili tri serije vzorčnih raztopin konc. 2×10^{-7} M, 4×10^{-8} M in 10^{-7} M.

Pripravljene vzorčne raztopine smo dobro premešali s pipetiranjem ter penicilinke zaprli s plastičnim zamaški.

3.3.2.3. Priprava raztopine vzorčne slepe za spojine MP-1, AAG-12 in MP-17 za UV/VIS spektroskopijo

Hkrati smo pripravili tudi raztopino za vzorčno slepo, ki smo jo potrebovali za odštevanje ozadja (Baseline). To smo pripravili na ta način, da smo si izbrali pufer nekje v sredini naših pH (pH 4,8 ali 5,2) po že zgoraj omenjenem protokolu, le da smo namesto osnovne raztopine dodali DMSO. Prav tako smo v čisto in z vsemi podatki označeno penicelinko odmerili 4900 μ L pufra, 5000 μ L vode za HPLC ter 100 μ L DMSO-ja. Vse sestavine smo dobro premešali s pipetiranjem ter penicelinko zaprli s plastičnim zamaškom.

3.2.3. Inkubacija čez noč

Penicilinke z vzorčnimi raztopinami in vzorčno slepo raztopino smo postavili v temen prostor in pustili stati čez noč, da smo dosegli ravnovesje.

Ravnovesje je vzpostavljeno takrat, »ko se v vzorčni raztopini razmerje koncentracij med spojino z odprtim obročem = planarna oblika = konjugirana oblika in spojino v spiro povezavi ne spreminja več« (Stopar, 2012, str. 17). Ta vzpostavitev ravnotežja, je bila dokazana eksperimentalno. Vzorčne raztopine so bile pomerjene z UV/VIS spektrofotometrom in ugotovljeno je bilo, da se to ravnovesje vzpostavi čez en dan od priprave vzorčnih raztopin (24).

3.2.4. Merjenje absorbanca z UV/VIS spektrofotometrom

Absorpcijske spektre smo našim na novo sintetiziranim spojinam posneti z UV/VIS spektrofotometrom Varian 50 Conc (10), ki se nahaja na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko kemijo.

Kot vir svetlobe ta spektrofotometer uporablja ksenonsko žarnico z dolgo življenjsko dobo. Ima široko območje merjenja, saj lahko merimo v območju od 190 do 1100 nm valovne dolžine. Vgrajen ima fotodiodni detektor (Diode array detektor), ki pretvori optični signal v merljiv električni signal (25).



Slika 10: UV/VIS spektrofotometrom Varian 50 Conc, s pomočjo katerega smo našim spojinam izmerili absorpcijske spektre.

Opis analiznega postopka:

- Pred samim začetkom merjenja smo prižgali aparat in v program vstopili z ustreznim geslom.
- Ko smo prišli v program, smo najprej morali nastaviti območje merjenja, v katerem bomo pomerili najprej slepo nato pa še vzorčne raztopine. V našem primeru smo izbrali interval valovnih dolžin od 300-700 nm.
- Čisto in popolnoma osušeno kiveto smo s stekleno Pasteurjevo pipeto najprej malo sprali z vzorčno slepo raztopino, nato pa le-to odmerili v sprano kiveto. Pred samim

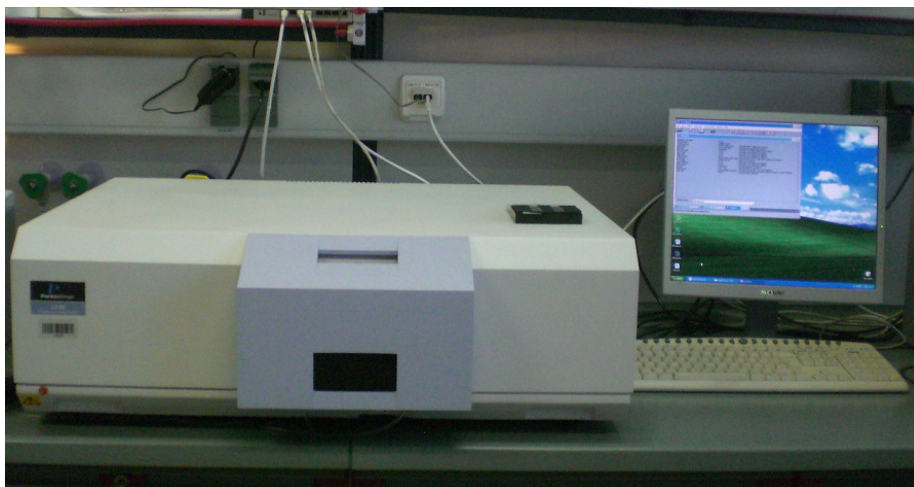
merjenjem vzorčnih raztopin smo pomerili vzorčno slepo raztopino (Baseline). To meritev smo potrebovali, ker je aparat odštel ozadje.

- Pred samo vstavitvijo kivete v aparat, smo preverili čistost kivete in po potrebi zunanji steni obrisali s papirjem. Površina kivete, kjer je potovala svetloba, je morali biti ravna in ne peskana, ker bi to motilo pri sami meritvi.
- Ko smo posneli vzorčno slepo, smo lahko pričeli z meritvijo vzorčnih raztopin. Tudi pri merjenju vzorčnih raztopin smo na enak način kot pri vzorčni slepi najprej malo sprali kiveto in šele nato napolnili z vzorčno raztopino. Serijo vseh 12 -tih vzorčnih raztopin smo pomerili na enak način. Najprej smo začeli z meritvijo pri pH 2,6 in nadaljevali navzgor in končali s pH 7,6.
- Za vsako vzorčno spojino smo dobili ustrezne grafe, ki smo jih shranili v izbrano mapo na računalniku.

3.2.5. Merjenje fluorescence s fluorescenčnim spektrofotometrom

Emisijske spektre smo spojinam posneli z uporabo fluorescenčnega spektrofotometra ParkinElmer LS 55 na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko kemijo.

Spektrofluorometer ParkinElmer LS 55 ponuja veliko fleksibilnost, prilagodljivost, zanesljivost in preprostost uporabe. Omogoča natančne meritve fluorescence, fotofluorescence, kemi- in bio-luminiscence. Kot vir ekscitacijske svetlobe uporablja pulzno ksenonsko žarnico, kar pripomore k temu, da se bistveno zmanjša fotokemični razpad fluoroforov. Ima štiri mesta v katera se lahko vstavijo kivete, kar pa pripomore k hitrejšemu merjenju vzorcev. Ena izmed njegovih prednosti je tudi v tem, da je držalo za kivete termostatorano, kar pa je pogoj za natančnost meritev. Opremljen je še z dodatno fotopomnoževalko, ki je občutljiva v rdečem območju do 900 nm (26,27).



Slika 11: Fluorescenčni spektrofotometer ParkinElmer LS 55, s katerim smo spojnam MP-1, AAG-12 in MP-17 posneli emisijske spektre.

Opis analiznega postopka:

- Najprej prižgemo računalnik in vstopimo v program z ustreznimi gesli.
- Nato prižgemo še fluorescenčni spektrofotometer, ki se ogreva približno 20 minut, da je pripravljen za meritve.
- Vstopimo v program FL WIN LAB, kjer v meniju Sampling Accesory določimo pozicijo kivete z vzorcem.
- V meniju Sampling Application izberemo Set up Emission in definiramo metodo, pri kateri bomo ob meritvi dosegli optimalno razmerje med signalom in šumom.
- Pomembno je tudi, kje se bodo shranjevali podatki, zato si moramo narediti še mapo, v katero bomo podatke shranjevali.
- Čisto in popolnoma osušeno kiveto smo s stekleno Pasteurjevo pipeto najprej malo sprali z vzorčno raztopino, nato pa z le-to napolnili sprano kiveto.
- Zunanje površine kivete smo pred samo vstavitvijo v aparat dobro obrisali z ustrežno papirno brisačo (pomembno je bilo, da so bile dobro obrisane vse 4 stani kivete, ker bi drugače motilo pri sami meritvi)
- Pomerili smo fluorescenco.
- Vso serijo 12 vzorčnih raztopin smo pomerili na enak način.
- Za vsako vzorčno spojino smo dobili ustrezne grafe, ki smo jih shranili v izbrano mapo na računalniku.

3.2.6. Vrednotenje meritev

Za analizo rezultatov smo uporabili računalniški program Microsoft Excel (Microsoft, ZDA), s pomočjo katerega smo rezultate prikazali grafično. Narisali smo absorpcijske in emisijske spektre, izdelali titracijske krivulje ter določiti okvirne vrednosti pK_a za posamezno spojino. Pri tistih spojinah, ki so dosegle maksimalno fluorescenco, smo njihove vrednosti absorbance in fluorescence spremenili v normalizirane vrednosti (interval od 0 do 1) in na grafu primerjali absorpcijske z emisijskimi spektri. Prav tako smo določili tudi vrednosti valovnih dolžin, kjer je bila fluorescenca za posamezno spojino največja.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati meritev z UV/VIS spektroskopijo

Za vse tri na novo sintetizirane spojine smo uporabili enak protokol, zato lahko te spojine primerjamo med sabo. Za spojino **MP-1** smo uporabili samo eno konc. 10^{-5} M, za spojini **AAG-12** in **MP-17** pa tri konc. 2×10^{-5} M, 4×10^{-6} M in 10^{-5} M.

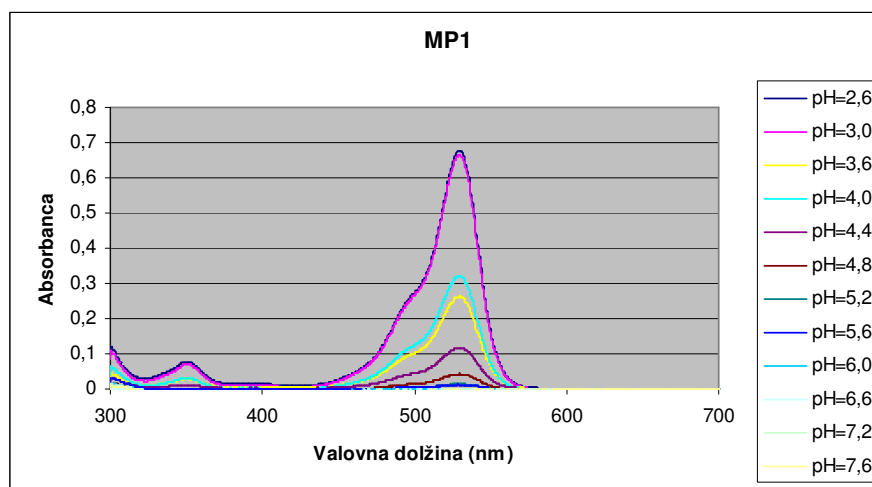
Pri vseh treh spojinah lahko trdimo, da je bilo doseženo ravnovesje med spiro in planarno obliko. Planarne oblike naših vzorčnih raztopin so obarvane lepo rožnato, kar lahko vidimo tudi s prostim očesom in te v vidnem območju lepo absorbirajo. Sprememba strukture iz spiro v planarno obliko pa je odvisna od pH (slika 7).

Vsi absorpcijski spektri v vidnem delu prikazujejo odvisnost analiziranih fluorescentnih spojin rodaminskega tipa od pH vrednosti.

Položaj maksimuma absorpcijskih spektrov (λ_{\max}) je pri vseh vrednostih pH in pri vseh koncentracijah enak, kar pomeni, da se ne spreminja s spremembo pH ali koncentracije.

Pri vseh grafih je na x-osi prikazana valovna dolžina v nm, na y-osi pa izmerjena vrednost absorbance. Posamezne krivulje na grafu pa prikazujejo spektre vzorčnih raztopin pri različnih pH.

4.1.1. Absorpcijski spektri spojine MP-1



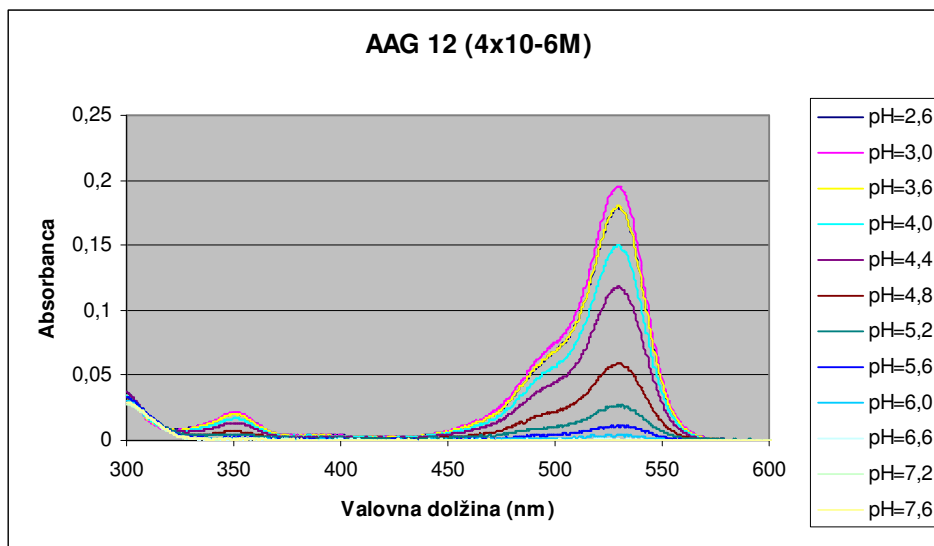
Graf 1: Absorpcijski spektri 1×10^{-5} M vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa **MP-1** pri različnih pH.

Spojina **MP-1** ima glede na posnete absorpcijske spektre najvišjo vrednost pri pH 2,6. Pri višjih pH pa vrednosti absorbance padajo. λ_{\max} je pri spojini **MP-1** 529,1 nm in njena vrednost se glede na različne vrednosti pH ali koncentracije ne spreminja in ostaja ista.

4.1.2. Rezultati za spojino AAG-12

Pri tej spojini smo se odločili, da bomo pomerili absorpcijske spektre pri različnih konc. osnovne raztopine. Iz treh raztopin: 2×10^{-3} M, 4×10^{-4} M in 10^{-3} M smo pripravili: 2×10^{-5} M, 4×10^{-6} M in 10^{-5} M ter pri izbranih pH posneli njihove absorpcijske spektre.

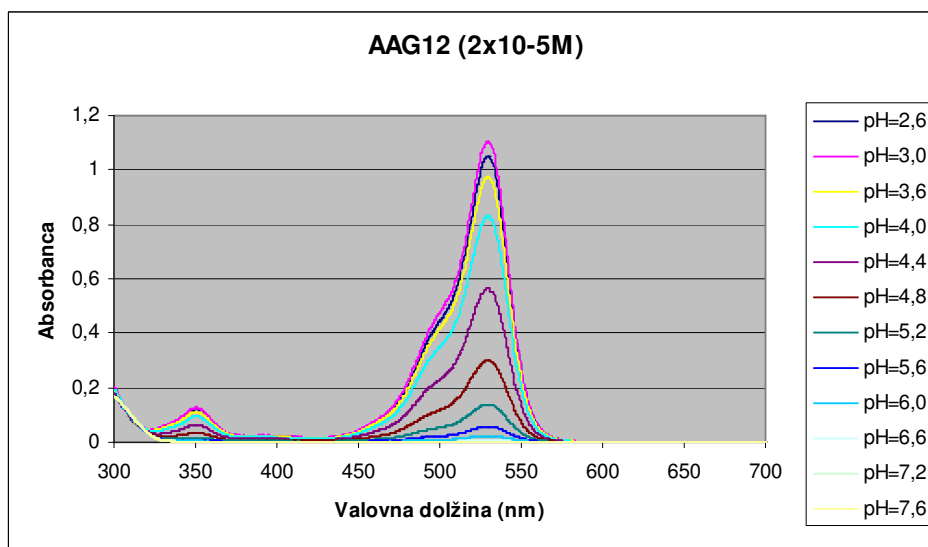
4.1.2.1. Absorpcijski spektri spojine AAG-12 (konc. 4×10^{-6} M)



Graf 2: Absorpcijski spektri 4×10^{-6} M vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa AAG-12 pri različnih pH.

Spojina AAG-12 (konc. 4×10^{-6} M) ima glede na posnete absorpcijske spektre najvišjo vrednost pri pH 3,0. Pri višjih in nižjih pH pa vrednosti absorbance pada. λ_{\max} za to spojino je 529,0 nm in je prav tako enaka za vse pH.

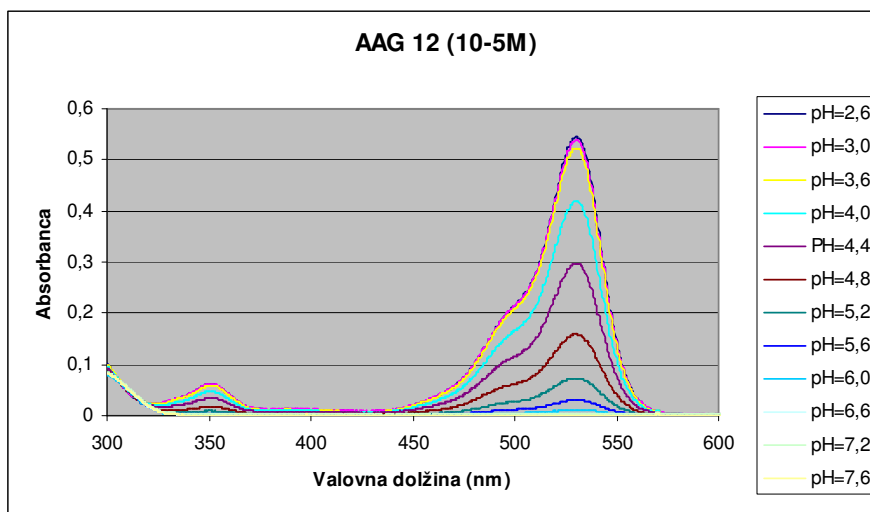
4.1.2.2. Absorpcijski spektri spojine AAG-12 (konc. 2×10^{-5} M)



Graf 3 : Absorpcijski spektri 2×10^{-5} M vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa AAG-12 pri različnih pH.

Pri spojini smo pričakovali podobne rezultate kot pri zgornjih spektrih (konc. 4×10^{-6} M). Tudi tukaj ima najvišjo vrednost glede na posnete absorpcijske spektre spekter posnet pri pH 3,0. Pri ostalih pH pa je vrednost absorbance nižja, tako kot smo pričakovali. Pri valovni dolžini 529,0 nm je λ_{\max} in prav tako velja za vse spektre ne glede na vrednost pH.

4.1.2.3. Absorpcijski spektri spojine AAG-12 (10^{-5} M)



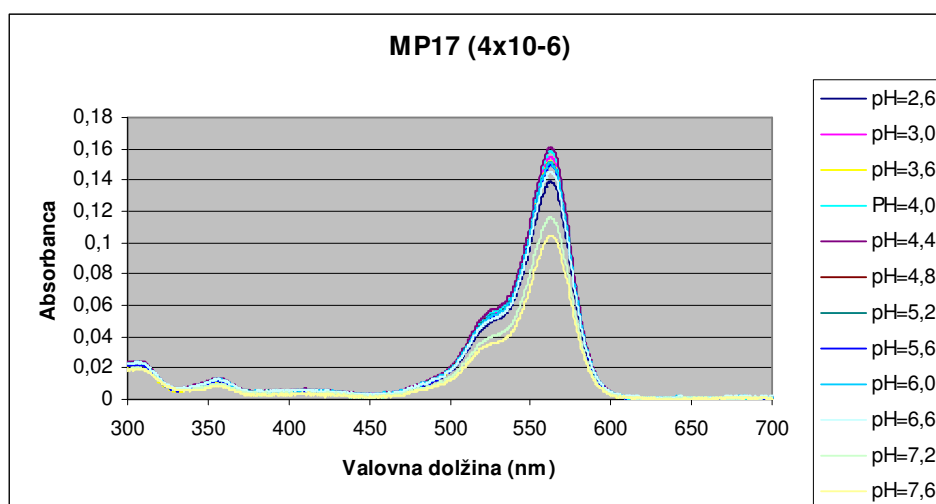
Graf 4: Absorpcijski spektri 10^{-5} M vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa AAG-12 pri različnih pH.

Tudi pri tej spojini smo pričakovali podobne spektre kot pri zgornjih konc.. Pri tej spojini pa smo najvišjo vrednost glede na posnete absorpcijske spektre dobili pri spektru, posnetem pri vrednosti pH 2,6. Pri ostalih vrednostih pH pa so vrednosti nižje od te absorbance. λ_{\max} je pri valovni dolžini 529,0 nm in prav tako velja tudi za vse ostale pH.

4.1.3. Rezultati za spojino MP-17

Tudi pri tej spojini smo se odločili, da bomo pomerili absorpcijske spektre pri različnih konc. osnovne raztopine. Iz treh raztopin: 2×10^{-3} M, 4×10^{-4} M in 10^{-3} M smo pripravili: 2×10^{-5} M, 4×10^{-6} M in 10^{-5} M ter pri izbranih pH posneli njihove absorpcijske spektre. Za te konc. smo se odločili, ker smo pričakovali isti odziv kot pri spojini **AAG-12**.

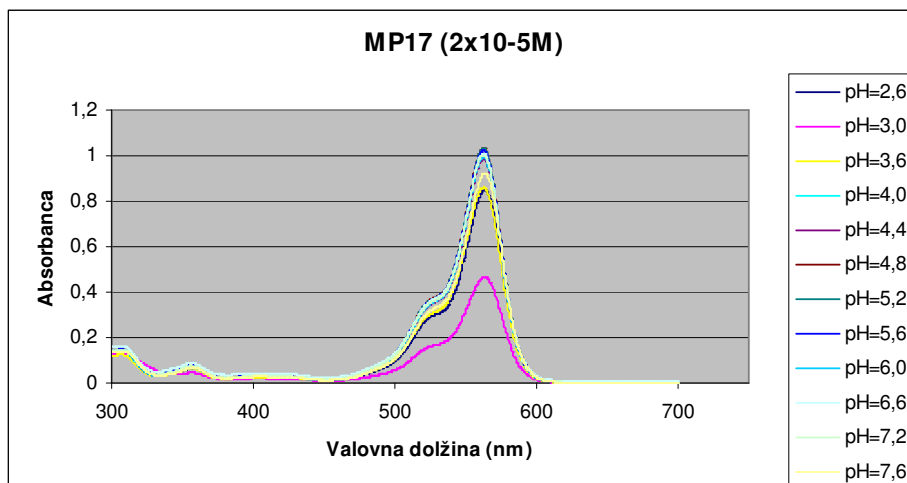
4.1.3.1. Absorpcijski spektri spojine MP-17 (konc. 4×10^{-6} M)



Graf 5: Absorpcijski spektri 4×10^{-6} M vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa **MP-17** pri različnih pH.

Glede na posnete absorpcijske spektre ima spojina največjo absorbanco pri pH 4,4. Pri višjih in nižjih pH pa je vrednost absorbanca nižja. λ_{max} je pri valovni dolžini 562,0 nm in prav tako velja tudi za vse ostale pH.

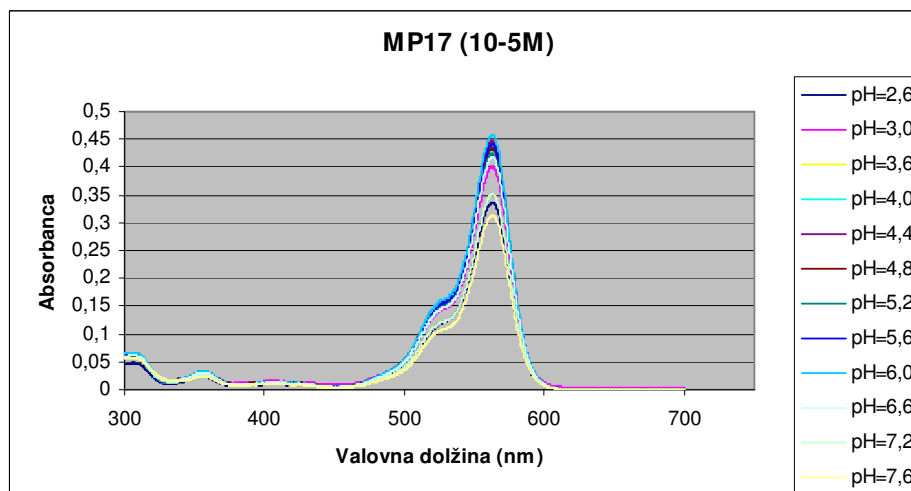
4.1.3.2. Absorpcijski spektri spojine MP-17 (konc. $2 \times 10^{-5} M$)



Graf 6: Absorpcijski spektri $2 \times 10^{-5} M$ vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa **MP-17** pri različnih pH.

Tudi pri tej konc. $2 \times 10^{-5} M$ smo pričakovali podobne spektre kot pri zgornjih konc.. Pri tej spojini pa smo najvišjo vrednost glede na posnete absorpcijske spektre izmerili pri spektru, posnetem pri vrednosti pH 4,8. Pri ostalih vrednostih pH pa so vrednosti nižje od te absorbance. λ_{\max} je pri valovni dolžini 562,0 nm in prav tako velja tudi za vse ostale pH.

4.1.3.3. Absorpcijski spektri spojine MP-17(konc. $10^{-5} M$)



Graf 7: Absorpcijski spektri $10^{-5} M$ vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa **MP-17** pri različnih pH.

Tudi pri tej konc. 10^{-5} M smo pričakovali podoben odziv kot pri zgornjih dveh konc. te spojine **MP-17**. Spojina **MP-17** (konc. 10^{-5} M) ima glede na posnete absorpcijske spektre najvišjo vrednost pri pH 6,0. Pri višjih in nižjih pH pa vrednosti absorbance pada. λ_{\max} za to spojino je 562,0 nm in je prav tako enaka za vse pH.

4.2. Rezultati fluorescentne spektroskopije

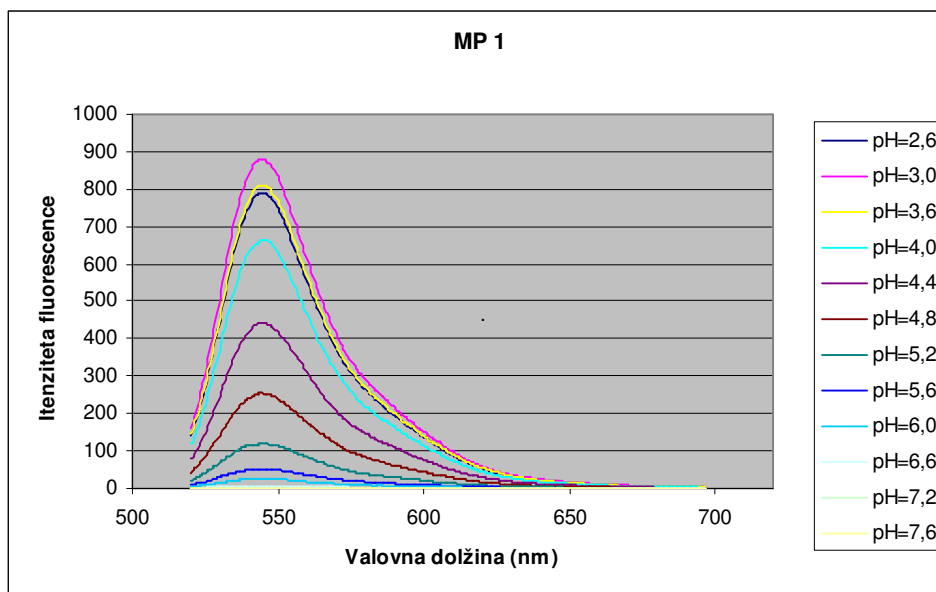
Spojina **MP-1**, **AAG-12** in **MP-17**, ki smo jim predhodno posneli absorpcijske spektre, smo posneli tudi spektre s fluorescentno spektroskopijo.

Enako kot pri UV/VIS spektroskopiji smo za spojino **MP-1** izbrali eno konc. 10^{-7} M, za spojini **AAG-12** in **MP-17** pa tri konc. 2×10^{-7} M, 4×10^{-8} M in 10^{-7} M.

Iz spodnjih grafov fluorescentne spektroskopije lahko ugotovimo, da je doseženo ravnovesje med spiro in konjugirano obliko v vzorčnih raztopinah. pH vzorčne raztopine je pomemben pri tem ravnotežju, saj je od njega odvisno, kam je le-to pomaknjeno. Ker smo osnovne raztopine redčili, je barva konjugirane oblike težko vidna s prostim očesom, saj so bile te spojine, ko fluorescirajo, nežno rožnato obarvane. Opazili smo tudi, da je pri vseh treh spojinah fluorescenca blizu nevtralnega območja skoraj ničelna. Vsi emisijski spektri prikazujejo odvisnost jakosti fluorescence za novo sintetizirane spojine od pH vrednosti.

Tudi pri fluorescentni spektroskopiji smo ugotovili, da je λ_{\max} (položaj maksimuma emisijskega spektra) analiziranih spojin prav tako pri vseh merjenih vrednostih pH enak in se ne spreminja s spremembo pH.

4.2.1. Emisijski spektri spojine MP-1



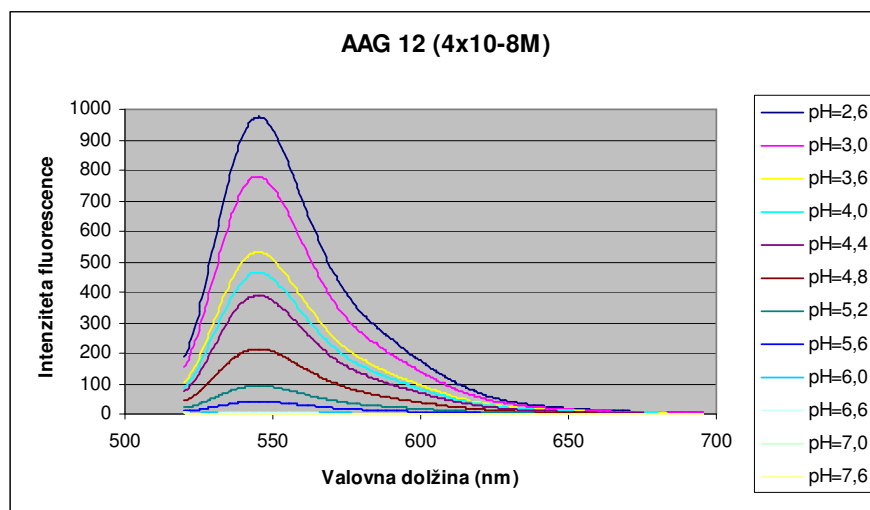
Graf 8: Emisijski spektri 1×10^{-7} M vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa **MP-1** pri različnih pH vrednostih (ekscitacija pri 510 nm).

Največjo jakost fluorescence nakazuje spojina **MP-1** pri pH 3,0. Pri ostalih pH vrednost fluorescence pada. λ_{max} emisijskega spektra za spojino **MP-1** je pri vseh analiziranih pH enaka 545,5 nm.

4.2.2. Rezultati meritev za spojino AAG-12

Pri tej spojini smo se odločili, da bomo pomerili emisijske spektre pri treh različnih konc. raztopine. Iz treh raztopin: 2×10^{-3} M, 4×10^{-4} M in 10^{-3} M smo pripravili: 2×10^{-7} M, 4×10^{-8} M in 10^{-7} M ter pri izbranih pH posneli njihove spektre.

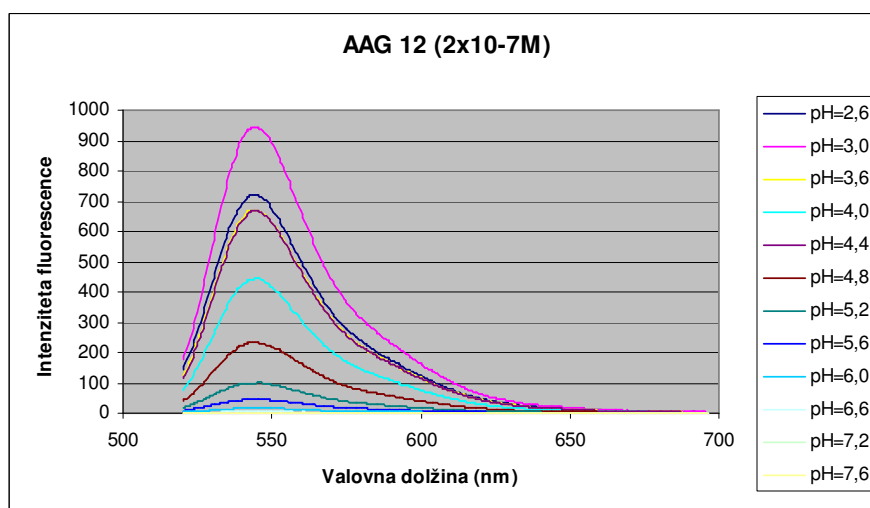
4.2.2.1. Emisijski spektri spojine AAG-12 (konc. $4 \times 10^{-8} M$)



Graf 9: Emisijski spektri $4 \times 10^{-8} M$ vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa AAG-12 pri različnih pH vrednostih (ekscitacija pri 510 nm).

Spojina AAG-12 (konc. $4 \times 10^{-8} M$) izkazuje največjo jakost fluorescence pri pH 2,6. Pri ostalih vrednostih pH pa vrednosti fluorescence padajo. Pri valovni dolžini 546,5 nm je λ_{\max} emisijskega spektra za to spojino. Tudi pri tej spojini je λ_{\max} ekscitacijskega spektra enaka pri vseh danih pH.

4.2.2.2. Emisijski spektri spojine AAG-12 (konc. $2 \times 10^{-7} M$)

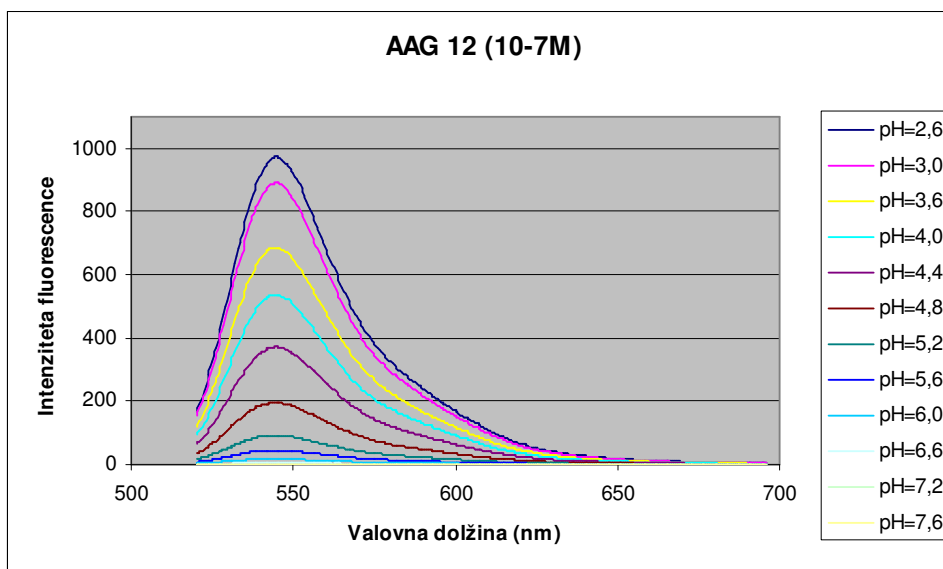


Graf 10: Emisijski spektri $2 \times 10^{-7} M$ vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa AAG-12 pri različnih pH vrednostih (ekscitacija pri 510 nm).

Pri konc. 2×10^{-7} M smo pričakovali podoben odziv, kot pri zgoraj izmerjenih ekscitacijskih spektrih, ki smo jih izmerili pri konc. 4×10^{-8} M. Pri pH 3,0 spojina izkazuje najvišjo vrednost fluorescence, pri ostalih pH pa vrednosti fluorescence padajo.

λ_{\max} emisijskega spektra za to spojino je 546,5 nm in se s spremembo pH ne spreminja.

4.2.2.3. Emisijski spektri spojine AAG-12 (konc. 10^{-7} M)



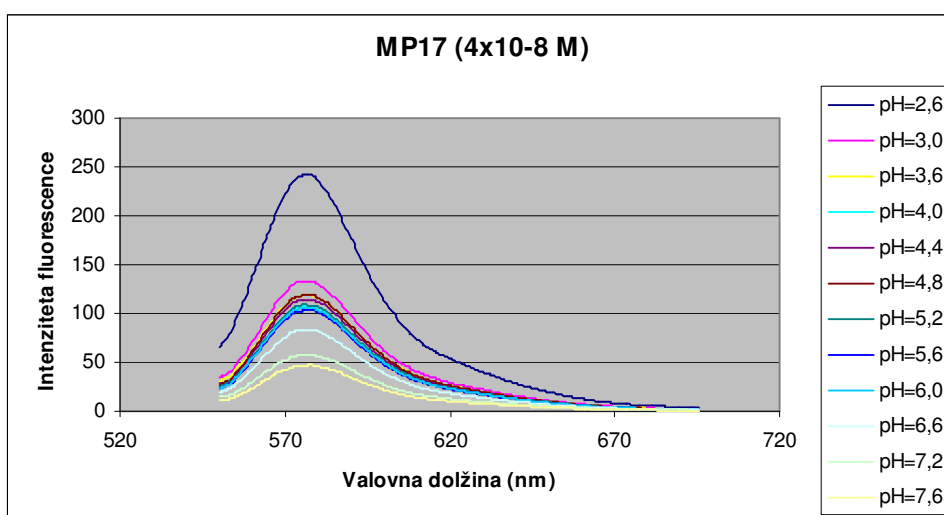
Graf 11: Emisijski spektri 10^{-7} M vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa AAG-12 pri različnih pH vrednostih (ekscitacija pri 510 nm).

Pri pH 2,6 spojina izkazuje najvišjo vrednost fluorescence, pri ostalih pH pa vrednosti fluorescence padajo. λ_{\max} emisijskega spektra za to spojino je 546,5 nm in se s spremembo pH ne spreminja.

4.2.3. Rezultati meritev za spojino MP-17

Tudi pri tej spojini smo se odločili, da bomo pomerili emisijske spektre pri različnih konc. Iz treh raztopin v DMSO: 2×10^{-3} M, 4×10^{-4} M in 10^{-3} M smo pripravili: 2×10^{-7} M, 4×10^{-8} M in 10^{-7} M ter pri izbranih pH posneli njihove absorpcijske in emisijske spektre. Za te konc. smo se odločili, ker smo pričakovali isti odziv kot pri spojini **AAG-12**.

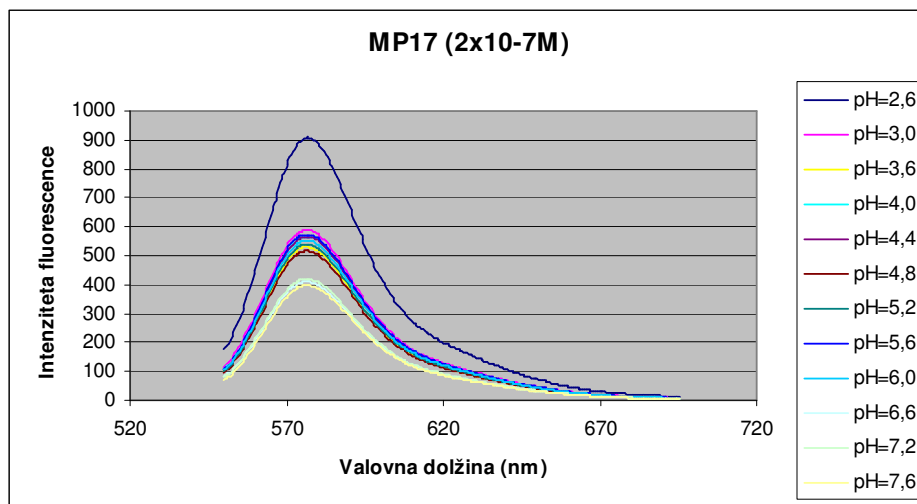
4.2.3.1. Emisijski spektri spojine MP-17 (konc. 4×10^{-8} M)



Graf 12: Emisijski spektri 4×10^{-8} M vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa **MP-17** pri različnih pH vrednostih (ekscitacija pri 540 nm).

Iz zgornjega grafa lahko vidimo, da pri pH 2,6 spojina izkazuje največjo fluorescenco, pri ostalih pH pa vrednosti le-te padajo oz. so nižje. λ_{\max} emisijskega spektra za to spojino je 578,0 nm in se s spremembo pH ne spreminja.

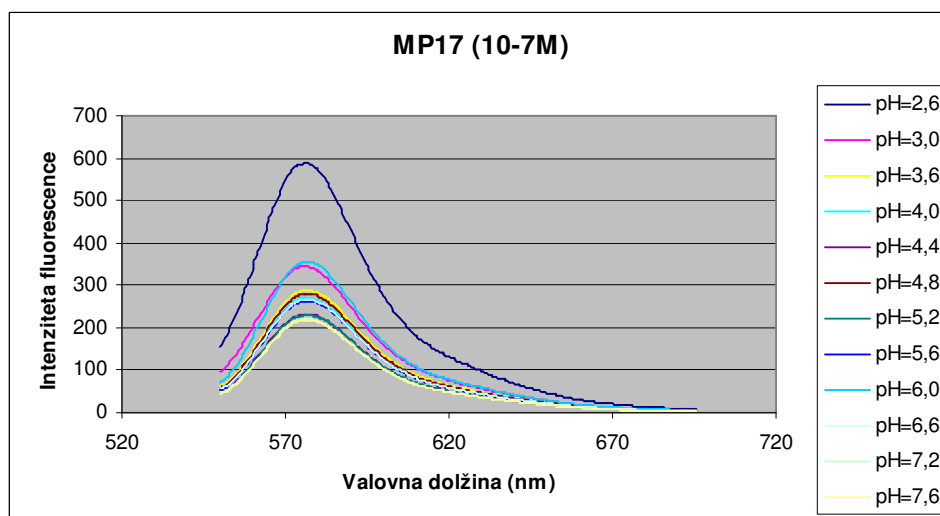
4.2.3.2. Emisijski spektri spojine MP-17 (konc. $2 \times 10^{-7} M$)



Graf 13: Emisijski spektri $2 \times 10^{-7} M$ vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa MP-17 pri različnih pH vrednostih (ekscitacija pri 540 nm).

Tudi pri tej koncentraciji, kot smo pričakovali, največjo fluorescenco opazimo pri pH 2,6. λ_{\max} emisijskega spektra za to spojino je 578,0 nm in se s spremembo pH ne spreminja.

4.2.3.3. Emisijski spektri spojine MP-17 ($10^{-7} M$)



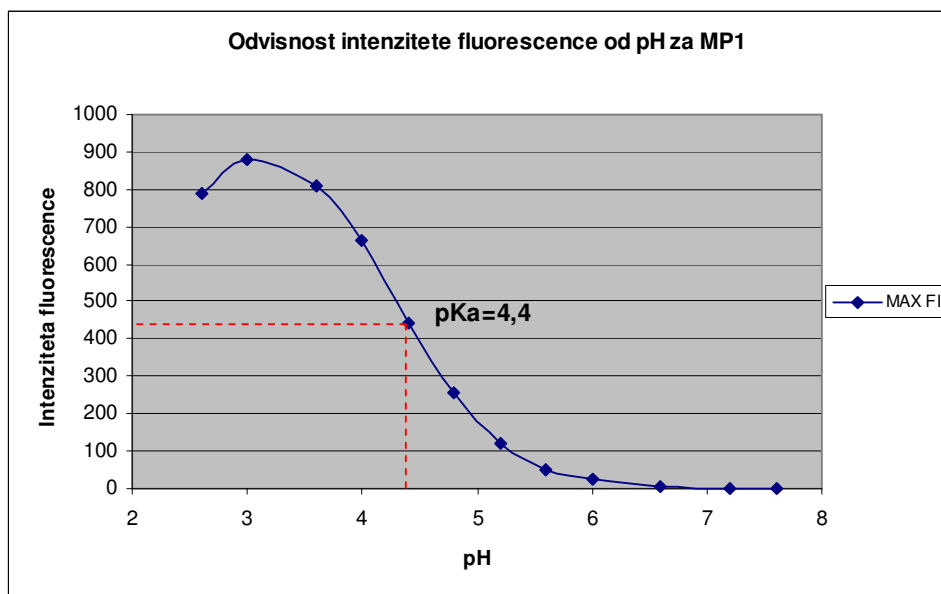
Graf 14: Emisijski spektri $10^{-7} M$ vzorčnih raztopin fluorescentne spojine rodaminskega tipa MP-17 pri različnih pH vrednostih (ekscitacija pri 540 nm).

Tudi pri tej konc. spojine 10^{-7} M smo izmerili najvišjo fluorescenco pri vrednosti pH 2,6. Pri višjih vrednostih pH pa vrednosti jakosti fluorescence padajo. 578,0 nm je vrednost λ_{\max} emisijskega spektra in se prav tako s spremembo pH ne spreminja.

4.3. Titracijske krivulje fluorescentnih spojin rodaminskega tipa

Namen titracijskih krivulj je, da nam pokažejo intenziteto fluorescence v odvisnosti od pH. Na krivuljah smo grafično določili vrednosti pK_a in ta točka predstavlja le njeno okvirno vrednot. To smo določili na način, da smo določili polovično vednost med spodnjim in zgornjim platojem in ta točka je vrednost pK_a. pK_a ustreza pH takrat, ko je koncentracija spiro oblike enaka koncentraciji konjugirane oblike, kar narekuje Henderson-Hasselbachova enačba.

4.3.1. Titracijske krivulje za spojino MP-1



Graf 15: Titracijska krivulja za spojino MP-1.

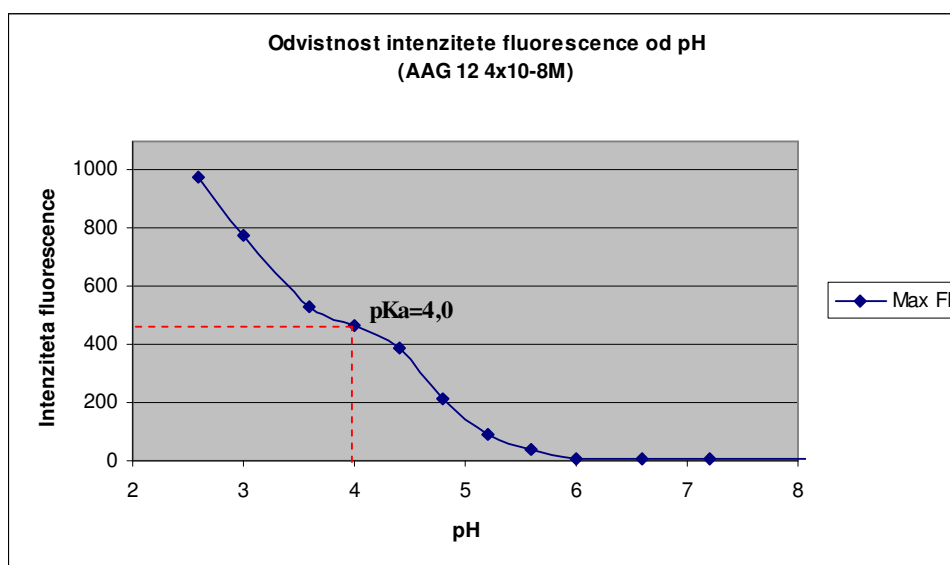
Iz grafa št. 15 lahko lepo vidimo, da ima krivulja sigmoidno obliko, ter da je dosežen spodnji in zgornji plato. Izrazit preskok ima spojina med pH vrednostjo 5,0 in 3,0, kar se je opazilo tudi v preskoku obarvanosti. To za označevanje celičnih organelov (lizosomov) ni

ugodno, saj je prenizko. Najvišjo fluorescenco ima spojina pri pH 3,0. Okvirna vrednost pK_a za spojino MP-1 je 4,4.

4.3.2. Titracijska krivulja za spojino AAG-12

Pri spojini AAG-12 smo izrisali tri titracijske krivulje, saj smo vrednosti fluorescence pomerili pri treh različnih vrednostih konc. te spojine (2×10^{-7} M, 4×10^{-8} M in 10^{-7} M) pri izbranih pH. Pričakujemo podobne rezultate vseh treh konc. te spojine.

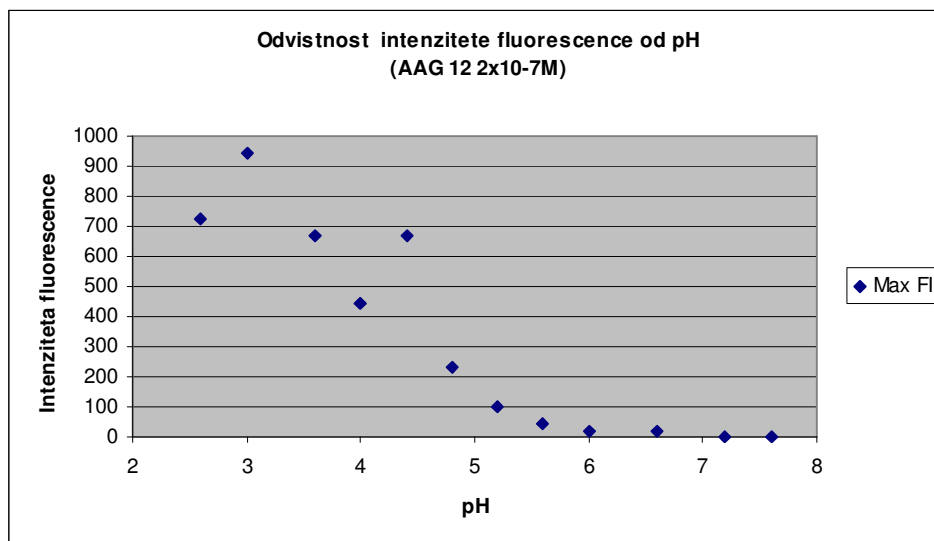
4.3.2.1. Titracijska krivulja za spojino AAG 12 (4×10^{-8} M)



Graf 16: Titracijska krivulja za spojino AAG-12 (4×10^{-8} M).

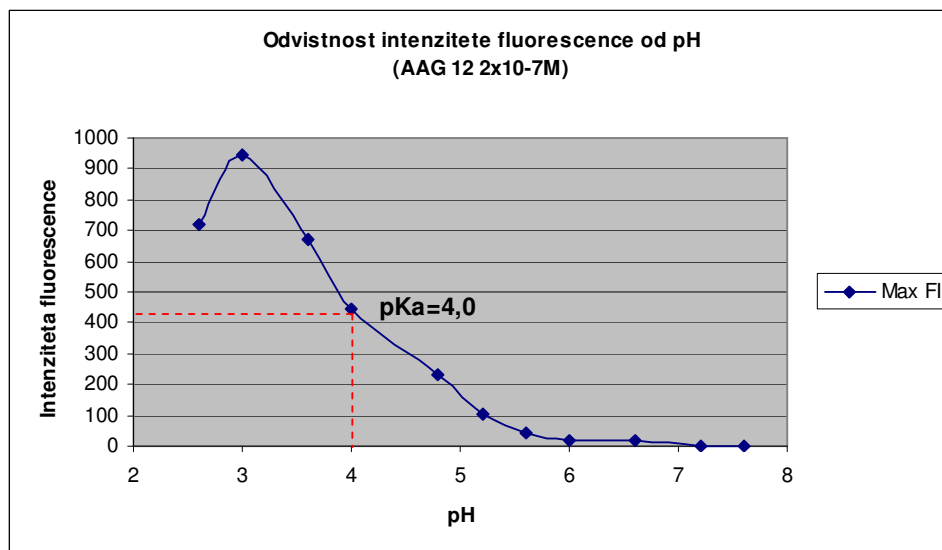
Titracijska krivulja nima tipične sigmoidne oblike, spodnji plato je lepo viden, zgornji pa ne. Spojina ima izrazit preskok v obarvanosti med pH 5,0 in 2,6. Tudi ta spojina ima za označevanje lizosomov prenizek preskok v pH. Najvišjo fluorescenco smo izmerili pri vrednosti pH 2,6, okvirna določitev vrednosti pK_a 4,0.

4.3.2.2. Titracijska krivulja za spojino AAG-12 ($2 \times 10^{-7} M$)



Graf 17: Titracijska krivulja za spojino AAG-12 ($2 \times 10^{-7} M$).

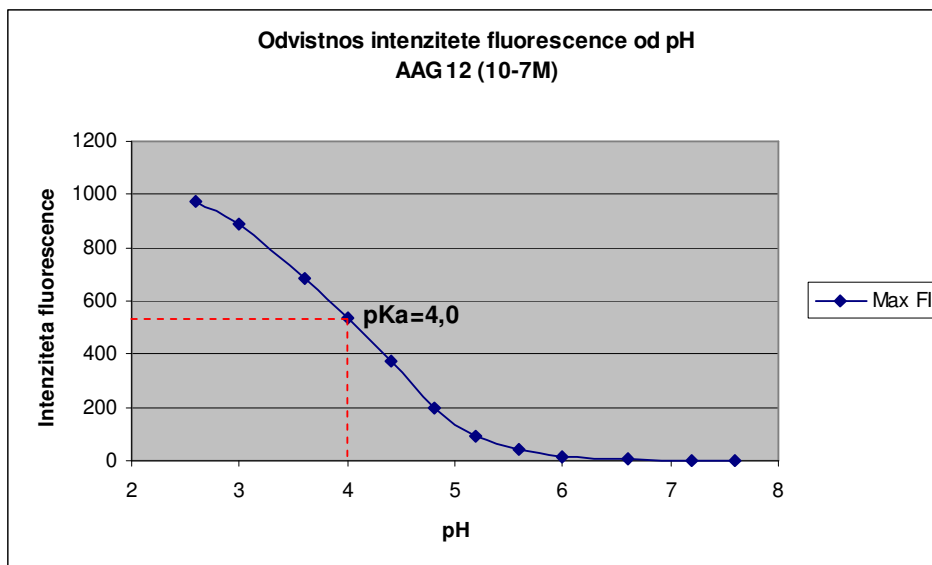
Pri grafu 17 nismo narisali titracijske krivulje, saj točka pri pH 4,4 odstopa od ostalih točk na grafu. To odstopanje je po vsej verjetnosti napaka pri samem eksperimentalnem delu. Odločili smo se, da to točko spustimo in narišemo titracijsko krivuljo brez le-te.



Graf 18: Titracijska krivulja za spojino AAG-12 ($2 \times 10^{-7} M$) z izpuščeno točko pri pH 4,4. Titracijska krivulja ima sigmoidno obliko, lepo je viden spodnji plato in maksimum. Izrazit preskok ima spojina med vrednostjo pH 5,0 in 3,0, kar je za označevanje celičnih

lizosomov prenizko. Določili smo tudi okvirno vrednost pKa, ki je za to spojino te konc. 4,0. Najvišjo vrednost fluorescence smo izmerili pri pH 3,0.

4.3.2.3. Titracijska krivulja za spojino AAG-12 (konc. 10^{-7} M)



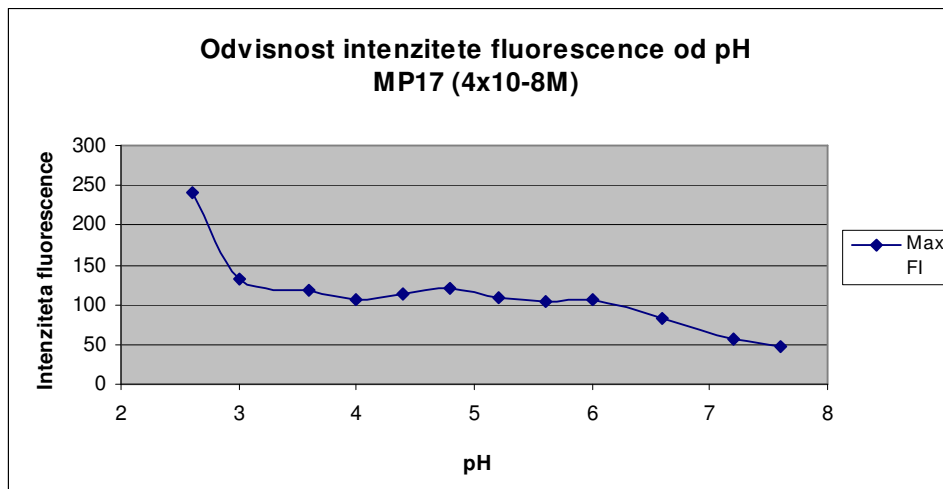
Graf 19: Titracijska krivulja za spojino AAG-12 (konc. 10^{-7} M).

Na grafu je lepo vidno, da titracijska krivulja nima tipične sigmoidne oblike. Spodnji plato je lepo viden, za zgornjega pa ne moremo zanesljivo trditi. Preskok barve smo opazili med pH 5,0 in 3,0. Najvišjo fluorescenco smo izmerili pri pH 2,6. Določili smo tudi okvirno točko pKa, ki je bila pri pH 4,0, prav tako kot pri zgornjih dveh konc. (2×10^{-7} M in 4×10^{-8} M).

4.3.2. Titracijska krivulja za spojino MP-17

Tudi pri tej spojini smo se odločili, da bi narisali tri titracijske krivulje, saj smo vrednosti fluorescence pomerili pri treh različnih vrednostih konc. te spojine (2×10^{-7} M, 4×10^{-8} M in 10^{-7} M) pri izbranih pH. Pričakujemo podobne rezultate pri vseh treh koncentracijah te spojine.

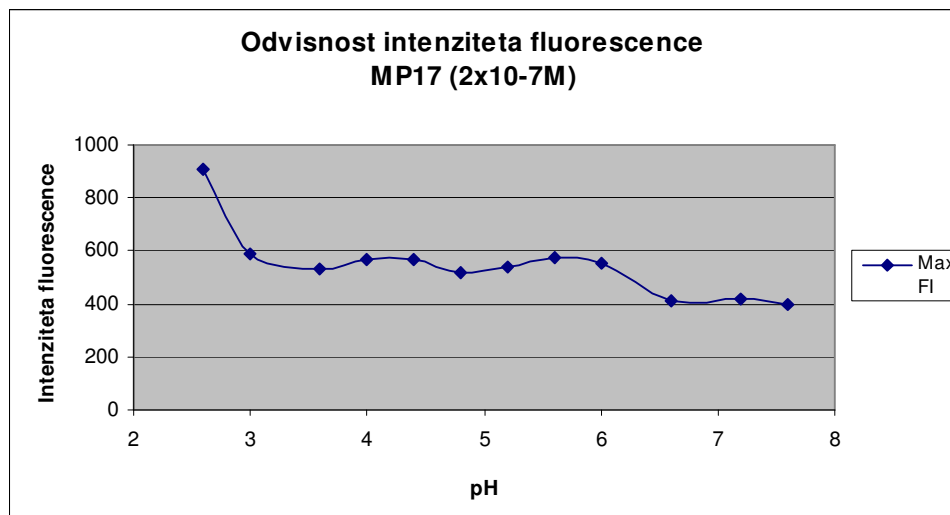
4.3.2.1. Titracijska krivulja za spojino MP-17 (konc. 4×10^{-8} M)



Graf 20: Titracijska krivulja za spojino MP-17 (konc. 4×10^{-8} M).

Iz grafa 20 lahko vidimo, da krivulja nima značilne oblike titracijske krivulje. Vzrok za to sta lahko dve metilni skupini ob amidni vezi, ki sterično preprečujeta nastanek γ -laktamskega obroča, s tem pa posledično nastanek spiro oblike. Pri tej spojini nismo mogli določiti vrednosti pKa, saj krivulja nima sigmoidne oblike. Opazili smo tudi, da spojina nima izrazitega preskoka v intenziteti barve, ampak je v sredini prisoten plato in zato ni primerna za označevanje kislinskih celičnih struktur (lizosomov). Najvišjo fluorescenco smo izmerili pri pH 2,6.

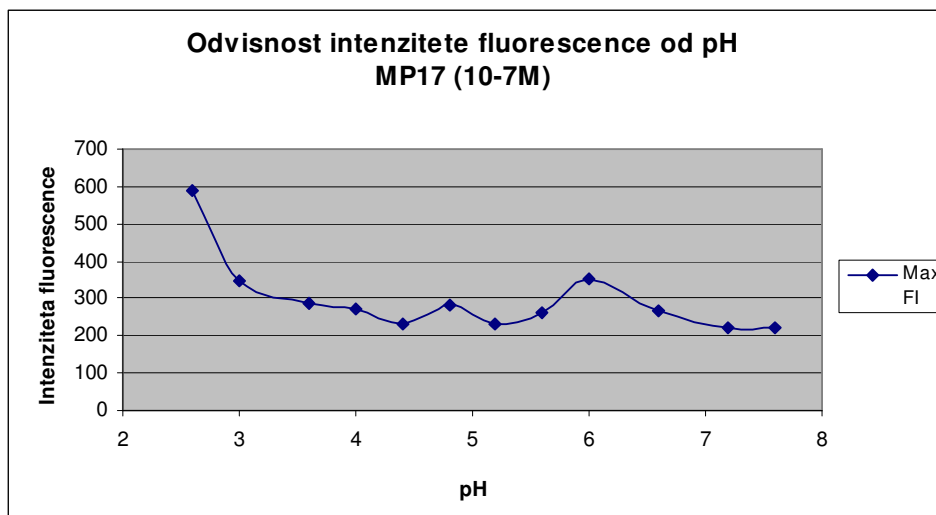
4.3.2.2. Titracijska krivulja za spojino MP-17 (konc. 2×10^{-7} M)



Graf 21: Titracijska krivulja za spojino **MP-17** (konc. 2×10^{-7} M).

Tudi pri tej konc. 2×10^{-7} M smo opazili podobno kot pri zgornji konc. 4×10^{-8} M te spojine **MP-17**. Tudi iz tega grafa lahko vidimo, da spojina nima sigmoidne krivulje. Vzrok zato je verjetno isti kot pri zgornji konc. (sterično oviranje dveh metilnih skupin ob amidni vezi). Zato tudi pri tej konc. nismo mogli določiti okvirne vrednosti pKa. Tudi tukaj smo potrdili, da spojina nima izrazitega preskoka v intenziteti in je manj primerna za označevanje kislinskih celičnih struktur. Najvišjo fluorescenco pa smo tudi tu izmerili pri pH 2,6.

4.3.2.3. Titracijska krivulja za spojino MP-17 (konc. 10^{-7} M)



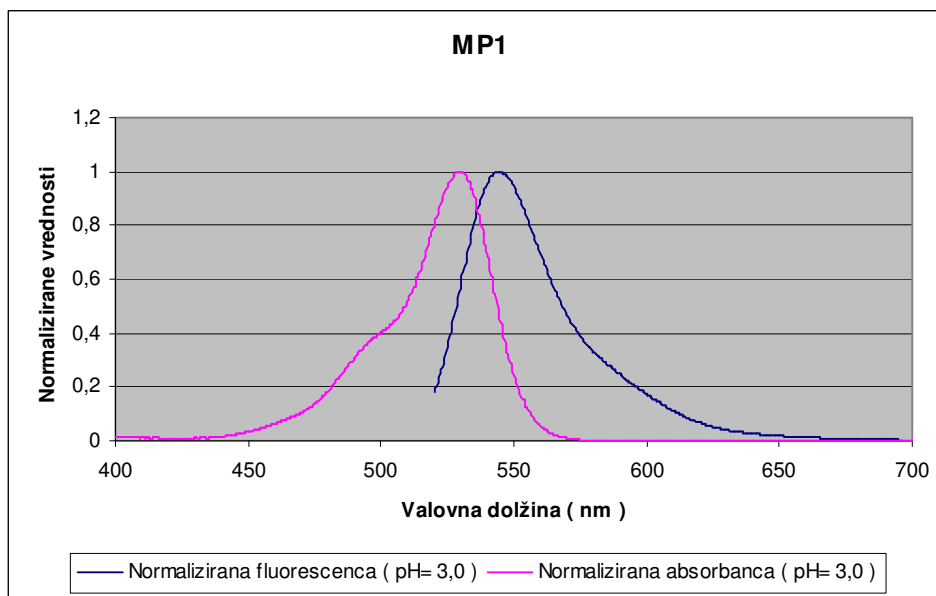
Graf 22: Titracijska krivulja za spojino **MP-17** (10^{-7} M).

Tudi pri tej konc. smo opazili isto kot pri zgornjih dveh konc. spojine **MP-17**. Tudi ta titracijska krivulja nima lepe sigmoidne oblike, zato tudi pri tej nismo mogli določiti okvirne vrednosti pKa. Prav tako lahko rečemo, da ta spojina ni primerna za označevanje lizosomov, saj nima izrazitega preskoka v intenziteti. Najvišjo fluorescenco smo prav tako zaznali pri vrednosti pH 2,6.

4.4. Normalizirane maksimalne krivulje

Normalizirali smo samo tiste rezultate meritev absorbance in fluorescence vzorčne raztopine pri tisti vrednosti pH, pri kateri je bila dosežena maksimalna fluorescenca. Iz grafov lahko vidimo, da so spektri emitirane svetlobe pomaknjen k daljšim valovnim dolžinam in to imenujemo Stokesov premik. Dolžina tega premika je pri vseh treh spojinah (**MP-1**, **AAG-12** in **MP-17**) približno 15 nm. Iz spodnjih grafov je razvidno, da sta krivulji simetrični, vendar se pri absorbanci pojavi rama, ki pa potem pri emisijskem spektru ni tako vidna.

4.4.1. Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino MP-1

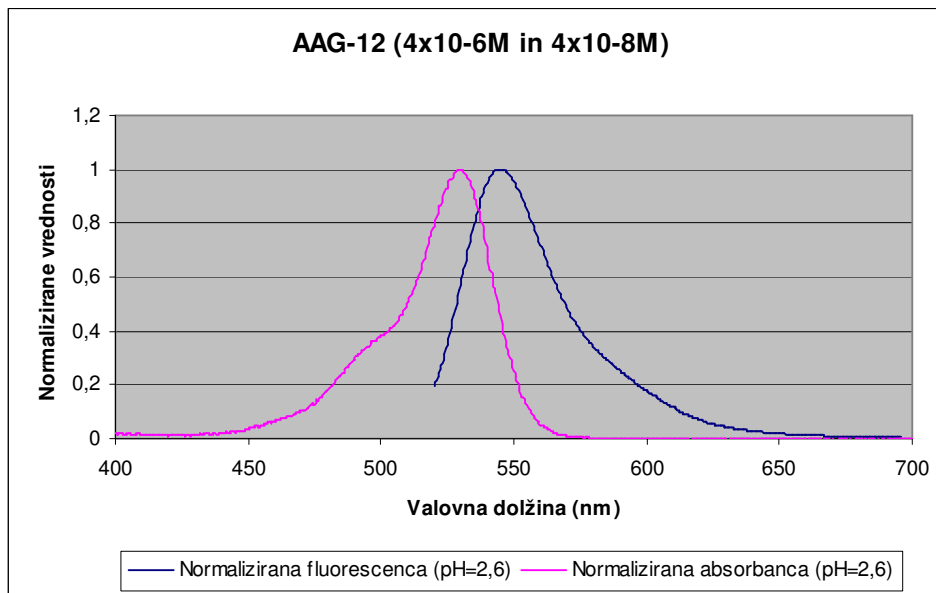


Graf 23: Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za vzorčno spojino **MP-1**, pri pH 3,0.

4.4.2. Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino AAG-12

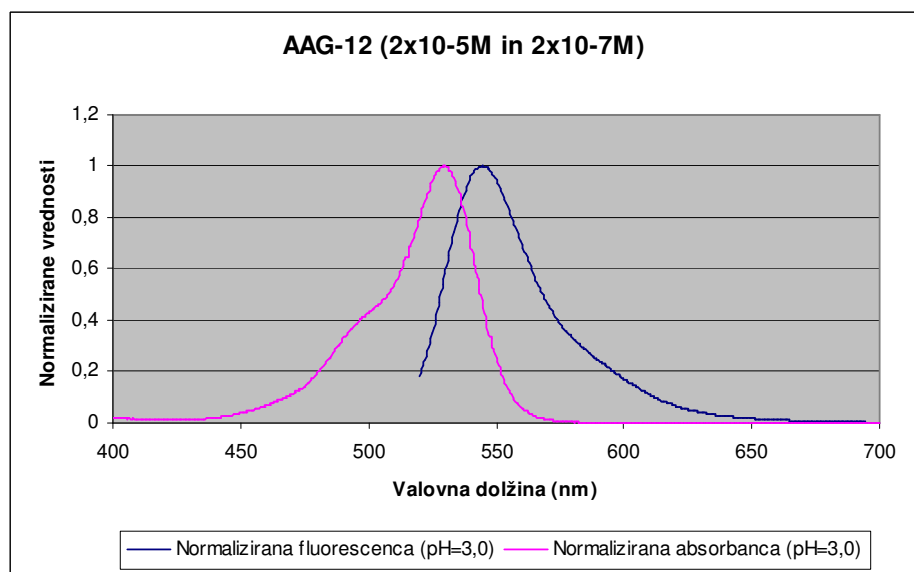
Pri tej spojini smo normalizirali spektre absorbance in fluorescence pri vseh treh konc. te spojine, ki smo jih posneli. Višje vrednosti konc. vzorčne raztopine (2×10^{-5} M, 4×10^{-6} M in 10^{-5} M) so bile posnete z UV/VIS spektrofotometrom, nižje vrednosti konc. vzorčne raztopine (2×10^{-7} M, 4×10^{-8} M in 10^{-7} M), pa so bile izmerjene z fluorescentno spektroskopijo.

4.4.2.1. Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino AAG-12 (konc. $4 \times 10^{-6} M$ in $4 \times 10^{-8} M$)



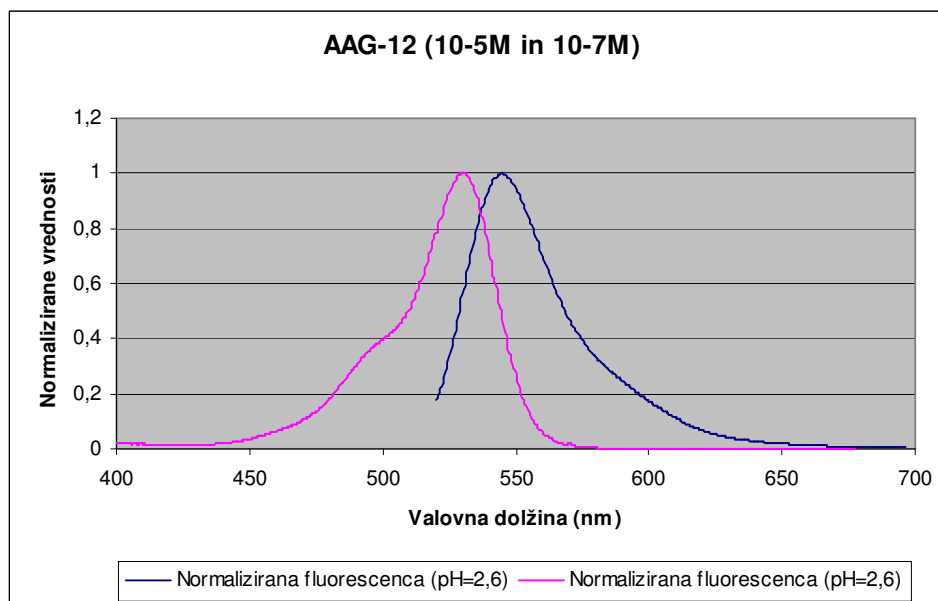
Graf 24: Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino AAG-12 (konc. $4 \times 10^{-6} M$ in $4 \times 10^{-8} M$), pri pH 2,6.

4.4.2.2. Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino AAG-12 (konc. $2 \times 10^{-5} M$ in $2 \times 10^{-7} M$)



Graf 25: Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino AAG-12 (konc. $2 \times 10^{-5} M$ in $2 \times 10^{-7} M$), pri pH 3,0.

4.4.2.3. Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino AAG-12 (konc. 10^{-5} M in 10^{-7} M)

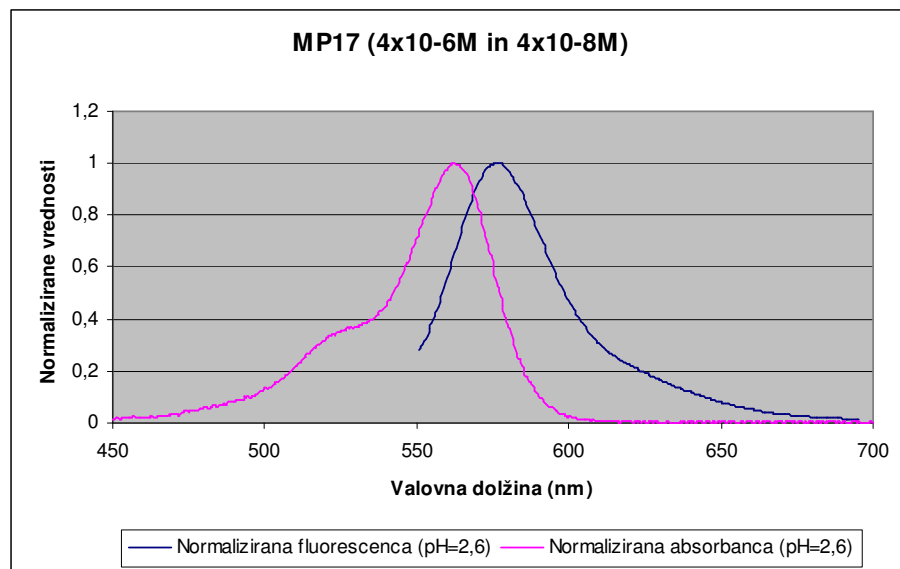


Graf 26: Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino AAG-12 (konc. 10^{-5} M in 10^{-7} M), pri pH 2,6.

4.4.3. Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino MP-17

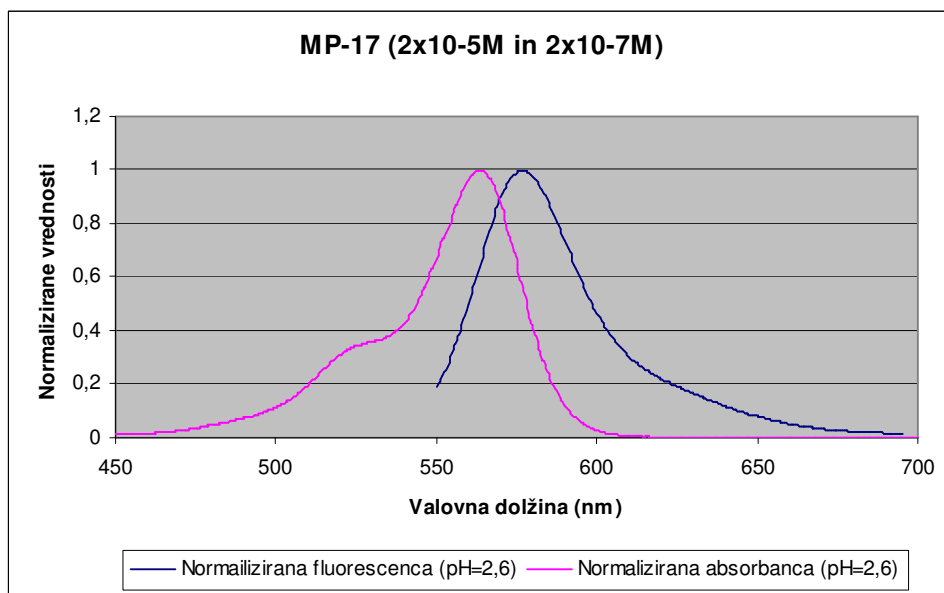
Pri spojini **MP-17** smo normalizirali spektre absorbance in fluorescence pri vseh treh konc. te spojine, ki smo jih posneli. Višje vrednosti konc. te spojine (2×10^{-5} M, 4×10^{-6} M in 10^{-5} M) so bile posnete z UV/VIS spektrofotometrom, nižje vrednosti konc. (2×10^{-7} M, 4×10^{-8} M in 10^{-7} M), pa so bile izmerjene z fluorescentno spektroskopijo.

4.4.3.1. Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino MP-17
(konc. $4 \times 10^{-6} M$ in $4 \times 10^{-8} M$)



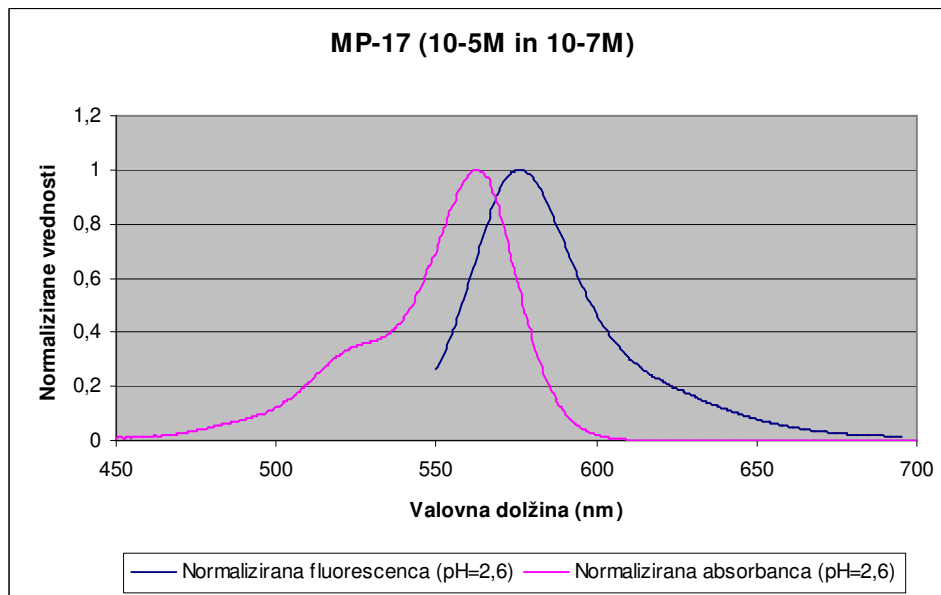
Graf 27: Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino MP-17 (konc. $4 \times 10^{-6} M$ in $4 \times 10^{-8} M$), pri pH 2,6.

4.4.3.2. Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino MP-17
(konc. $2 \times 10^{-5} M$ in $2 \times 10^{-7} M$)



Graf 28: Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino MP-17 (konc. $2 \times 10^{-5} M$ in $2 \times 10^{-7} M$), pri pH 2,6.

4.4.3.3. Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino MP-17 (konc. $10^{-5} M$ in $10^{-7} M$)



Graf 29: Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence za spojino MP-17 (konc. $10^{-5} M$ in $10^{-7} M$), pri pH 2,6.

5. RAZPRAVA

Namen našega dela je bil na novo sintetiziranim spojinam rodaminskega tipa, ki fluorescirajo v odvisnosti od pH, določiti njihove foto-fizikalne lastnosti. V našo raziskavo smo vključili tri na novo sintetizirane spojine **MP1**, **AAG-12**, **MP-17**. Spojinam smo posneli absorpcijske in emisijske spektre pri različnih vrednostih pH. Naša želja je bila, da bi med njimi našli spojino oz. barvilo, ki ima maksimalno absorbanco in emisijo pri vrednosti pH 4,4 in je primerna za označevanje kislh celičnih organelov (lizosomov).

Odločili smo se, da bomo našim testnim spojinam (**MP-1**, **AAG-12** in **MP-17**) posneli absorpcijske in emisijske spektre pri različnih pH, zato smo za vsako spojino pripravili serijo dvanajstih vzorčnih raztopin z ustrezno koncentracijo spojine v območju pH od 2,6 do 7,6. Za pripravo pufrov smo uporabili Sigma-Aldrich-evo recepturo. Za UV/VIS spektroskopijo smo pripravili višje konc. vzorčnih raztopin, za fluorescenčno spektroskopijo pa so bile konc. vzorčnih raztopin nižje. Fluorescenčna spektroskopija je občutljivejša metoda in potrebujemo nižjo konc. testne spojine, saj merimo količino emitiranih fotonov, ki padejo na fotopomnoževalko, kot merjenja pa je pravokoten glede na ekscitacijo (tako se izognemo ozadju). Za UV/VIS spektroskopijo pa potrebujemo višje konc. saj moramo meriti manjše relativne razlike v absorbanci. Pri tej metodi merimo razliko fotonov, ki jih vzorec ne absorbira, v primerjavi s slepo raztopino.

Naš namen je bil tudi preveriti, če se spremeni vrednost pH, ko pripravimo vzorčne raztopine. Iz dobljenih izmerjenih vrednosti smo narisali absorpcijske in emisijske spektre, pri različnih vrednosti pH ter iz dobljenih rezultatov narisali pH titracijske krivulje in grafično določili okvirne pK_a vrednosti za posamezno spojino.

Najprej smo pripravili vzorčne raztopine za UV/VIS spektroskopijo, nato pa še vzorčne raztopine za fluorescentno spektroskopijo. Ker smo uporabili za vse tri sintetizirane spojine enak protokol, jih lahko med sabo primerjamo. Spojine so dobro topne v DMSO, zato s samim raztapljanjem v topilu ni bilo večjih težav. Pri vseh spojinah lahko trdimo, da je bilo doseženo ravnovesje med sipo in planarno obliko (slika 7). Ravnovesje je doseženo takrat, ko se fluorescenca ali absorbanca s časom ne spreminja več. V kislem pH pride do odprtja laktamskega obroča, spojine pridejo v planarno obliko, dosežejo konjugacijo in s tem

postanejo obarvane (rožnata barva) in fluorescirajo. Planarne oblike molekul naših vzorcev, ki smo jih pripravili za UV/VIS spektroskopijo, so bile lepo rožnato obarvane, kar samo lahko lepo videli s prostim očesom in te so v vidnem območju lepo absorbirale. Preskok barve pri vzorčnih raztopinah za fluorescenčno spektroskopijo ni bil lepo viden s prostim očesom, saj so bile konc. le-teh veliko nižje, ker smo osnovno raztopino redčili. Na ravnotežje vpliva pH vzorčne raztopine, saj je od njega odvisno kam bo le-to pomaknjeno. Opazili smo tudi, da je pri vseh treh spojinah fluorescenca blizu nevtralnega območja skoraj ničelna, kar je zelo ugodno.

Tako absorpcijski kot tudi emisijski spektri prikazujejo odvisnost analiziranih spojin od vrednosti pH. Ugotovili smo, da so položaji maksimuma absorpcijskih spektrov in prav tako tudi položaji maksimuma emisijskih spektrov analiziranih spojin pri vseh merjenih vrednostih pH in vseh konc. enaki, kar pomeni da se ta maksimuma ne spreminjata s spremembo pH ali konc..

Rodamin 6G je eden od najbolj učinkovitih laserskih barvil in fluorescenčnih sond, zaradi njegovih izjemnih foto-fizikalnih lastnosti, kot so velik molarni ekstinkcijski koeficient in visok kvantni izkoristek pri valovni dolžini ekscitacije. Pri zelo visokih koncentracijah lahko pride do tvorbe agregatov med rodaminskimi deli molekule, kar vodi v spremembo maksimuma emisijskega spektra. Povečanje koncentracije povzroči širši in progresiven batokromni premik emisijskega spektra. Prišlo naj bi do agregacije (dimerizacije) rodamina, katera se običajno dokazuje s spremembo absorpcijskega spektra. Pri višjih konc. se fluorescenca nenadoma zmanjša zaradi tvorbe ne fluorescentnih agregatov (28-31).

Vzorčnim raztopinam smo s pomočjo pH-metra pomerili pH, ter ugotovili, da vrednosti pH vzorčnih raztopin niso bistveno odstopale od pH pripravljenih pufernih raztopin. Interval odstopanja je bil največ $\pm 0,10$ vrednosti od pH pripravljenega pufra, zato smo se odločili, da bomo na grafih predstavili vrednosti pH v pripravljenih pufernih raztopin.

Titracijske krivulje nam pokažejo spreminjanje intenzitete fluorescence v odvisnosti od pH. V nevtralnem (pH nad 6,0) oz. rahlo kislem okolju se spojine nahajajo v spirociklični obliki in ne fluorescirajo. V prisotnosti H^+ ionov v bolj kislem okolju pride do spremembe strukture molekule. Vzpostavi se ravnotežje in molekule fluorescirajo. V močno kislem

mediju (pod pH 2) spojine prav tako ne fluorescirajo, saj sta protonirani obe aromatski amino skupini na rodaminu in imamo porušen konjugiran sistem - spojina ni več fluorofor. Titracijske krivulje imajo sigmoidno obliko le v primeru, da ni steričnih ovir v okolici amidne vezi. Odločili smo se, da bomo iz dobljenih titracijskih krivulj grafično odčitati tudi okvirne vrednosti pKa.

Spojina **MP-1** je derivat rodamina 6G in njena krivulja ima lepo sigmoidno obliko, saj je dosežen spodnji in zgornji plato. Izrazit preskok v obarvanosti ima spojina med pH vrednostjo 5,0 in 3,0, kar je za označevanje kislh celičnih organelov (lizosomov) neugodno, saj je prenizko. Okvirna vrednost pKa za to spojino je 4,4.

Spojina **AAG-12** je prav tako derivat rodamina 6G. Pri tej spojini smo pripravili tri konc. osnovne raztopine, ki smo jo nato redčili.

Pri konc. $4 \times 10^{-8} \text{ M}$ smo ugotovili, da titracijska krivulja nima tipične oblike sigmoidne krivulje, spodnji plato je lepo viden, zgornji pa ne. Preskok v obarvanosti ima spojina med pH 5,0 in 2,6.

Pri konc. $2 \times 10^{-7} \text{ M}$ smo pri risanju titracijske krivulje točko pri pH 4,4 izpustili, saj je odstopala od ostalih točk na grafu in je po vsej verjetnosti posledica napake pri samem eksperimentalnem delu. Spojina pri tej konc. nima tipične oblike sigmoidne krivulje, spodnji plato je lepo viden, zgornji pa ne. Izrazit preskok v obarvanosti ima spojina med pH 5,0 in 3,0.

Pri koncentraciji spojine 10^{-7} M smo ugotovili podobno, kot pri zgornjih dveh konc., da spojina nima lepe sigmoidne oblike. Dosežen je spodnji plato, za zgornjega pa ne moremo zanesljivo trditi. Med pH 5,0 in 3,0 ima spojina izrazit preskok v obarvanosti.

Pri vseh treh konc. spojine **AAG-12** smo določili okvirno pKa točko pri vrednosti pH 4,0. Spojina pa je imela pri vseh treh konc. prenizek preskok v obarvanosti, da bi lahko z njo označevali kisle celične organele (lizosome).

Spojina **MP-17** je derivat rodamina B. Tudi pri tej spojini smo se odločili, da smo fluorescenco pomerili pri istih konc. ($2 \times 10^{-7} \text{ M}$, $4 \times 10^{-8} \text{ M}$ in 10^{-7} M), kot pri spojini **AAG-12** pri izbranih pH. Pri tej spojini smo ugotovili, da krivulje nimajo tipične oblike sigmoidne krivulje. Vzrok zato sta lahko dve metilni skupini ob amidni vezi, ki sterično otežujeta nastanek γ -laktamskega obroča oziroma spiro oblike. Ker spojina nima

sigmoidne oblike tudi nismo mogli določiti okvirnih vrednosti pKa. Opazili smo tudi, da spojina nima izrazitega preskoka v intenziteti barve, ampak je v sredini prisoten plato in zato ni primerna za označevanje kisljih celičnih struktur (lizosomov).

Normalizirane maksimalne krivulje fluorescence in absorbance kažejo Stokesov premik, saj so spektri emitirane svetlobe pomaknjeni k daljšim valovnim dolžinam. Dolžina tega premika je pri vseh treh spojinah (**MP-1**, **AAG-12** in **MP-17**) približno 15 nm, kar je za fluorofore ugodno. Normalizirani krivulji sta skoraj simetrični; pri absorbanci se pojavi rama, ki pa pri emisijskem spektru ni vidna.

Spojini **AAG-12** in **MP-17** imata v svoji strukturi manozo in sta manozilirana rodaminska derivata, kar bi lahko izkoristili v študiji DC-SIGN receptorja, saj s pomočjo fluorescenčne spektroskopije študirajo njihovo vlogo.

Za zaključek razprave želimo poudariti, da smo v nalogi želeli novim spojinam rodaminskega tipa, ki fluorescirajo v odvisnosti od pH, določiti njihove foto-fizikalne lastnosti. Naša želja je bila, da bi med njimi našli takšno spojino, ki ima maksimalno absorbanco in fluorescenco pri pH 4,4 in je primerna za označevanje kisljih celičnih organelov, kot so lizosomi. Pri spojinah je bilo doseženo ravnotežje med spiro in konjugirano obliko, ki je bilo odvisno od pH vrednosti. Spojine, ko so dosegle konjugirano obliko, so se obarvale v rožnato barvo in le-te so v vidnem območju absorbirale in fluorescirale. Vse tri spojine so dobro topne, vendar imata spojini **MP-1** in **AAG-12** izrazit preskok v obarvanosti pri prenizkem pH, saj je njun preskok med vrednostjo pH 5,0 in 3,0, kar je neugodno za označevanje lizosomov. Pri spojini **MP-17** izrazitega preskoka v intenziteti barve nismo zaznali, ampak je bil v sredini prisoten plato in zato za označevanje lizosomov ni primerna. Najbolj optimalna kombinacija za fluorescentni označevalec bi bila spojina sestavljena iz rodamina B, enostavnega distančnika (brez dodatnih metilnih skupin) in manoze.

6. SKLEPI

V okviru našega dela smo prišli do naslednjih sklepov:

- Za vse spojine rodaminskega tipa (**MP-1**, **AAG-12** in **MP-17**) je značilna sprememba strukture oz. preklon iz spirociklične oblike v planarno, kar se odraža v intenziteti fluorescence.
- Izbrane spojine se ne obnašajo kot močne kisline ali močne baze, zato ne spremenijo pH vrednosti pufernih raztopin. Uporabili bi jih lahko kot pH indikatorje pri nevtralizacijskih titracijah.
- Grafično določeni vrednosti pKa iz tiracijskih krivulj znašata 4,4 za spojino **MP-1** in 4,0 za spojino **AAG-12**. Določitev pKa vrednosti pri spojini **MP-17** ni bila mogoča.
- Izrazit preskok v obarvanosti imata spojina **MP-1** in **AAG-12** med pH vrednostjo 5,0 in 3,0. Spojina **MP-17** nima izrazitega preskoka v obarvanosti.
- Za barvanje kislil celičnih struktur (lizosomov) je najprimernejša spojina **MP-1**, saj ima pKa vrednost najbližje pH vrednosti lizosomov (4,8), a še vedno nekoliko prenizko. Spojina **AAG-12** ima to vrednost še pri nižjem pH, kar je še manj ugodno. Spojina **MP-17** ni primerna za označevanje kislil celičnih struktur zaradi odsotnosti izrazitega preskoka v intenziteti fluorescence.
- Pri vseh treh izbranih spojinah se maksimumi absorpcijskih in emisijskih spektrov ne spremenijo (pri vseh izbranih koncentracijah in pH vrednostih ostanejo pri enakih valovnih dolžinah), kar nakazuje odsotnost tvorbe agregatov med molekulami rodaminov.
- Vse spojine imajo značilen Stokesov premik 15 nm, kar je za fluorofore ugodno.
- Spojini **MP-1** in **AAG-12** sta uporabna fluorescentna označevalca pri fluorescentni mikroskopiji zlasti za tiste (celične) strukture, ki imajo pH vrednosti nižje od njihovih pKa vrednosti.

7. LITERATURA

1. Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A.: Principles of instrumental analysis, Fifth Edition, Harcourt Brace & Company, Florida, 1998:115-142,300-328.
2. Predavanje spektroskopija
<http://www.fkkt.uni-lj.si/si/?112> (dostopno 5.9.2013).
3. Atkins P.W., Frazer M.J., Clugston M.J., Jones R.A.Y.: Kemija zakonitosti in uporaba, 2. natis, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 1997: 53.
4. Lobnik A.: Skripta za vaje pri predmetu Okoljska analitika, Univerza v Mariboru Fakulteta za strojništvo, Tiskarna tehniških fakultet, Maribor, 2010: 2-4.
5. Pečar Fonović U., Obermajer N., Jevnikar Z., Mirković B., Rojnik M., Hofner A., Kos J.: Vaje iz farmacevtske biologije, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011: 34.
6. Analizna kemija II
http://atom.uni-mb.si/edu/egradiva/analizna2_gradivo.pdf
(dostopno 20.9.21013).
7. Bishop M. L., Fody E. P., Schoeff E. L.: Clinical Chemistry Techniques, Principles, Correlations, Sixth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2010 :130-140.
8. Fluorescenčna spektroskopija
<http://www-f1.ijs.si/~ziherl/FluorescencnaSpektroskopija.pdf>
(dostopno dne 21.8.1013).
9. Lawrence A. Kaplan, Amadeo J. Pesco: Clinical Chemistry (Theory, Analysis, Correlation), Mosby-Year Book Inc. USA, 1996: 97-101.

10. Fluorescenčna mikroskopija
http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/KB/Gradivo/Fluorescencna_mikroskopija.pdf
(dostopno dne 21.8.2013).
11. Koller J.: Struktura atomov in molekul, Molekule, osnove spektroskopije, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2000: 92-93.
12. Mlekuž S.: Teoretične osnove in uporabnost fluorescenčne spektroskopije v farmaciji, Farmaceutski vestnik, 46: 305-328.
13. Kralj P., Kralj Cigić I., Pompe M., Guček M., Levart A., Keber I., Veber M.: Analizna kemija, Navodila za laboratorijske vaje (univerzitetni študijski program farmacije), Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2006: 80-81.
14. Fluorescence spectrophometry
http://www.eplantscience.com/botanical_biotechnology_biology_chemistry/dean/fluorescence_spectrophotometry.php (dostopno 28.8.2013).
15. Burtis A. C., Ashwood R. E.: Tietz: Fundamentals of Clinical Chemistry, Firth Edition, W.B. Saunders Company, USA, 2001: 75-86.
16. Wenshen Z., Bo T., Xia L., Yuanyuan L., Kehua X., Jianping M., Lili T., Guiwen Y., A highly sensitive acidic pH fluorescent probe and its application to HepG2 cells. Analyst 2009; 134: 367-371.
17. Jingze W., Qiwu Y., Haibin S., Wenqin Z.: A fluorescent probe of N'-formyl-rhodamine B hydrazide: structure and spectral properties of protonation behaviour. Organic & Biomolecular Chemistry 2012; 10: 7677-7677.

18. Švajger U., Obermajer N., Anderluh M., Kos J., Jeras M.: DC-SIGN ligation greatly affects dendritic cell differentiation from monocytes compromising their normal function. *Journal of Leukocyte Biology* 2011; 89: 893-905.
19. Hajšek D.: Testni sistem za določanje afinitete antagonistov receptorja DC-SING in vitro. *Diplomska naloga, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011: 5-13.*
20. Pavlek T.: Vzpostavitev testnega sistema za določanje morebitnega agonizma ali antagonizma inhibitorjev receptorja DC-SING. *Diplomsko delo, Biotehniška fakulteta, Ljubljana 2012: 1-2, 4-8, 10-11, 17-18.*
21. Anderluh M., Jug G., Švajger U., Obermajer N.: DC-SIGN Antagonisti, a Potential New Class of Anti-Infectives. *Current Medicinal Chemistry* 2012; 19: 1-15.
22. Obermajer N., Sattin S., Colombo C., Bruno M., Švajger U., Anderluh M., Bernardi A.: Design, synthesis and activity evaluation of mannose-based DS-SIGN antagonists. *Molecular Divers* 2011; 15: 347-360.
23. Receptura za pufre
 - <http://www.sigmaaldrich.com/content/sigma-aldrich/global-home/global/en/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html#citric> (dostopno dne 25.6.2013).
24. Stopar P., Vrednotenje od pH odvisnih fluorescentnih spojin rodaminskega tipa, magistrska naloga, Ljubljana, 2012
25. UV/VIS spektrofotometer
 - <http://www.nist.gov/ncnr/upload/E136uvvis.pdf> (dostopno 5.7.2013).
26. Fluorimeter
 - <http://www.perkinelmer.com/Catalog/Product/ID/L2250107> (dostopno 20.7.2013).

27. Fluorimeter

<http://www.ffa.uni-lj.si/o-fakulteti/katedre/katedra-za-farmacevtsko-kemijo/oprema-in-storitve.html> (dostopno 20.7.2013).

28. Burghardt P. T., Lyke E. J., Ajtai K.: Fluorescence emission and anisotropy from rhodamine dimers. *Biophysical Chemistry* 59; 1996: 119-131.

29. Penzkofer A., Leupacher: Fluorescence behaviour of highly concentrated rhodamine 6G solutions. *Journal of Luminescence* 37; 1987: 61-72.

30. Wang H., Yang Q., Sun L., Wang S., Wang W., Zhang C., Li Y., Xu S., Li Y.: Aggregation states of rhodamine 6G in electrospun nanofibrous films. *Journal of Colloid and Interface Science* 341; 2010: 224-231.

31. Selwyn E. J., Steinfeld I. J.: Aggregation Equilibria of Xanthene Dyes. *The Journal of Physical Chemistry*. 1972; 6.5: 762-774.